

Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Année 1981

N° _____

**DOSAGES ENZYMATIQUES
EN RAPPORT
AVEC LA PATHOLOGIE HEPATIQUE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le Janvier 1982
devant l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

par *Sindo TRAORE*
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

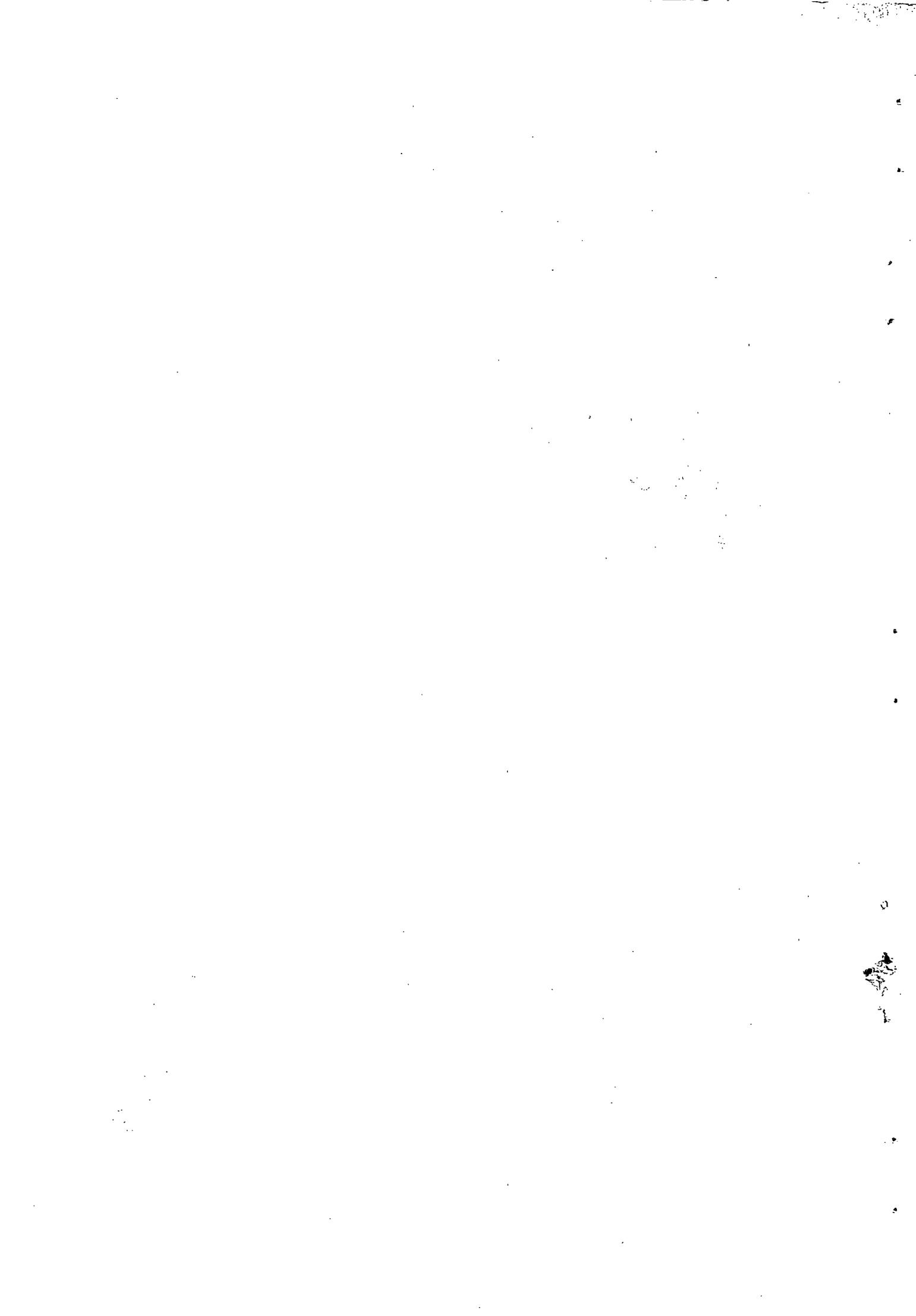
Examineurs:

PRESIDENT : Professeur J. JOSSELIN

F. MIRANDA

MEMBRES B. DUFLO

Docteur G. GAUCHOT



ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE ACADEMIQUE 1980 - 1981

DIRECTEUR GENERAL	Professeur Aliou BA
DIRECTEUR GENERAL ADJOINT	Professeur Bocar SALL
SECRETAIRE GENERAL	Monsieur Sory COULIBALY
ECONOME	Monsieur Diouncounda SISSOKO
CONSEILLER TECHNIQUE	Professeur Agrégé Philippe RANQUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Sadio SYLLA	Anatomie - Dissection
Professeur Francis MIRANDA	Biochimie
Professeur Michel QUILICI	Immunologie
Professeur Humbert GIONO-BARBER	Pharmacodynamie
Professeur Jacques JOSSELIN	Biochimie
Professeur Jean-Paul MACTINEAUD	Physiologie
Professeur Michel POUSSET	Matières médicales
Docteur Bernard LANDRIEU	Biochimie
Docteur Gérard TOURAME	Psychiatrie
Docteur Jean DELMONT	Santé Publique
Docteur Boubacar Cisse	Toxicologie - Hydrologie
Docteur P. GIONO-BARBER	Anatomie - Physiologie humaines
Docteur Thérèse FARES	Anatomie - Physiologie humaines

PROFESSEURS TITULAIRES RESIDANT A BAMAKO

Professeur Aliou BA	Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	Anatomie - Orthopédie - Traumatisme - Secourisme
Professeur Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Professeur Mohamed TOURE	Pédiatrie
Professeur Souleymane SANGARE	Pneumo-Phthisiologie
Professeur Mamadou KOUMARE	Pharmacologie - Matières médicales
Professeur Mamadou Lamine TRAORE	Obstétrique - Médecine Légale
Professeur Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Professeur Abdoulaye Ag-RHALY	Médecine Interne
Professeur Yaya SIMAGA	Santé Publique
Professeur Siné BAYO	Histologie - Embryologie - Anatomie pathologique
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Anatomie - Chirurgie
Professeur Bréhima KOUMARE	Bactériologie
Professeur Mamadou Koreissi TOURE	Sémiologie cardio-vasculaire
Professeur Philippe RANQUE	Parasitologie
Professeur Bernard DUFLO	Pathologie médicale - Thérapeutique - Physiologie
Professeur Robert COLOMAR	Gynécologie - Obstétrique
Professeur Oumar COULIBALY	Chimie Organique
Professeur Adama SISSOKO	Zoologie
Professeur Bouba DIARRA	Microbiologie
Professeur Salikou SANOGO	Physique

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Abderhamane Sidéye MAYGA	Parasitologie
Docteur Sory KEITA	Microbiologie
Docteur Yaya FOFANA	Microbiologie - Hématologie
Docteur Sory Ibrahima KABA	Santé Publique
Docteur Moctar DIOP	Sémiologie chirurgicale

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

(suite)

Docteur Balla COULIBALY	Pédiatrie - Médecine du Travail
Docteur Bénitiéni FOFANA	Obstétrique
Docteur Boubacar CISSE	Dermatologie
Docteur Souleymane DIA	Pharmacie Chimique
Docteur Youcouba COULIBALY	Stomatologie
Docteur Sanoussi KONATE	Santé Publique
Docteur Issa TRAORE	Radiologie
Docteur Assitan SY SOW	Gynécologie

CHARGES DE COURS

Professeur Niamanto DIARRA	Mathématiques
Professeur N'Golo DIARRA	Botanique - Cryptogamie - Biologie végétale
Professeur Souleymane TRAORE	Physiologie Générale
Docteur Gérard GAUCHOT	Microbiologie
Docteur Gérard TRUSCHEL	Anatomie - Sémiologie chirurgicale
Docteur Boul Kassoum HAIDARA	Galénique - Diététique - Nutrition
Docteur Philippe JONCHERES	Urologie
Docteur Hamadi Mody DIALL	Chimie Analytique
Docteur Aliou KEITA	Galénique
Docteur Abdoulaye DIALLO	Gestion - Législation
Docteur Saïbou MAIGA	Galénique
Monsieur Cheick TIDIANI TANDIA	Hygiène du milieu

A LA MEMOIRE DE MON PERE ET DE MA MERE

Combien ils seraient heureux de partager avec moi la joie de ce jour inoubliable !

A TOUS MES FRERES ET SOEURS

Fraternelle considération.

A TOUS MES COUSINS ET COUSINES

Reconnaissance pour votre attention parentale.

A MADAME ASSITAN COULIBALY

Ta haute lucidité ne m'a jamais fait défaut. Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

A MONSIEUR N'GOLO TRAORE ET MESDAMES

Rien ne saurait exprimer ma reconnaissance pour le soutien qu'ils m'ont généreusement prodigué.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les meilleurs.

A LA FAMILLE COULIBALY A SIRAKOROLA

Mes remerciements chaleureux.

A TOUS MES PROCHES PARENTS

Sincère considération.

A MONSIEUR TIANSE DIARRA

qui m'a beaucoup aidé durant mes études. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

A MES ONCLES NACOUMA, OUENEGUE DIARRA

sans lesquels je serais perdu. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

**A MESSIEURS DJIRIBA DIARRA, DORRY DIARRA,
ET LA FAMILLE DIARRA**

qui ont su supporter mes caprices et m'ont généreusement hébergé. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes meilleurs sentiments.

A MESSIEURS M'BE, N'GOLO COULIBALY ET MESDAMES

Merci pour leur soutien moral et matériel.

A TOUS MES AMIS ET CAMARADES

Mes remerciements sincères.

AUX ETUDIANTS DE NOTRE PROMOTION

Courage et prospérité.

**A NOTRE DOYEN, LE PROFESSEUR ALIOU BA,
Directeur Général de l'Ecole Nationale de Médecine
et de Pharmacie**

*Nos sincères remerciements pour la bonne formation
reçue.*

AU CORPS PROFESSORAL DE L'E.N.M.P.

AU PERSONNEL DE L'E.N.M.P.

Mes remerciements chaleureux.

**AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE
L'HOPITAL NORD ET DE LA FACULTE DE MEDICINE
SECTEUR NORD DE MARSEILLE**

*qui n'a ménagé aucun effort pour rendre agréable
notre séjour.*

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR G. MARTINEZ

Nous te remercions pour les multiples services rendus.

A MONSIEUR J.P. ROSSO

Qui a guidé nos premiers pas et nous a soutenu durant les travaux.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. MIRANDA

Qui a bien voulu nous proposer ce sujet , qui nous a accepté dans son laboratoire, et qui a déployé des efforts inestimables dans tous les domaines pour que nous puissions mener à bien ces travaux.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

*Nos remerciements vont à Monsieur le Professeur SALDUCCI
et à ses collaborateurs, qui ont eu l'obligeance de nous donner
accès aux dossiers médicaux du Service de Gastroentérologie
de l'Hôpital Nord de Marseille*

ABREVIATIONS

A	:	absorbance
α -HBDH	:	α -hydroxy butyráte-déshydrogénase
BC	:	bilirubine conjuguée
BT	:	bilirubine totale
CHE	:	cholinestérase
CHL	:	cholestérol
γ -GT	:	γ -glutamyl-transpeptidase
GLDH	:	glutamate-déshydrogénase
GOT	:	transaminase glutamique oxalacétique
GPT	:	transaminase glutamique pyruvique
G6PD	:	glucose 6 phosphate déshydrogénase
LAP	:	leucine-aminopeptidase
LDH	:	lactate-déshydrogénase
P. alc.	:	phosphatase alcaline
UV	:	ultra-violet

I ère PARTIE
ENZYMOLOGIE

1.1 - INTRODUCTION

Les enzymes (ferments ou diastases) sont des composés biologiques de nature protéique doués d'activités catalytiques et produits par la cellule vivante.

Pierre Louisot nous dit :

" Lorsque Michel Polonovski a introduit dans l'enseignement, de la Biochimie Médicale en France l'étude des réactions enzymatiques, certains pouvaient raisonnablement penser que cet aspect de la biochimie n'intéressait que les adeptes de la recherche pure et que jamais le médecin ne tirerait le moindre profit de telles connaissances apparemment fort abstraites".

Or, aujourd'hui, l'enzymologie appliquée au diagnostic médical a acquis une place prépondérante. Un certain nombre de dosages enzymatiques sont devenus des examens de routine, au même titre que celui de la glycémie ou du taux d'urée sanguine. Une nouvelle branche de la biologie est en place : c'est la séméiologie enzymatique que nul médecin ne peut ignorer. Elle est en perpétuelle évolution et ceci essentiellement selon deux grandes directions :

- l'une est l'étude de la variation des quantités d'enzymes libérés au cours des processus pathologiques, cliniquement décelables ou non, et la mise en évidence de leur origine spécifique : spécificité du tissu, de l'organe ou du système,

- . l'autre est l'étude des lésions biochimiques fines qui résultent d'un déficit enzymatique d'origine et qui se traduisent par une altération minime ou majeure d'une séquence métabolique définie. L'aspect le plus perfectionné d'une telle étude est représentée par la découverte des maladies moléculaires.

Ces deux directions de travaux dépendent étroitement, comme toute la biochimie, d'ailleurs, et toute science, en général, des moyens techniques d'investigation dont nous disposons. Le perfectionnement de l'appareillage, l'apparition de l'automatisation dans les techniques de dosage sont en grande partie responsables de l'extension rapide de l'enzymologie dans le domaine de la biologie clinique.

L'enzymologie a bien d'autres perspectives :

- . la chimie de l'hérédité,
- . la microbiologie,
- . la pharmacologie,
- . la pharmacodynamie,
- . la biologie moléculaire, dans laquelle l'enzymologie a ouvert la voie de la compréhension des mécanismes régulateurs de l'activité cellulaire au niveau nucléaire.

1.2. - HISTORIQUE (d'après S. LISSITZKY, M. ROLLAND)

Le développement de l'enzymologie est relativement récent. Bien que ses débuts remontent au commencement du 19^e Siècle, l'enzymologie ne s'est développée considérablement que depuis 50 ans et est devenue un des sujets fondamentaux d'étude en biochimie. Les premiers biochimistes involontaires ont été, à l'origine, des chercheurs qui se sont occupés de la transformation (fermentation) des jus d'origine végétale en boissons alcoolisées. Les transformations qu'ils étudiaient, en effet, étaient catalysées par les enzymes contenus dans les cellules de levure. Le processus de la fermentation a été élucidé en 1790 par LAVOISIER qui montra, grâce à des expériences de bilan, que le sucre était converti en CO₂ et alcool éthylique.

PAYEN et PERSOZ (1833) ont été les premiers à reconnaître clairement un enzyme en découvrant qu'un précipité alcoolique d'un extrait de malt contenait une substance thermolabile qui convertissait l'amidon en sucre. Ils l'appelèrent "diastase" à cause de son pouvoir de séparer les dextrines solubles des enveloppes insolubles du grain d'amidon (en grec, séparation = "diastasis"). Pendant les premiers temps de la découverte des enzymes, de nombreux chercheurs les appelèrent aussi "ferments", en raison du parallélisme qu'ils constataient entre leur action et celle de la levure en fermentation. Durant la deuxième moitié du 19^e Siècle, une controverse opposa LIEBIG, qui soutenait que la fermentation était due à l'action de substances chimiques, et PASTEUR qui affirmait qu'elle était inséparable des cellules vivantes. Les mots de ferments "organisés ou figurés" et de ferments "inorganisés ou non figurés", utilisés à cette époque, seraient traduits aujourd'hui respectivement par micro-organismes et enzymes extraits. Pour éviter cette terminologie inadéquate, KUHNE en 1878 proposa le nom d' "enzyme", dans l'intention d'indiquer quelque chose qui se trouvait dans la levure, par opposition avec la levure elle-même.

La controverse entre LIEBIG et PASTEUR fut close quand, en 1897, BUCHNER réussit à obtenir les enzymes de la fermentation sous forme acellulaire.

En 1905, HARDEN et YOUNG montrèrent que la zymase (extrait cellulaire de levure) était inactivée par dialyse, qu'elle était réactivée par addition du diffusat au dialysat et que les facteurs activants (coenzymes) contenus dans le diffusat étaient thermostables. Ainsi, la découverte de la solubilisation de l'activité enzymatique et l'introduction de la notion de coenzyme ouvraient le chemin à l'isolement et à l'identification des très nombreux enzymes particuliers et des cofacteurs constituant le système complexe dénommé zymase.

Vers la fin du 19^e Siècle, le développement remarquable de la chimie organique structurale des substances d'intérêt biologique rendit possible l'étude du domaine d'action ou spécificité des enzymes. On doit à Emile FISCHER (1894) la notion de spécificité enzymatique,

c'est-à-dire de l'existence d'une relation stérique étroite entre l'enzyme et la substance sur laquelle il agit et qu'on appelle substrat.

Sur la base des observations qu'il avait faites avec des substrats de structure connue, FISCHER énonça sa fameuse analogie "clef et serrure" pour l'interaction enzyme-substrat.

Entre 1920 et 1928, WILLSTATTER et ses collègues purifièrent de nombreux enzymes. SUMMER, en 1926, obtint pour la première fois un enzyme cristallisé, l'uréase, à partir de la fève Jack et montra que l'activité uréasique était indissociable des cristaux obtenus. Dans la décade qui suivit, NORTHROP et KUNITZ réussirent la cristallisation d'un grand nombre d'enzymes protéolytiques pancréatiques, établissant définitivement la nature protéique des enzymes. La purification intensive des enzymes intra-cellulaires n'a guère commencé que vers 1937. La meilleure connaissance de ces enzymes a considérablement augmenté la compréhension du mécanisme des processus biochimiques les plus fondamentaux et particulièrement des processus métaboliques conduisant à la production et à l'utilisation de l'énergie dont dépend la vie. L'isolement et l'étude des propriétés des enzymes responsables de la photo-synthèse, des oxydations biologiques et de la respiration, des fermentations, de la synthèse de nombreux composés organiques biologiques nécessaires à la croissance, de la réalisation de travail mécanique ou osmotique, ont éclairé la connaissance de ces processus.

1.3. DEFINITION D'UN ENZYME

Un enzyme est une protéine se caractérisant par son action catalytique sur la cinétique d'une réaction chimique, laquelle serait nulle ou très lente en son absence. En tant que protéines, les enzymes présentent des propriétés communes : possibilités d'isolement et de cristallisation, thermolabilité et destruction par les micro-organismes, sensibilité aux métaux lourds, aux détergents et aux variations du pH et de la force ionique de leur solution.

1.4. ENZYMES SÉRIQUES

Le dosage de certains enzymes dans le sang (sérum) a pris maintenant une importance considérable en médecine humaine. On s'y intéresse dans tous les syndromes cardiaques, hépatiques, pancréatiques, prostatiques, dans les anémies, les leucoses, les atteintes musculaires (dystrophies), les tumeurs, etc.

Il existe normalement, dans le sérum d'un sujet sain, une certaine quantité d'enzymes à des taux relativement constants. Mais dès qu'un organe ou un tissu est lésé, sous une influence quelconque (inflammation, infection, anoxie locale, nécrose, etc.), les enzymes solubles, présents dans les cellules de ce tissu ou de cet organe, franchissent les limites cellulaires, passent dans les liquides interstitiels, puis dans le sérum. Il en résulte une augmentation du taux des enzymes sériques dont la nature dépend de l'organe ou du tissu lésé. L'intérêt diagnostique d'une telle étude est donc évident : il permet la connaissance de l'organe ou du tissu lésé et peut même fournir des indications sur l'étendue des dégâts. Il importe cependant de savoir :

- . que l'augmentation du taux des enzymes sériques n'apparaît que si un nombre suffisamment grand de cellules est détruit ou lésé, de telle sorte que leur membrane devienne perméable aux enzymes ;
- . que certains enzymes peuvent diffuser hors de la cellule, alors que les signes de nécrose sont minimes, ce qui fait de la séméiologie enzymatique une séméiologie très fine ;
- . que l'élévation du taux sérique des enzymes n'est jamais un processus définitif. Les enzymes sont progressivement catabolisés et éliminés. La séméiologie enzymatique est donc un excellent reflet d'évolutivité des maladies.

1.5. UNITE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Les unités enzymatiques étaient encore récemment très diverses, si bien que la comparaison des résultats d'un laboratoire à un autre n'était pas chose facile. Il est préférable aujourd'hui, pour harmoniser les résultats, d'utiliser l'unité internationale (UI), mode d'expression applicable à toutes les réactions enzymatiques.

Une unité internationale est la quantité d'enzyme capable de transformer une micromole (μ mol) de substrat par minute. L'activité du sérum est évaluée en unités par litre de sérum (U/l). La température doit être précisée. Selon les pays, les activités enzymatiques sont mesurées à 25°C, 30°C, 35°C ou 37°C.

o o o

IIème PARTIE

PRINCIPE DU DOSAGE DES ENZYMES

2.1. GENERALITES

L'évaluation quantitative des enzymes sériques n'est jamais une méthode pondérale directe, trop longue ou techniquement impossible. Elle repose, dans tous les cas, sur les propriétés biologiques de l'enzyme, c'est-à-dire sa spécificité d'action ou sa spécificité de substrat.

Dans la grande majorité des cas, le sérum sanguin est mis au contact du substrat de l'enzyme recherché, en présence d'un excès de l'éventuel coenzyme et on évalue :

- . soit la quantité de substrat qui disparaît,
- . soit la quantité de produit de la réaction qui apparaît,
- . soit la modification quantitative de l'état du coenzyme.

Le résultat sera exprimé en unité d'activité enzymatique. Certains enzymes importants ont une répartition très ubiquitaire et leur présence à un taux élevé dans le sérum sanguin n'est pas caractéristique d'un organe ou d'un tissu défini. Il est alors nécessaire de préciser l'origine tissulaire ou organique de l'enzyme en étudiant :

- . les paramètres caractéristiques de l'activité : K_m et V_m ,
- . les variétés moléculaires possibles de l'enzyme, c'est-à-dire les isoenzymes.

2.2. METHODES DE DOSAGE

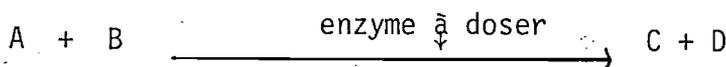
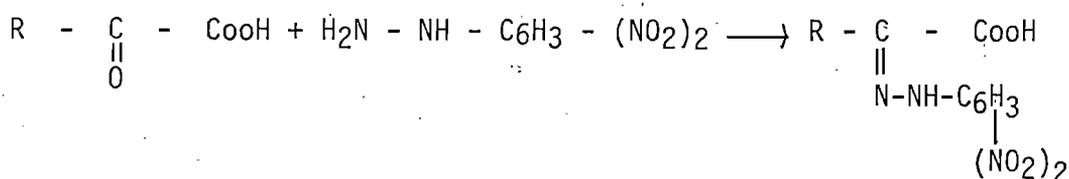
Deux types de méthodes sont fréquemment utilisés :

- . la méthode colorimétrique ou méthode des hydrazones ;
- . les méthodes mettant en oeuvre les nucléotides pyridiniques.

Elles sont d'un emploi généralement commode et rapide, car elles se terminent par une simple lecture spectrophotométrique.

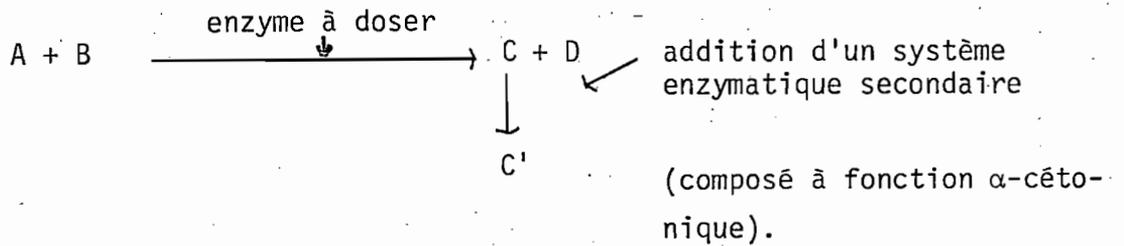
2.2.1. METHODE COLORIMETRIQUE

La méthode est appliquée aux réactions enzymatiques au cours desquelles se produit l'apparition ou la disparition d'un acide α -cétonique (ou les deux à la fois). La 2,4 dinitrophényl hydrazine se combine avec la (ou les) fonction(s) cétonique(s) et bloque la réaction enzymatique. L'hydrazone formée possède un spectre d'absorbance caractéristique. La quantité d'acide α -cétonique disparue ou formée au cours de la réaction est déduite de la mesure de l'absorbance.



Ce genre de réaction est utilisé pour la détermination des transaminases.

Un second type de méthode consiste à transformer, par une réaction secondaire, généralement enzymatique, l'un des produits de la première réaction en un constituant possédant une fonction α -cétonique et capable de donner une hydrazone.

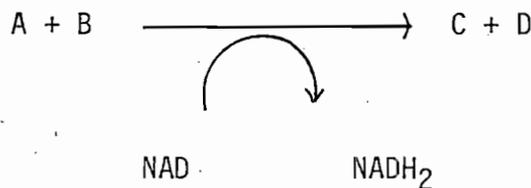


On s'arrange pour que la réaction $C \rightarrow C'$ ait une vitesse très grande et que la quantité de C' formée (mesurée par l'apparition de l'hydrazone) permette de calculer l'activité de l'enzyme à doser. C'est de cette façon que l'on dose les aldolases.

2.2.2. PRINCIPES DES DOSAGES UTILISANT UN NUCLEOTIDE PYRIDINIQUE

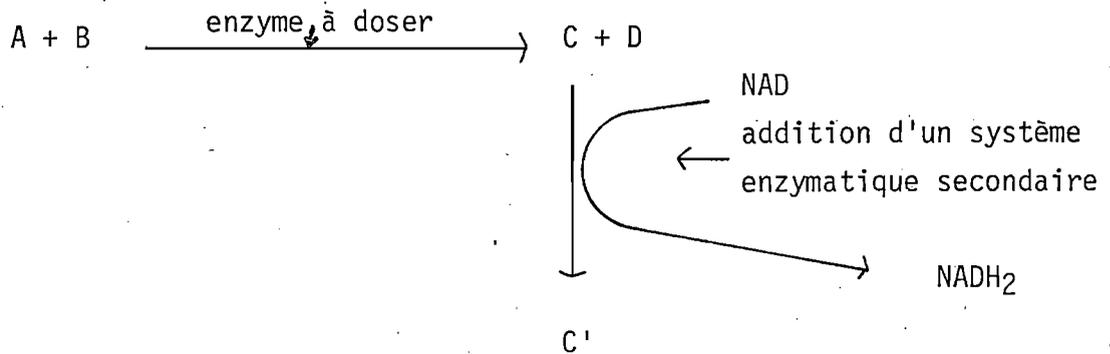
Les nucléotides (NAD ou NADP) ont des spectres d'absorbance différents, suivant qu'ils se trouvent sous forme oxydée ou sous forme réduite. Sous forme réduite, ils possèdent un maximum d'absorbance aux environs de 340 nm.

Au cours d'une réaction enzymatique nécessitant la présence de NAD ou de NADP, l'augmentation de l'absorbance à 340 nm permet de calculer la quantité de NADH_2 ou de NADPH_2 formée au cours de la réaction :



C'est le principe du dosage de l'isocitricodéshydrogénase de la LDH, de la G_6PD et de la 6 phosphogluconate-déshydrogénase. Inversement, certaines réactions nécessitent, au départ, la présence de NADH_2 (ou de NADPH_2) et la diminution de l'absorbance à 340 nm permet de calculer la quantité de NAD (ou de NADP) formée au cours de la réaction enzymatique et de déterminer l'activité enzymatique. Ce principe est mis en oeuvre au cours du dosage de la sorbitol-déshydrogénase et de l' α -hydroxybutyrate-déshydrogénase.

De la même manière que précédemment, il existe des cas où, l'enzyme dont on veut mesurer l'activité n'a pas besoin de ces nucléotides pyridiniques ; on transforme alors l'un des produits de la réaction en un autre composé par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique nécessitant, elle, la présence de nucléotides pyridiniques :



C'est le principe utilisé pour le dosage des aldolases, des transaminases, de la créatine-kinase.

2.3. PRECAUTIONS A PRENDRE

Il faut absolument éviter la dénaturation des enzymes qui sont généralement des molécules fragiles.

Pour cela, il faut des températures et un pH convenables pour l'enzyme. Il faut éviter l'inactivation ou l'inhibition des enzymes par des composés chimiques ; les dérivés mercuriels sont à proscrire. Les anticoagulants ont des actions diverses selon les enzymes. Les dosages enzymatiques sont le plus souvent demandés pour des malades en cours de traitement ; or, de nombreux médicaments se comportent comme des inhibiteurs des enzymes :

- . la quinine et les organo-arsénicaux inhibent les estérases en général ;
- . l'ésérine et divers alcaloïdes inhibent spécifiquement la cholinestérase ;

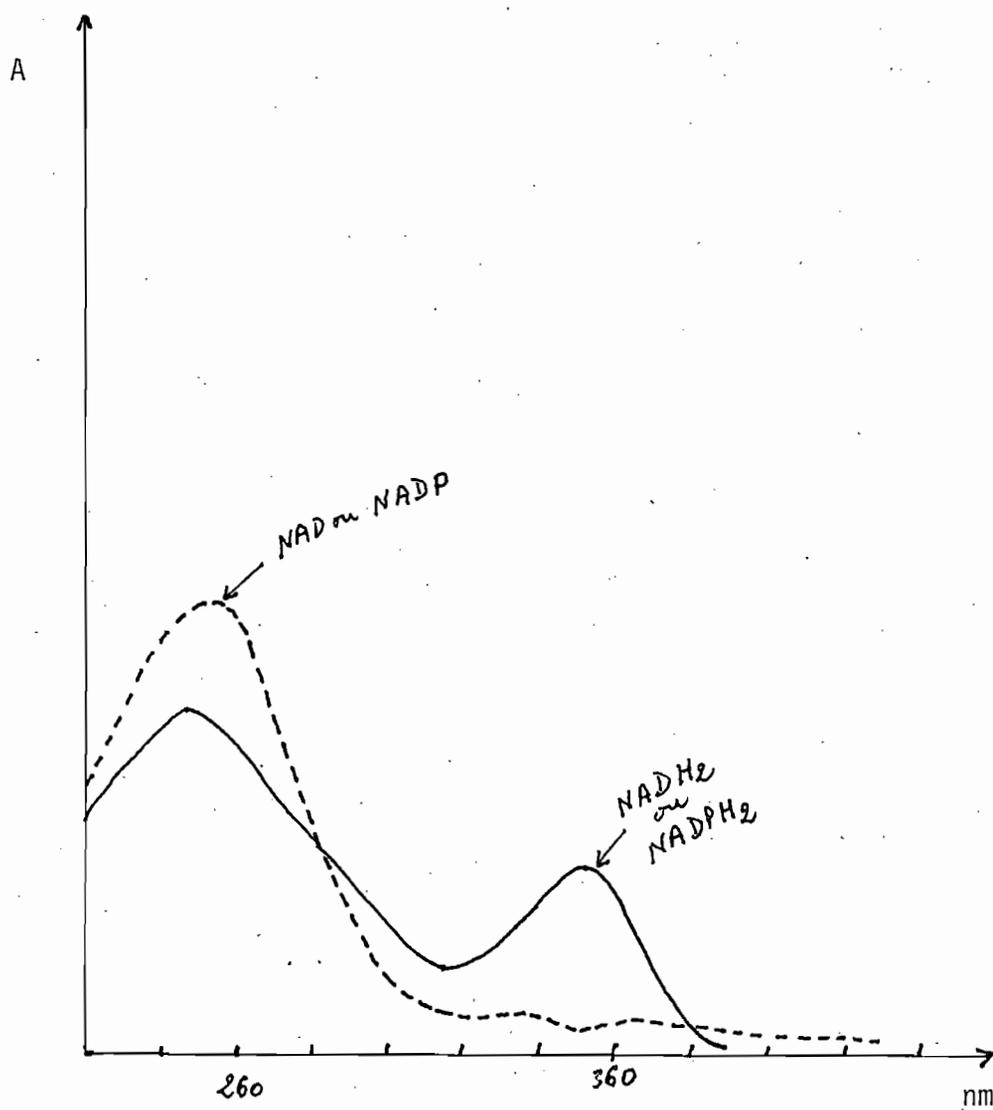
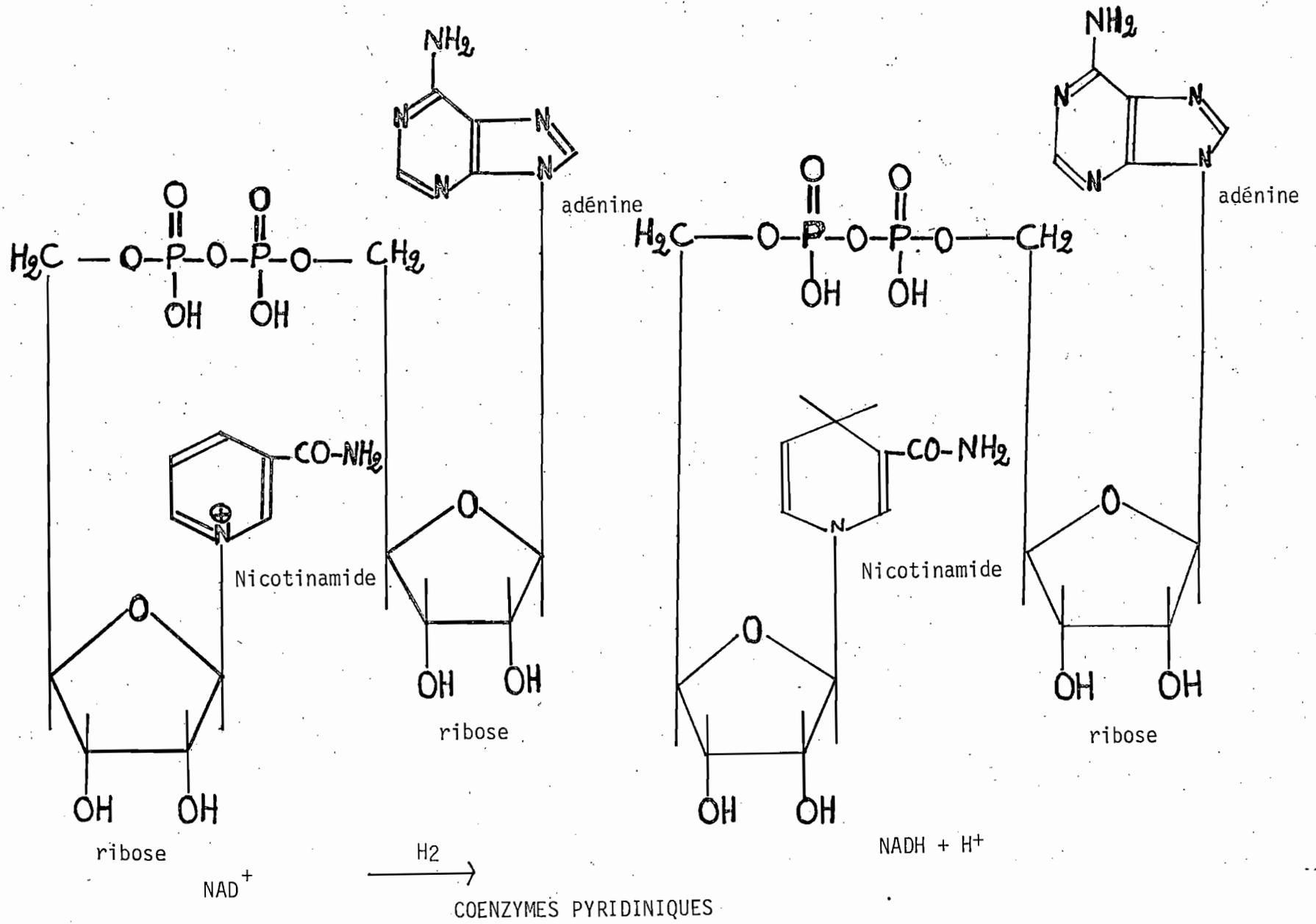
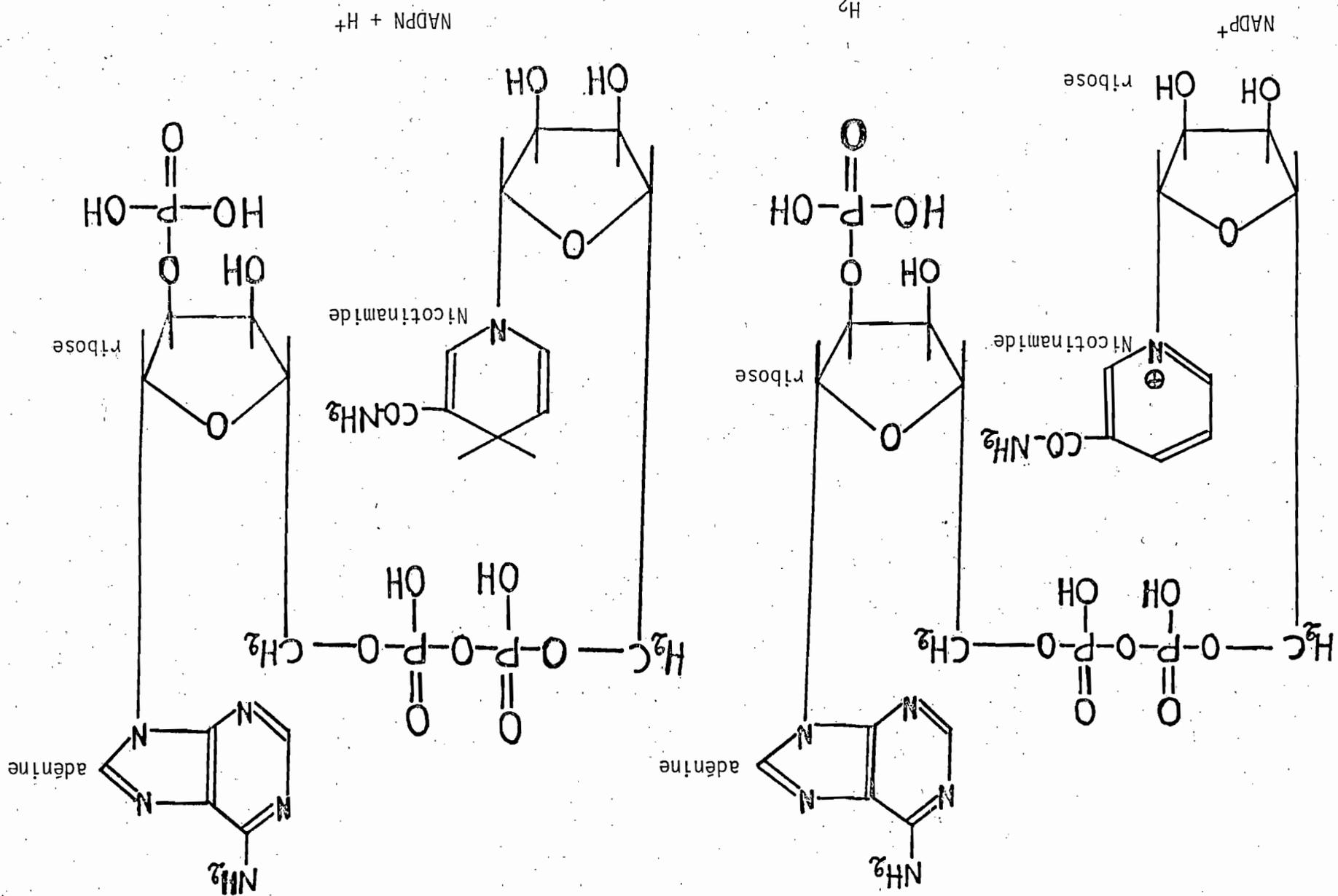


FIGURE 1

SPECTRE D'ABSORBANCE DES NUCLEOTIDES PYRIDINIQUES



COENZYMES : PYRIDINIQUES



NADPN + H⁺

- . la cocaïne inhibe les transaminases.

La personne qui effectue le prélèvement devra vérifier que le malade ne vient pas de prendre un médicament susceptible d'inhiber l'enzyme à doser. Il appartient au biochimiste clinicien d'attirer l'attention du médecin traitant sur cette possibilité. Signalons que ces dosages exigent un matériel particulièrement propre : une verrerie tant soit peu souillée d'acides, d'alcalis, ou de détergents, perturberait gravement les résultats.

2.4. DOSAGE DES ENZYMES LES PLUS COURANTS EN PATHOLOGIE HEPATIQUE

Notre objectif n'a pas été de doser tous les enzymes traduisant une atteinte hépatique, mais de faire uniquement le dosage de ceux qui sont le plus couramment demandés par le clinicien, à savoir :

- . la transaminase glutamique-oxalacétique : GOT ;
- . la transaminase glutamique-pyruvique : GPT ;
- . la phosphatase alcaline : P.alc ;
- . la gamma-glutamyl-transpeptidase : α -GT.

Pour le dosage, on peut utiliser des méthodes conventionnelles ou des méthodes "optimisées". Nous utilisons, dans le laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Nord de Marseille, les méthodes optimisées.

Méthodes conventionnelles : Dans ces méthodes, on se place partiellement dans des conditions réactionnelles non optimales.

Méthodes optimisées : C'est une étape vers la standardisation et l'optimisation des méthodes de détermination des activités enzymatiques. On se place ici dans des conditions réactionnelles optimales :

- . concentrations optimales de substrats et de coenzymes ;
- . pH optimal ;
- . température optimale ;

- . présence d'activateurs et de réactivateurs.

Ainsi, on obtient par ces méthodes, des activités enzymatiques plus élevées. Ces méthodes suivent les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique. Pour cette Société, la température doit être fixée à 25°C.

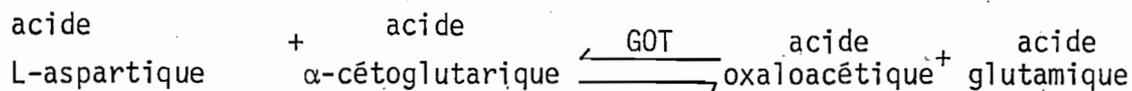
Pour l'instant, de telles recommandations existent pour huit enzymes :

- . GOT ;
- . GTP ;
- . GLDH ;
- . LDH ;
- . α -hydroxybutyrate-déshydrogénase : α -HGDH ;
- . créatine-kinase : CK ;
- . P. a1c.
- . leucine-aminopeptidase : LAP.

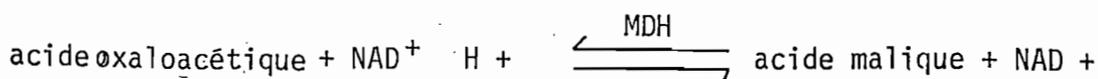
2.4.1. DETERMINATION DE LA GOT PAR LA METHODE CINETIQUE OPTIMISEE SELON LES RECOMMANDATIONS DE LA SOCIETE ALLEMANDE DE CHIMIE CLINIQUE

2.4.1.1. - Principe

La transaminase glutamique-oxalacétique (GOT) catalyse la réaction :



En présence de déshydrogénase malique (MDH) et de NADH, l'acide oxaloacétique est réduit au fur et à mesure de sa formation en acide malique :



2.4.1.2. Réactifs

Concentrations molaires des réactifs dans le test :

tampon phosphate pH 7,4	80 mM
L-aspartate	200 mM
α -cétoglutarate	12 mM
NADH	0,18 mM
MDH	$\geq 0,6$ UI/ml
LDH	$\geq 1,2$ UI/ml

Réactif n° 1 : solution d'acide aspartique 240 mM

Réactif n° 2 substrat lyophilisé

2.4.1.3. Prélèvement

Les sérums ne doivent pas présenter d'hémolyse visible. Les dosages devront être différés le moins possible après le prélèvement, même dans le cas d'une conservation à + 4°C

2.4.1.4. Mode opératoire

Reconstitution du substrat

- . on reprend un flacon de réactif n° 2 porté quelques minutes à 25° C par 2,5 ml de réactif n° 1 à 25°C.
- . on laisse la température de la solution s'équilibrer deux à trois minutes au bain-marie à 25°C.
- . on homogénéise la solution en agitant doucement le flacon.

Stabilité du réactif n° 2 repris :

- 4 heures à température ambiante ;
- 10 heures à + 4°C.

Réaction cinétique

Dans le flacon de substrat reconstitué, on ajoute 0,5 ml de sérum. On mélange en agitant doucement par retournement et on transvase immédiatement dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique. On place la cuve dans le compartiment thermostaté à 25°C du spectrophotomètre réglé à 340 nm.

On attend une minute environ, puis on note l'absorbance de départ:

On détermine la diminution moyenne d'absorbance par minute (n) :

- . soit par lecture directe toutes les 30 secondes pendant 2 à 5 minutes,
- . soit par enregistrement.

2.4.1.5. Calcul

(n) étant la variation moyenne d'absorbance par minute, l'activité GOT en UI/l du sérum est égale à : $(n) \times 964$ UI/l.

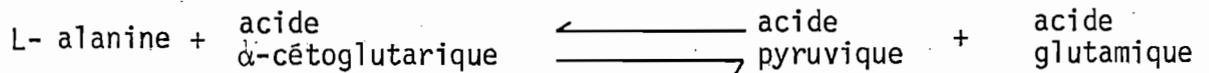
2.4.1.6. Valeurs normales

Activité déterminée à	25oC	30oC	37oC
GOT { hommes	6 à 21 UI/l	9 à 30 UI/l	13 à 46 UI/l
femmes	5 à 18 UI/l	7 à 26 UI/l	11 à 39 UI/l

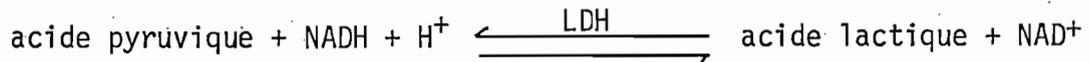
2.4.2. DETERMINATION DE LA GPT PAR LA METHODE CINETIQUE OPTIMISEE SELON LES RECOMMANDATIONS DE LA SOCIETE ALLEMANDE DE CHIMIE CLINIQUE

2.4.2.1. Principe

La transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse la réaction :



En présence de déshydrogénase lactique (LDH) et de NADH, l'acide pyruvique est réduit au fur et à mesure de sa formation en acide lactique :



La détermination de l'activité GOT ou GPT sérique revient à étudier la consommation du NADH en fonction du temps en suivant la baisse d'absorbance à 340 nm. Dans les conditions du dosage, la consommation de NADH est directement proportionnelle à l'activité de GOT ou GPT.

2.4.2.2. Réactifs

Concentration molaire des réactifs dans le test :

tampon phosphate pH 7,4	80 mM
L-alanine	800 mM
α -cétoglutarate	18 mM
NADH	0,18 mM
LDH	≥ 1,2 UI/ml

Réactif n° 1 : solution de L-alanine 960 mM

Réactif n° 2 : substrat lyophilisé

2.4.2.3. Prélèvement

Les sérums ne doivent pas présenter d'hémolyse visible. Les dosages devront être différés le moins possible après le prélèvement, même dans le cas d'une conservation à + 4°C.

2.4.2.4. Mode opératoire

Reconstitution du substrat :

- . on reprend un flacon de réactif n° 2 porté quelques minutes à 25°C. pour 2,5 ml de réactif n° 1 à 25°C.
- . on laisse la température de la solution s'équilibrer deux à trois minutes au bain-marie à 25°C.

Stabilité du réactif n° 2 repris :

- . 4 heures à température ambiante,
- . 10 heures à + 4°C.

Réaction cinétique

Dans le flacon de substrat reconstitué, on ajoute 0,5 ml. de sérum. On mélange en agitant doucement par retournement et on transvase immédiatement dans une cuve en quartz de 1 cm. de trajet optique. On place la cuve dans le compartiment thermostaté à 25°C du spectrophotomètre réglé à 340 nm.

On attend une minute environ, puis on note l'absorbance de départ.

On détermine la diminution moyenne d'absorbance par minute (n) :

- . soit par lecture directe toutes les 30 secondes pendant deux à cinq minutes.
- . soit par enregistrement.

2.4.2.4. Calcul

(n) étant la variation moyenne d'absorbance par minute, l'activité GTP en UI/l de sérum est égale à : $(n) \times 964 \text{ UI/l}$.

2.4.2.6. Valeurs normales

Activité déterminée à	25oC	30oC.	37oC.
GPT } hommes	6 à 33 UI/l	8 à 42 UI/l	11 à 59 UI/l
GPT } femmes	5 à 21 UI/l	6 à 27 UI/l	9 à 37 UI/l

2.4.2.7. Variations pathologiques des transaminases

La mesure de l'activité de la GOT et de la GPT a rendu des services appréciables, en particulier dans le diagnostic différentiel des maladies du foie, du muscle cardiaque et des muscles striés. La mesure peut également servir d'examen complémentaire dans d'autres maladies organiques, comme dans celles des reins (infarctus rénal) et du pancréas, et permettre d'établir l'origine hépatique de tumeurs, d'infections, etc. La GOT et la GPT étant rapidement inactivées dans le plasma, une augmentation d'activité témoigne d'un état aigu.

2.4.2.7.1. *Maladies du foie*

- Hépatite aiguë : dans une lésion parenchymateuse du foie, le taux de GPT dans le sérum est, dans la plupart des cas, supérieur à celui de la GOT. C'est seulement dans les formes graves, nécrosantes, que l'activité de la GOT est supérieure à celle de la GPT.

Une augmentation de l'activité enzymatique commence dès le stade infraclinique pour atteindre, avant même l'apparition d'un ictère, des valeurs élevées. Même dans la forme anictérique (hépatite épidémique), on relève des activités enzymatiques élevées, si bien que le dosage des transaminases constitue une information essentielle sur l'existence éven-

tuelle d'une hépatite. La chute de l'activité enzymatique au stade de la convalescence précède celle de la bilirubine, de même qu'une éventuelle remontée, en cas de récurrence.

Il n'est pas possible de conclure avec certitude à la guérison d'une hépatite par la seule mesure de l'activité des transaminases, des valeurs normales pouvant être enregistrées si la maladie est devenue chronique ou a évolué vers la cirrhose ;

- . hépatite chronique : elle peut se présenter sous différentes formes évolutives avec des activités enzymatiques normales, modérées ou élevées. Des poussées aiguës survenant dans une affection chronique se signalent par une augmentation de l'activité enzymatique. Dans la forme évolutive chronique où les nécroses unicellulaires sont particulièrement importantes, les valeurs de la GOT se situent au-dessus de celles de la GPT ;
- . ictères par occlusion : dans l'occlusion extra-hépatique, les activités des transaminases dans le sérum sont légèrement ou modérément augmentées et il n'existe pas de corrélation entre les taux de bilirubine et de transaminases, la bilirubine étant généralement fortement augmentée dans le syndrome d'occlusion ;
- . hépatite cholestatique : elle peut être d'origine toxique (médicaments, poisons ou autres causes) et se manifeste par des activités enzymatiques moyennes ou élevées, suivant l'étendue des lésions des cellules hépatiques, qui apparaissent plus tard que l'hyper-bilirubinémie ; le taux des GOT est souvent plus élevé que celui des GPT ;
- . cirrhose et stéatose du foie : dans la cirrhose du foie, comme dans l'hépatite chronique, on trouve des activités normales, parfois modérément ou élevées suivant l'importance des crises ; le taux des GOT est alors la plupart du temps supérieur à celui des GPT ;

dans la stéatose hépatique, on trouve des valeurs de transaminases normales, encore que souvent à la limite supérieure de la normale, le taux des GPT étant supérieur à celui des GOT. Ces augmentations traduisent des altérations inflammatoires.

2.4.2.7.2. *Maladies cardiaques*

Quatre à six heures après le déclenchement d'un infarctus du myocarde, on peut constater dans le sang une augmentation de l'activité des enzymes. Ces augmentations sont à peu près proportionnelles à l'étendue de la nécrose cellulaire du muscle, mais elles n'atteignent que des valeurs modérées en raison de la faible étendue de la lésion, comparativement à ce qui se passe dans le foie au cours des affections hépatiques. La GPT ne se trouvant qu'en petites quantités dans le muscle cardiaque, on n'enregistre que peu ou pas d'augmentation. Par contre, la GOT dont la concentration dans le muscle cardiaque est relativement élevée accuse des augmentations d'activité de plusieurs fois la normale. La régression, dans le cas d'une évolution sans complication, intervient au bout de quatre à sept jours ; une remontée traduit des complications.

Le dosage des enzymes permet de distinguer l'infarctus du myocarde d'autres affections cardiaques comme l'angine de poitrine, l'insuffisance coronarienne, la péricardite, l'insuffisance myocardique sans lésion hépatique ou l'infarctus pulmonaire qui provoquent des symptômes semblables. Dans ces dernières affections, on trouve le plus souvent des valeurs normales.

Dans les cas où la GPT accuse une augmentation importante, il faut penser à une stase hépatique.

2.4.2.7.3. *Maladies ou lésions musculaires*

La GOT est plus abondante dans le muscle strié que la GPT.

- dystrophies musculaires de différentes formes : on observe une augmentation de l'activité GOT, surtout au cours des dystrophies

musculaires héréditaires progressives, au début de la maladie. Dans les autres formes, il se produit rarement une augmentation de l'activité de la GOT.

. *Autres affections musculaires*

Dans la dermatomyosite, on enregistre des activités enzymatiques élevées, en particulier pour les deux transaminases.

. *Lésions traumatiques*

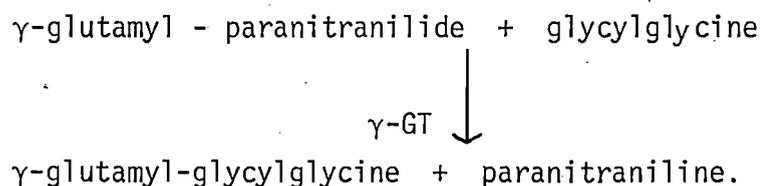
Dans les traumatismes musculaires, quelle que soit leur origine (accidents, opérations), on enregistre parfois de légères augmentations de l'activité GOT.

2.4.3. DETERMINATION CINETIQUE DE LA GAMMA-GLUTAMYL-TRANSPEPTIDASE SELON G. SZASZ

2.4.3.1. Principe

Les gamma-glutamyl-transpeptidases (γ -GT) catalyse le transfert du groupement glutamyl à partir de γ -glutamyl peptides sur d'autres peptides ou acides aminés L.

L'activité γ -GT est mesurée sur le glutamyl paranitroanilide, utilisé comme substrat, en présence de glycyglycine qui joue le rôle d'accepteur de groupement glutamyl. La paranitraniline formée est mesurée à 405 nm. Dans les conditions du dosage, son augmentation est proportionnelle à l'activité γ -GT.



2.4.3.2. Réactifs

Concentration molaire des réactifs dans le test :

γ -glutamylparanitranilide	5 mM
glycylglycine	50 mM
tampons Tris (pH 8,15)	185 mM

Réactif n° 1 : substrat-cé réactif contient la γ -glutamyl paranitranilide et la glycylglycine.

Réactif n° 2 : tampon Tris

2.4.3.3. Prélèvement

Les sérums ne doivent pas présenter d'hémolyse visible. Ils peuvent être conservés une semaine à $+ 4^{\circ}$ ou à $- 20^{\circ}\text{C}$, sans perte sensible de leur activité.

2.4.3.4. Mode opératoire

Reconstitution du substrat

On reprend un flacon de réactif n° 1 par 2,5 ml de réactif n° 2, préalablement porté à 50 ou 60°C . On bouche, on agite jusqu'à dissolution complète, puis on ramène la température de la solution à 25°C dans un bain-marie.

Stabilité du substrat complet : 24 heures à température ambiante.

Réaction cinétique

A un flacon de réactif n° 1 repris, on ajoute 0,25 ml de sérum. On mélange, puis on transfère dans une cuve de 1 cm de trajet optique ; on place immédiatement la cuve dans le compartiment thermostaté à 25°C du spectrophotomètre, réglé à 405 nm.

On attend une minute environ. On note l'absorbance de départ, puis on fait les lectures toutes les 30 secondes pendant 3 minutes ou on enre-

giste la variation de l'absorbance en fonction du temps.

2.4.3.5. Calcul

En utilisant le mode opératoire décrit précédemment, l'activité γ -GT est donnée par la formule suivante :

$$(n) \times 1111 \text{ UI/l à } 405 \text{ nm}$$

(n) étant la variation d'absorbance par minute.

2.4.3.6. Valeurs normales

Activité déterminée à :	25o C	30o C	37o C
γ -GT (hommes)	6 à 24 UI/l	8 à 33 UI/l	11 à 43 UI/l
γ -GT (femmes)	5 à 21 UI/l	7 à 29 UI/l	9 à 37 UI/l

2.4.3.7. Variations pathologiques

Le dosage de l'activité γ -GT présente un grand intérêt en pathologie hépato-biliaire. Les diverses atteintes hépatiques et pancréatiques (le foie alcoolique chronique, les cancers du foie et les obstacles sur l'hépatocolédoque) s'accompagnent toujours d'une élévation plus ou moins importante de son activité.

Sa détermination joue un rôle important dans le dépistage et la surveillance de la cirrhose alcoolique, des métastases hépatiques. Par ailleurs, une hyperactivité allant jusqu'à 50 fois la normale s'observe au cours de processus néoplasiques hépatiques ou pancréatiques.

La γ -GT constitue, avec la transaminase glutamique pyruvique et la

phosphatase alcaline, le trépied du diagnostic enzymologique d'une maladie hépato-biliaire.

→ Valeur moyenne comprise entre 30 et 500 UI/l à 25°C

- . Foie alcoolique : au fur et à mesure de l'aggravation de l'atteinte alcoolique (stéatose, cirrhose compensée, cirrhose décompensée), le taux moyen de γ -GT s'élève progressivement. Toutefois, la présence d'un ictère n'influence pas ces valeurs. Le taux de γ -GT dans le foie alcoolique varie entre 30 et 500 UI/l.
- . Hépatites aiguës : le taux de la γ -GT représente environ 12 fois la normale, alors que pour la GOT, la GPT, l'ornithyl-carbonyl-transférase (OCT), il est respectivement de 15, 16 et 17 fois la normale. Mais l'augmentation de la γ -GT persiste plus longtemps que celle des transaminases.
- . Hépatites chroniques : les formes agressives ont un taux moyen de γ -GT nettement supérieur à celui des hépatites persistantes (236 \pm 132 UI/l contre 96 \pm 137 UI/l).

Dans les hépatites agressives, il y a une élévation parallèle et simultanée de la γ -GT et de l'OCT, alors que, souvent, les transaminases sont normales ou peu élevées.
- . Infections des voies biliaires : le taux de γ -GT est très faiblement augmenté (en moyenne trois fois le taux normal).

→ Valeurs supérieures à 500 UI/l

- . Les nécroses alcooliques aiguës : il y a une élévation très franche de la γ -GT. Parallèlement, on trouve une élévation simultanée de même intensité de l'OCT. Par contre, les transaminases sont normales ou très peu élevées. Il y a présence d'un

ictère. La phosphatase alcaline est normale.

- Les ictères par rétention : lorsque la rétention biliaire est franche, quelle qu'en soit l'étiologie, le taux de γ -GT est en moyenne très élevé (613 UI/l) et correspond à des taux de bilirubine de l'ordre de 105 mg en moyenne (soit 180 μ mol/l).

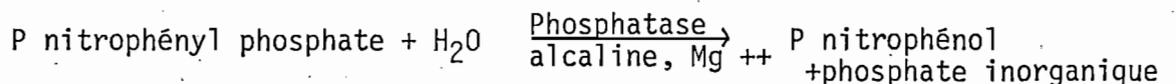
Lorsque la rétention biliaire est incomplète, avec un ictère modéré, les taux moyens de γ -GT sont plus bas (378 UI/l).

- Les cancers métastatiques : on observe une forte élévation, de l'ordre de 300 UI/l (soit 15 fois la normale), surtout dans le cancer secondaire, quoiqu'il soit moins ictérique ; l'élévation de la phosphatase alcaline est environ quatre fois moindre (normale multipliée par 3,5).

2.4.4. DETERMINATION DES PHOSPHATASES ALCALINES PAR LA METHODE CINETIQUE OPTIMISEE SELON LES RECOMMANDATIONS DE LA SOCIETE ALLEMANDE DE CHIMIE CLINIQUE

2.4.4.1. Principe

En milieu alcalin, le paranitrophényl phosphate est scindé, sous l'action des phosphatases alcalines du sérum en présence d'ions Mg^{++} , en paranitrophénol et phosphate. Au pH de la réaction (9,8), le paranitrophénol est coloré en jaune. La vitesse d'apparition du paranitrophénol, que l'on suit par l'augmentation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité phosphatasique du sérum.



2.4.2.2. Réactifs

Concentration molaire des réactifs dans le test :

tampon diéthanolamine (DEA) - HCl, pH 9,8	1 M
paranitrophényl phosphate	10 mM
Mg++	0,5 mM

Réactif n° 1 : tampon diéthanolamine - HCl

Réactif n° 2 : paranitrophényl phosphate.

2.4.4.3. Prélèvement

Les sérums ne doivent pas présenter d'hémolyse visible. Les dosages devront être différés le moins possible, même si la conservation a lieu à + 4°C.

2.4.4.4. Mode opératoire

On reprend un flacon de réactif n° 2 par 10 ml d'eau distillée qu'on ajoute doucement jusqu'à dissolution complète.

stabilité du réactif n° 2 repris :

- . 2 semaines à température ambiante,
- . 2 mois à + 4°C.

On prépare le substrat complet en mélangeant dans les proportions suivantes :

Réactif n° 1	10 parties
Réactif n° 2	1 partie

Stabilité du substrat complet :

- . 3 jours à température ambiante
- . 2 semaines à + 4°C

Dans des tubes à hémolyse on mesure :

- . substrat complet 3 ml
- . sérum 50 µl (0,05 ml).

On mélange par retournement, on introduit dans la cuve thermostatée du spectrophotomètre réglé à 405 nm.

On laisse incuber une minute, puis on note l'absorbance de départ.

On détermine l'augmentation moyenne de l'absorbance par minute (n) :

- . soit par lecture toutes les 30 secondes pendant 2 à 5 minutes
- . soit par enregistrement automatique.

2.4.4.5. Calcul

(n) étant l'augmentation moyenne d'absorbance par minute, l'activité phosphatasique est égale à : $(n) \times 3300$ UI/l de sérum à 405 nm.

2.4.4.6. Valeurs normales

Activité déterminée à	25o C	30o C	37o C
adulte	60 à 170 UI/l	80 à 220 UI/l	100 à 290 UI/l

2.4.4.7. Variations pathologiques

Une diminution, voire une disparition totale de l'activité phosphatasique alcaline du sang s'observe exclusivement dans le cas d'une anomalie métabolique rare et congénitale appelée hypophosphatasie. Le tableau clinique correspond à celui d'un rachitisme résistant à la vitamine D.

Une augmentation de l'activité phosphatasique alcaline du sang est observée au cours des états suivants :

affections osseuses :

toutes les ostéopathies avec accroissement de l'activité des ostéoblastes conduisent à une poussée enzymatique. Parmi les ostéopathies, nous pouvons citer le rachitisme, l'ostéomalacie, l'hyperparathyroïdie, les métastases ostéoblastiques des os (fréquentes en cas de carcinome prostatique, carcinome mammaire, myélome multiple, ostéosarcome) et d'autres affections des os, plus rares (sarcoïdose). La plupart du temps, l'accroissement de l'activité enzymatique est proportionnel à l'étendue de la maladie osseuse ;

affections hépatiques :

en cas d'affections obstructives des voies biliaires, le blocage de l'élimination enzymatique se traduit par un refoulement et, par conséquent, par un accroissement de l'activité enzymatique du sang. Les tableaux chimiques caractéristiques de ce phénomène sont la lithiase du cholédoque, la cholangite, la cholangiolite, la cirrhose et l'hépatite médicamenteuse.

Dans la forme cholangiolitique de l'hépatite, le fort accroissement simultané des activités phosphatasiques alcalines et transaminasiques est pathognomonique.

Dans les hépatites circonscrites (par exemple métastases, infiltrats), l'activité phosphatasique alcaline du sérum s'élève plus tôt que celle de la bilirubine.

En conclusion, la phosphatase alcaline est presque toujours perturbée dans toutes les affections hépatiques, si bien qu'elle n'est pas un test spécifique d'une affection hépatique déterminée ;

. *grossesse*

au cours du dernier trimestre de la grossesse, l'activité phosphatasique alcaline est physiologiquement élevée. En cas d'insuffisance placentaire, une chute précoce de l'activité peut se produire ;

. *cancer* :

chez 3 à 5% des malades atteints de cancer, le sang contient une phosphatase alcaline anormale. Cet iso-enzyme est synthétisé par les cellules cancéreuses (un accroissement de l'activité enzymatique, en cas de cancer, n'est donc pas nécessairement dû à des métastases osseuses ou hépatiques).

2.4.5. ADDENDUM : DOSAGES COMPLEMENTAIRES DE PARAMETRES NON-ENZYMATIQUE

Dosage de la bilirubine totale : Bilirubine Kit et Icto-Trol

Principe

Le dosage de la bilirubine est basé sur la réaction de diazotation (principe de la réaction d'Erlich), en présence d'un révélateur à base de caféine. La lecture se fait en milieu alcalin, ce qui augmente nettement la sensibilité de la réaction.

Réactifs

- . Réactif n° 1 : solution d'acide sulfanilique à 5 g/l.
- . Réactif n° 2 : solution de nitrite de sodium à 1g/l.
- . Réactif n° 3 : caféine, acétate de sodium, benzoate de sodium : réactif révélateur.
- . Réactif n° 4 : solution alcaline.
- . Icto-trol lyophilisé : on reprend un flacon par 3,5 ml d'eau physiologique.

Mode opératoire :

il comporte les manipulations suivantes :

dans les tubes, on met :

	BILIRUBINE TOTALE (BT)		ETALON ICTO-TROL (IT)	
	REACTION	TEMOIN	REACTION	TEMOIN
Réactif No 1	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Réactif No 2	1 goutte	0	1 goutte	0
Icto-trol	0	0	0,2 ml	0,2 ml
Sérum	0,2 ml	0,2 ml	0	0
ON MELANGE LES REACTIFS DANS CHAQUE TUBE				
Réactif No 3	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
ON MELANGE LES REACTIFS DANS CHAQUE TUBE ON LAISSE LES TUBES A LA TEMPERATURE AMBIANTE				
Réactif No 4	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

on mélange ensuite. Après cinq minutes, on lit à 600 nm les absorbances de chaque tube de réaction contre le tube témoin correspondant.

Calcul

Bilirubine totale en $\mu\text{mol/l}$ =

$$\frac{\text{absorbance de la réaction (BT)}}{\text{absorbance de la réaction (IT)}} \times 1,71 \times \text{titre de l'Icto-Trol}$$

Dosage de la bilirubine conjuguée (ou directe) :

bilirubine kit et Icto-Trol.

Principe

La bilirubine conjuguée est dosée par la réaction de diazotation en absence de réactif révélateur.

Réactifs

Réactif n° 1 : solution d'acide sulfanilique à 5g/l

Réactif n° 2 : solution de nitrite de sodium à 1g/l

Réactif n° 3 : caféine, acétate de sodium, benzoate de sodium :
réactif révélateur.

Icto-trol lyophilisé.

Mode opératoire

Réaction colorée : dans des tubes à hémolyse, on réalise les manipulations suivantes : (voir tableau page suivante)

On mélange les réactifs dans chaque tube. On lit les absorbances de chaque tube de réaction contre le tube témoin correspondant. La lecture se fait à 530 nm.

Calcul

Bilirubine directe en μmol =

$$\frac{\text{Absorbance réaction (BD)}}{\text{Absorbance réaction (IT)}} \times 1,71 \times \text{titre de l'Icto-trol.}$$

	BILIRUBINE DIRECTE (BD)		ETALON ICTO-TROL (IT)	
	REACTION	TEMOIN	REACTION	TEMOIN
Réactif No 1	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Réactif No 2	1 goutte	0	1 goutte	0
Réactif No 3	0	0	2,0 ml	2,0 ml
ON MELANGE LES REACTIFS DANS CHAQUE TUBE				
Solution physiol.	2,0 ml	2,0 ml	0	0
ON MELANGE A NOUVEAU DANS LES TUBES				
Icto-Trol	0	0	0,2 ml	0,2 ml
Sérum	0,2 ml	0,2 ml	0	0

Valeurs normales

$\leq 17 \mu\text{mol/l}$ (soit 10 mg/l) pour la bilirubine totale ;
 ≈ 0 pour la bilirubine conjuguée.

Variations pathologiques dans les affections hépatiques

Le plasma normal ne contient pratiquement que de la bilirubine libre.

Ictères par déficit de la glucurono-conjugaison

Ictère physiologique du nouveau-né.

Si l'insuffisance de la glucurono-conjugaison est prolongée, elle peut

entraîner une hyperbilirubinémie importante qui peut avoir des conséquences graves.

Ictères par déficit enzymatique des hépatocytes

On peut ranger dans ce groupe, le syndrome de Crigler-Najjar, qui est une hyperbilirubinémie héréditaire par défaut de glucyronyl-transférase hépatique, évoluant très rapidement vers l'ictère nucléaire. L'hyperbilirubinémie libre est très importante (en moyenne $425 \mu\text{mol/l}$).

Au cours de la maladie de Gilbert, l'hyperbilirubinémie libre est le plus souvent modérée (17 à $35 \mu\text{mol/l}$). Les causes de cette maladie ne sont pas clairement établies. La plupart du temps, cette affection est très bien supportée, au point que les patients ignorent souvent l'anomalie jusqu'à ce qu'elle soit détectée incidemment, à l'occasion d'un bilan biologique incluant le dosage de la bilirubine.

Ictères hépato-cellulaires

Dans la forme bénigne de l'hépatite virale, la bilirubinémie est moyennement augmentée (taux de l'ordre de $170 \mu\text{mol/l}$) au cours des premières semaines ; la bilirubine existe surtout sous forme conjuguée. Il y a une bilirubinurie nette.

L'urobilinurie est un signe précoce, constaté dans la période pré-ictérique. Au cours des formes malignes d'hépatite, le tableau biologique précédent est encore plus nettement perturbé.

Cirrhoses éthyliques

Dans 50 p.100 des cas, il existe une hyperbilirubinémie modérée ($< 150 \mu\text{mol/l}$). Elle est de type mixte, c'est-à-dire que la proportion de bilirubine libre peut représenter entre 20 et 80 p.100 de la bilirubine totale.

Ictères de type cholestatique

L'hyperbilirubinémie est très importante (souvent $> 340 \mu\text{mol/l}$). Elle est principalement de type conjugué ; cependant, il persiste un peu de bilirubine libre. La bilirubinurie est positive. La disparition du stercobilinogène fécal et de l'urobilinurie est la conséquence directe de l'absence de la sécrétion biliaire.

Cancers du foie

Dans les formes ictériques, on observe une hyperbilirubinémie. Le taux est généralement inférieur à $170 \mu\text{mol/l}$ pour les métastases hépatiques ; par contre, il peut être supérieur à $170 \mu\text{mol/l}$ dans les cas de tumeurs primitives exerçant une forte compression.

Dans les formes anictériques, la bilirubinémie est normale.

Hyperbilirubinémies congénitales à bilirubine conjuguée

Ce sont toujours des syndromes bénins.

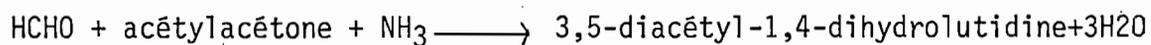
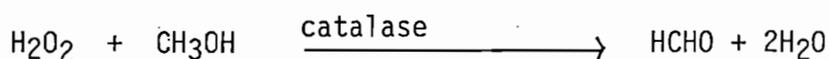
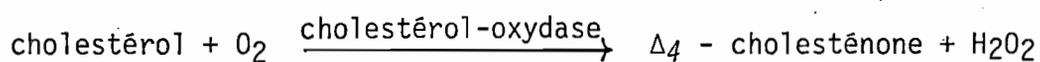
Au cours du Syndrome de Dubin-Johnson, l'hyperbilirubinémie est modérée et fluctuante (généralement entre 34 et $68 \mu\text{mol/l}$) ; elle est surtout de type conjugué. Il existe souvent une bilirubinurie. Le défaut primaire en cause concernerait le mécanisme excrétoire biliaire du foie.

Dans le syndrome de Rotor, il existe également une hyperbilirubinémie de type conjuguée mais moins marquée. La pathogénie pourrait être identique à celle du syndrome précédent.

Dosage du cholestérol total : test colorimétrique enzymatique

Principe

Esters du cholestérol + H_2O $\xrightarrow[\text{estérase}]{\text{cholestérol}}$ cholestérol + acides gras



Réactifs

Solution n° 1 : tampon (phosphate d'ammonium) 0,6 mol/l, pH 7,0
 méthanol/catalase 1,7 mol/l; $\geq 700\text{U/ml}$

Solution n° 2 : acétylacétone, méthanol 0,42 mol/l; 2,5 mol/l
 hydroxypolyéthoxydodécane 2,1 p.100

Solution n° 3 : cholestérol-estérase $\geq 7\text{ U/ml}$

Solution n° 4 : cholestérol-oxydase $\geq 4\text{ U/ml}$

Réactif cholestérol obtenu en mélangeant les solutions 1, 2 et 3 dans les proportions 2500/125/10.

Mode opératoire

Dans des tubes à essai, on réalise les opérations suivantes :

(voir tableau page suivante).

On lit l'absorbance des tubes de réaction contre celle des tubes témoins à 405 nm.

	TEMOIN	ESSAI
Sérum	0,02 ml	0
Réactif cholestérol	5,00 ml	0
ON MELANGE BIEN LE CONTENU DES TUBES		
Solution 4	0	0,02 ml
Prélever du tube témoin	0	2,50 ml
ON MELANGE BIEN, ON INCUBE LE TEMOIN ET L'ESSAI A 37° C PENDANT 60 MINUTES		

Calcul

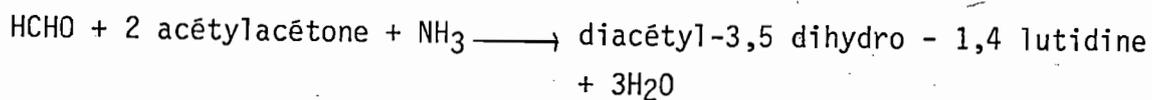
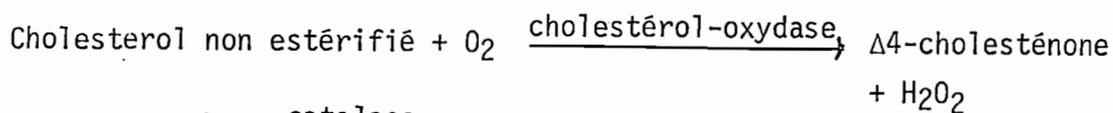
cholestérol en mmol/l = 33,9 x absorbance essai.

Valeurs normales

3,3 à 6,4 mmol/l.

Dosage du cholestérol non estérifié : test colorimétrique enzymatique

Principe



Réactifs

Solution 1 : tampon (phosphate d'ammonium) ... 0,6 mol/l ; pH 7,0
méthanol/catalase 1,7 mol/l ; ≥ 700 U/ml

Solution 2 : acétylacétone/méthanol 0,42 mol/l ; 2,5 mol/l
hydroxypolyéthoxydodécane 2,1 p.100

Solution 3 : cholestérol-estérase ≥ 70 U/ml

Solution 4 : cholestérol-oxydase ≥ 400 U/ml

Réactif 5 obtenu en mélangeant les solutions 1, 2 et 3 dans les proportions 2500/125/10.

Mode opératoire

INTRODUIRE DANS LE FOND DES TUBES A ESSAIS :		
	TEMOIN	ESSAI
Sérum	0,05 ml	0
Solution 5	5,00 ml	0
BIEN MELANGER LE CONTENU DES TUBES		
Solution 4	0	0,02 ml
Prélever du tube témoin	0	2,50 ml
BIEN MELANGER, INCUBER LE TEMOINS ET L'ESSAI A 37° C PENDANT 60 Mn LIRE L'EXTINCTION DE L'ESSAI CONTRE LE TEMOIN : E essai à 405 nm		

Calcul

Concentration (C) du cholestérol dans l'échantillon :

$$C = 13,6 \times E \text{ essai en mmol/l.}$$

$$\underline{\text{Cholestérol estérifié}} = \text{cholestérol total} - \text{cholestérol non estérifié.}$$

Variations pathologiques dans les affections hépatiques

On doit tenir compte à la fois du taux de cholestérol total et de la valeur du rapport $\frac{\text{cholestérol estérifié}}{\text{cholestérol total}}$.

Ce sont des éléments importants de l'exploration du syndrome d'insuffisance cellulaire hépatique.

Au cours de la forme bénigne de l'hépatite virale, le cholestérol est normal, mais le rapport $\frac{\text{cholestérol estérifié}}{\text{cholestérol total}}$ subit une chute passagère au cours de la première semaine de l'ictère. La normalisation se fait rapidement dès la troisième semaine.

Au cours des formes malignes de l'hépatite virale, le cholestérol total est très abaissé et le rapport d'estérification est effondré ($< 0,30$).

Au cours des cirrhoses, on observe des variations dans le même sens, mais plus discrètes.

Au cours d'un syndrome de cholestase avec ictère, l'hypercholestérolémie est fréquente. Le cholestérol estérifié est, par contre, légèrement diminué.

Au cours des formes cholestatiques pures de l'hépatite (notamment hépatite médicamenteuse), on trouve le tableau biologique d'un ictère obstructif, avec hypercholestérolémie.

2.4.6 . VARIATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES DIFFERENTES AFFECTIONS DU FOIE ET DES VOIES BILIAIRES

Les dosages enzymatiques donnent de précieuses indications pour établir le diagnostic et suivre l'évolution de nombreuses maladies.

Le diagnostic est rarement établi à partir d'une seule observation. Les différents paramètres du diagnostic ont des rapports entre eux et leur combinaison conduit à une interprétation précise.

Les taux des activités enzymatiques sériques ne deviennent un instrument précieux que lorsqu'ils sont évalués en fonction de l'observation clinique et d'autres paramètres chimico-cliniques et que leurs interrelations sont étudiées.

Les quotients enzymatiques facilitent l'appréciation et permettent, en liaison avec les taux des activités enzymatiques, la caractérisation des maladies.

L'hépatite virale

Les figures n° 2 et 3 nous montrent l'évolution des enzymes au cours de l'hépatite virale.

Remarques :

on observe très fréquemment une augmentation des enzymes cellulaires sériques avant l'apparition de l'ictère. Lors d'une évolution sans complication, les enzymes dont le taux s'est élevé diminuent après avoir atteint un maximum.

La GPT est généralement plus élevée que la GOT lorsqu'elle est mesurée par le test conventionnel. Elle l'est toujours lorsqu'elle est mesurée par le test optimisé.

Le taux moyen d'augmentation des transaminases durant la première semaine de l'ictère est d'environ 600 UI/l pour la GPT et d'environ

500 UI/l pour la GOT lorsque l'on utilise les méthodes conventionnelles. Les valeurs correspondantes obtenues par les méthodes optimisées se situent aux environs de 1200 UI/l pour la GPT et de 700 UI/l pour la GOT.

Comparées aux taux des transaminases, les activités de la GLDH, de la phosphatase alcaline et de la γ -GT ne sont que faiblement à modérément augmentées lors de l'hépatite virale ordinaire. L'activité de la cholinestérase n'est généralement guère diminuée.

Le quotient GOT/GPT diminue au cours de l'hépatite virale ordinaire, lors de la baisse du taux des transaminases. Il permet ainsi de reconnaître le stade de l'hépatite aiguë.

Le quotient $\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$ n'est jamais inférieur à 30 : il permet la différenciation avec l'ictère par obstruction et avec les tumeurs.

A la guérison, les activités enzymatiques reviennent à la normale. L'enzyme le plus sensible est actuellement la γ -GT, car c'est son taux qui reste élevé le plus longtemps.

Formes particulières d'hépatite virale :

- hépatite anictérique : les modifications des activités enzymatiques et notamment l'augmentation des transaminases constituent souvent son seul indice;
- hépatite virale aiguë cholestatique : il y a de fortes augmentations des transaminases qui, au lieu de diminuer au cours de la deuxième à la troisième semaine de l'ictère, forment un plateau pendant assez longtemps. Aux signes d'une lésion grave des cellules hépatiques viennent s'ajouter ceux de la cholestase avec des activités élevées de la phosphatase alcaline, de la leucine-aminopeptidase (LAP) et de la γ -GT. L'activité de la cholinestérase est, quant à elle, nettement diminuée ;

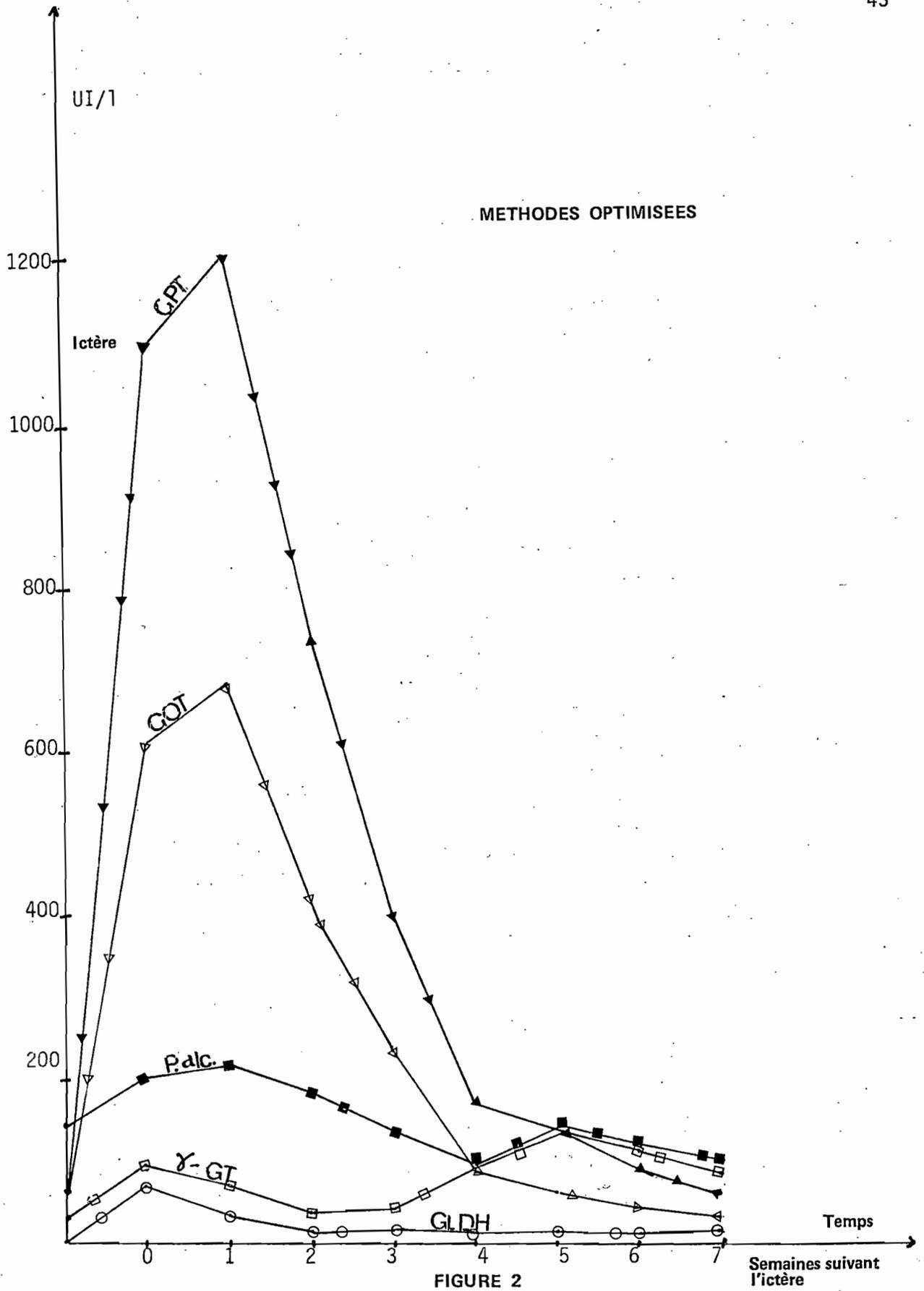


FIGURE 2

EVOLUTION DES ENZYMES AU COURS DE L'HEPATITE VIRALE ICTERIQUE

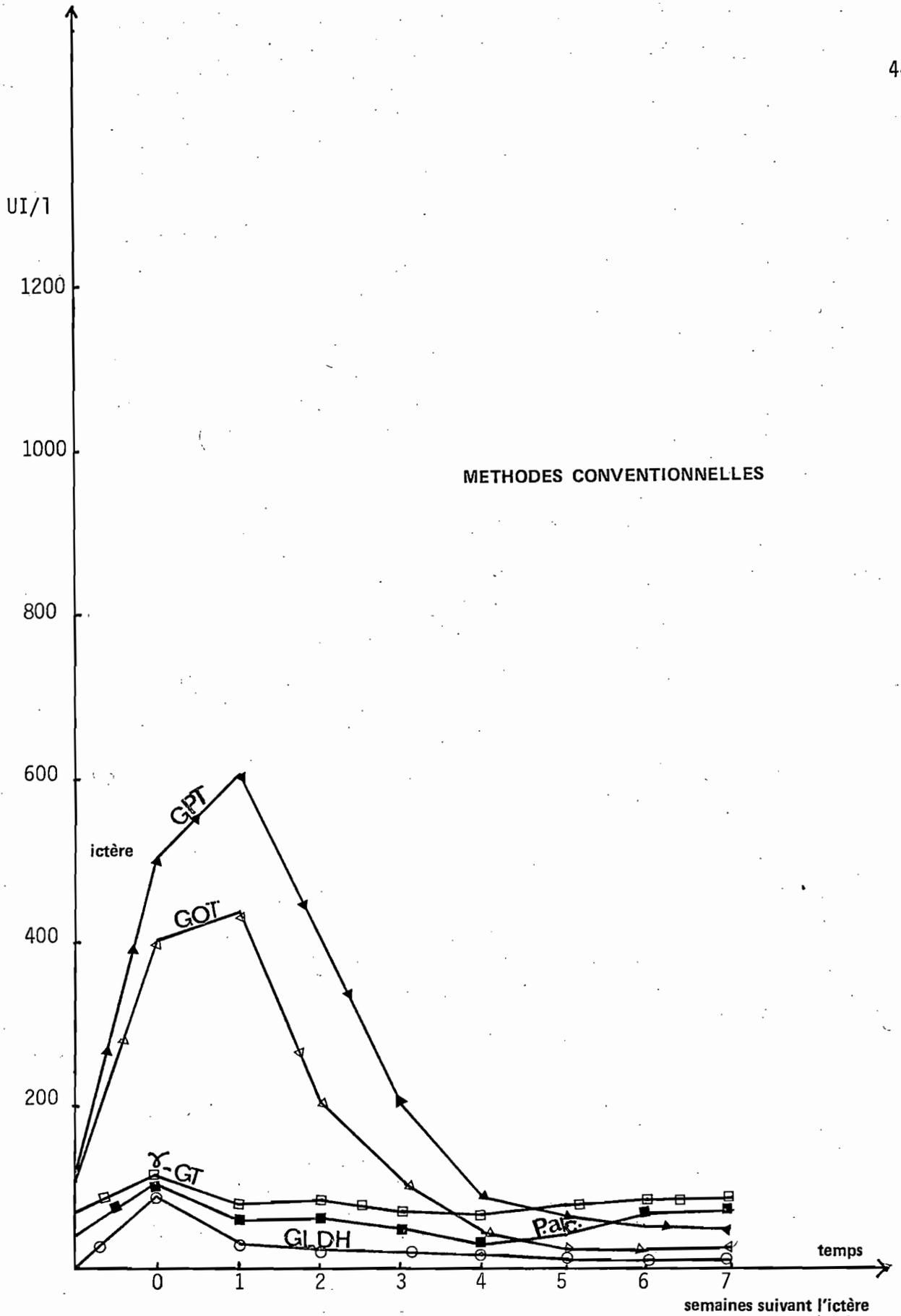


FIGURE 3

EVOLUTION DES ENZYMES AU COURS DE L'HEPATITE VIRALE ICTERIQUE

- hépatite virale nécrosante : il y a souvent des taux d'activité des transaminases particulièrement élevés. Le quotient GOT/GPT est plus élevé que dans l'hépatite sans complication. On note simultanément des taux élevés de la GLDH et de la LDH (lactate déshydrogénase), témoignant d'une lésion cellulaire massive. L'activité de la cholinestérase tombe à des valeurs critiques inférieures à 1000 UI/l.

La γ -GT n'augmente qu'à partir de la phase de régénération et son accroissement est approximativement parallèle à la lente remontée de la cholinestérase.

	VALEURS NORMALES à 25° C	HEPATITE CHRONIQUE	CIRRHOSE HEPATIQUE
GOT	6 à 21 UI/l	75 (90) UI/l	49 (64) UI/l
GPT	6 à 33 UI/l	59 (118) UI/l	22 (45) UI/l
GLDH	≤ 3 UI/l	5,8 (10,8) UI/l	1,5 (3,5) UI/l
γ -GT	6 à 24 UI/l	256 UI/l	102 UI/l
Cholinestérase	2000 à 7000 UI/l	1843 UI/l	1085 UI/l
GOT / GPT	0,63 à 1	≈ 0,8	≈ 2,3
$\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$	13 à 18	≈ 30	≈ 40
γ -GT/GOT	1 à 1,14	≈ 6	≈ 2,5

Valeurs moyennes ; entre parenthèses : méthodes « optimisées »

≈ = Sensiblement égal.

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL ENTRE
HEPATITE CHRONIQUE ET CIRRHOSE HEPATIQUE

Remarques

Nous observons que dans les deux cas, les activités des enzymes sont nettement moins marquées que dans l'hépatite aiguë. Toutefois, dans l'hépatite chronique, les activités des enzymes sont plus élevées que dans la cirrhose hépatique.

Dans l'hépatite chronique c'est l'activité γ -GT qui est la plus élevée, soit 9 à 10 fois la normale. Dans la cirrhose, elle n'est que de 4 fois la normale, tout comme l'activité GOT.

Hépatite chronique agressive et hépatite chronique persistante :

généralement, une hépatite chronique agressive se caractérise par une hyperactivité des deux transaminases : 120 UI/l pour la GOT et 80 UI/l pour la GPT lorsqu'on utilise les méthodes conventionnelles ; lorsqu'on utilise les méthodes optimisées, on a 157 UI/l pour la GOT et 160 UI/l pour la GPT.

Lorsque l'hépatite chronique agressive a une forme moins active, l'hyperactivité de la γ -GT offre une aide précieuse au diagnostic. Le quotient γ -GT/GOT est indépendant du taux absolu des activités enzymatiques ; lors de l'hépatite chronique agressive, il est de deux à quatre fois supérieur à celui de l'hépatite chronique persistante.

	VALEURS NORMALES	HEPATITE CHRONIQUE AGRESSIVE		HEPATITE CHRONIQUE PERSISTANTE	
		Méthodes conventionnelles	Méthodes « optimisées »	Méthodes conventionnelles	Méthodes « optimisées »
GOT	6 à 21 UI/l	120 UI/l	157 UI/l	40 UI/l	45 UI/l
GPT	6 à 33 UI/l	80 UI/l	160 UI/l	50 UI/l	80 UI/l
γ -GT	6 à 24 UI/l	130 UI/l	178 UI/l	30 UI/l	25 UI/l

Il ressort de ce tableau que les activités des enzymes sont plus élevées dans l'hépatite chronique agressive que dans l'hépatite chronique persistante. Dans l'hépatite chronique agressive, c'est l'activité γ -GT qui est la plus élevée, alors que dans l'hépatite chronique persistante, c'est l'activité GPT qui prend la première place.

Diagnostic différentiel entre les lésions hépatiques alcooliques et les inflammations hépatiques d'étiologie différente

La γ -GT est l'enzyme-clé des lésions hépatiques alcoolo-toxiques. Par rapport à celles des autres enzymes, son activité sérique est augmentée plus fortement. La stéatose hépatique alcoolique sans inflammation présente, en corrélation avec l'importance de l'adiposité, des activités des deux transaminases normales ou légèrement supérieures à la normale, une légère augmentation de la GLDH et des valeurs de la γ -GT environ doublées.

L'activité de la cholinestérase est fréquemment supérieure à la normale. Quand une réaction inflammatoire survient, dans ce cas, l'activité de la γ -GT augmente sensiblement plus que celle des transaminases : ceci permet de distinguer l'hépatite chronique due à l'alcool des inflammations hépatiques chroniques d'étiologie différente, même pour un degré d'évolution équivalent, et bien que, dans l'hépatite alcoolo-toxique, l'activité de la cholinestérase se normalise à nouveau au cours de l'inflammation et descende finalement en dessous de la normale.

(voir page suivante, le tableau des valeurs moyennes).

Remarques

Le quotient γ -GT/GOT constitue un élément-clé du diagnostic différentiel. Il est de 13 pour l'hépatite alcoolique, de 1 pour l'hépatite chronique persistante et de 2 pour l'hépatite chronique agressive.

	VALEURS NORMALES à 25o C	HEPATITE ALCOOLO- TOXIQUE	HEPATITE CHRONIQUE PERSISTANTE	HEPATITE CHRONIQUE AGRESSIVE
GOT	6 à 21 UI/l	23 (28) UI/l	43 (54) UI/l	122 (158) UI/l
GPT	6 à 33 UI/l	22 (42) UI/l	44 (90) UI/l	82 (168) UI/l
GLDH	≤ 3 UI/l	2,4 (5,6) UI/l	2,3 (4,3) UI/l	7,7 (17,0) UI/l
γ -GT	6 à 24 UI/l	319 UI/l	31 UI/l	171 UI/l
Cholinestérase	2000 à 7000 UI/l	2096 UI/l	1690 UI/l	1820 UI/l
γ-GT/GOT	1 à 1,14	≈ 13	≈ 1	≈ 2

Valeurs moyennes ; entre parenthèses : méthodes « optimisées »

Diagnostic différentiel de la cirrhose hépatique

	VALEURS NORMALES A 25° C	CIRRHOSE ALCOOLO-TOXIQUE	CIRRHOSE HEPATIQUE
GOT	6 à 21 UI/l	56 (67) UI/l	57 (69) UI/l
GPT	6 à 33 UI/l	24 (47) UI/l	28 (53) UI/l
GLDH	≤ 3 UI/l	1,8 (3,5) UI/l	1,3 (2,7) UI/l
γ-GT	6 à 24 UI/l	200 UI/l	43 UI/l
CHE	2000 à 7000 UI/l	1225 UI/l	1020 UI/l
GOT/GPT	0,63 à 1	≈ 2	≈ 2,5
γ-GT/GOT	1 à 1,14	≈ 3,5	≈ 1

Valeurs moyennes ; entre parenthèses : méthodes « optimisées »

Remarques :

dans la cirrhose éthylique, la γ-GT est la plus élevée, soit 8 à 10 fois la normale. Le quotient γ-GT/GOT est un élément très important pour le diagnostic différentiel de la cirrhose alcoolo-toxique et de la cirrhose hépatique : il est de 3,5 dans le premier cas et de 1 dans le second.

Dans la cirrhose hépatique, ce sont les transaminases qui subissent l'augmentation la plus forte, le rapport GOT/GPT étant par ailleurs plus élevé dans ce cas que dans celui de la cirrhose éthylique.

. Evaluation d'une hépatite éthylique aiguë

Contrairement à ce qui se passe pour l'hépatite virale aiguë, il y a ici, au début de l'affection aiguë, une forte augmentation de la γ -GT et une chute très rapide de la cholinestérase. Cette dernière qui se normalise à nouveau très vite et peut même dépasser ensuite les valeurs normales. La GLDH est moins augmentée que lors de l'hépatite virale. L'augmentation de la GOT est très souvent nettement supérieure à celle de la GPT, de sorte que le quotient GOT/GPT est fréquemment supérieur à 2.

Les poussées aiguës de l'hépatite alcoolo-toxique chronique et de la cirrhose alcoolo-toxique présentent le même tableau que l'hépatite éthylique aiguë, fréquemment accompagnée d'une stéatose du foie. La très forte augmentation de la γ -GT, souvent supérieure à 1000 UI/l, est le phénomène le plus frappant dans le délirium tremens, par contre, les transaminases, la GLDH et la phosphatase alcaline ne sont que modérément augmentées.

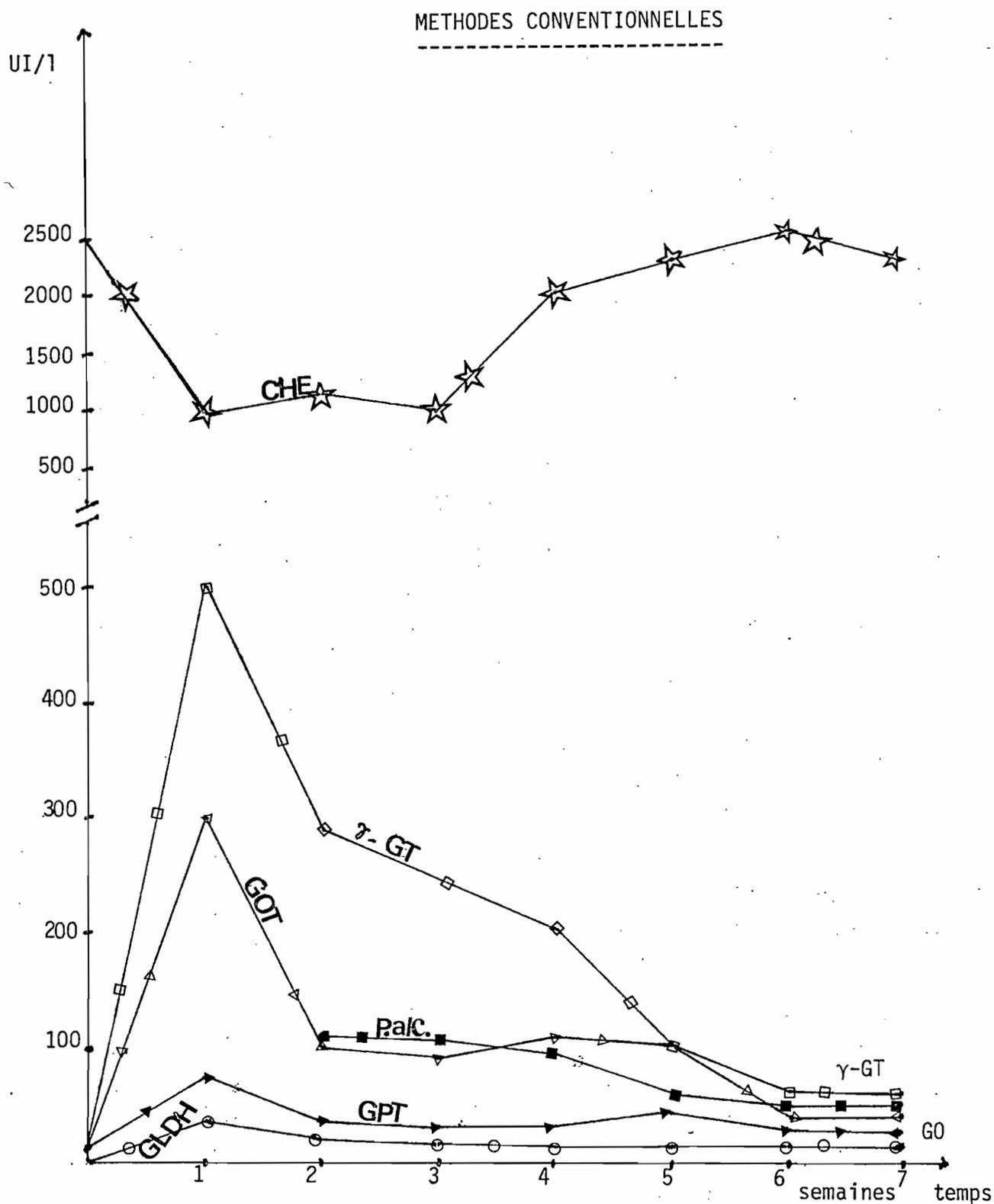


FIGURE 4

EVOLUTION D'UNE HEPATITE ETHYLIQUE AIGUE

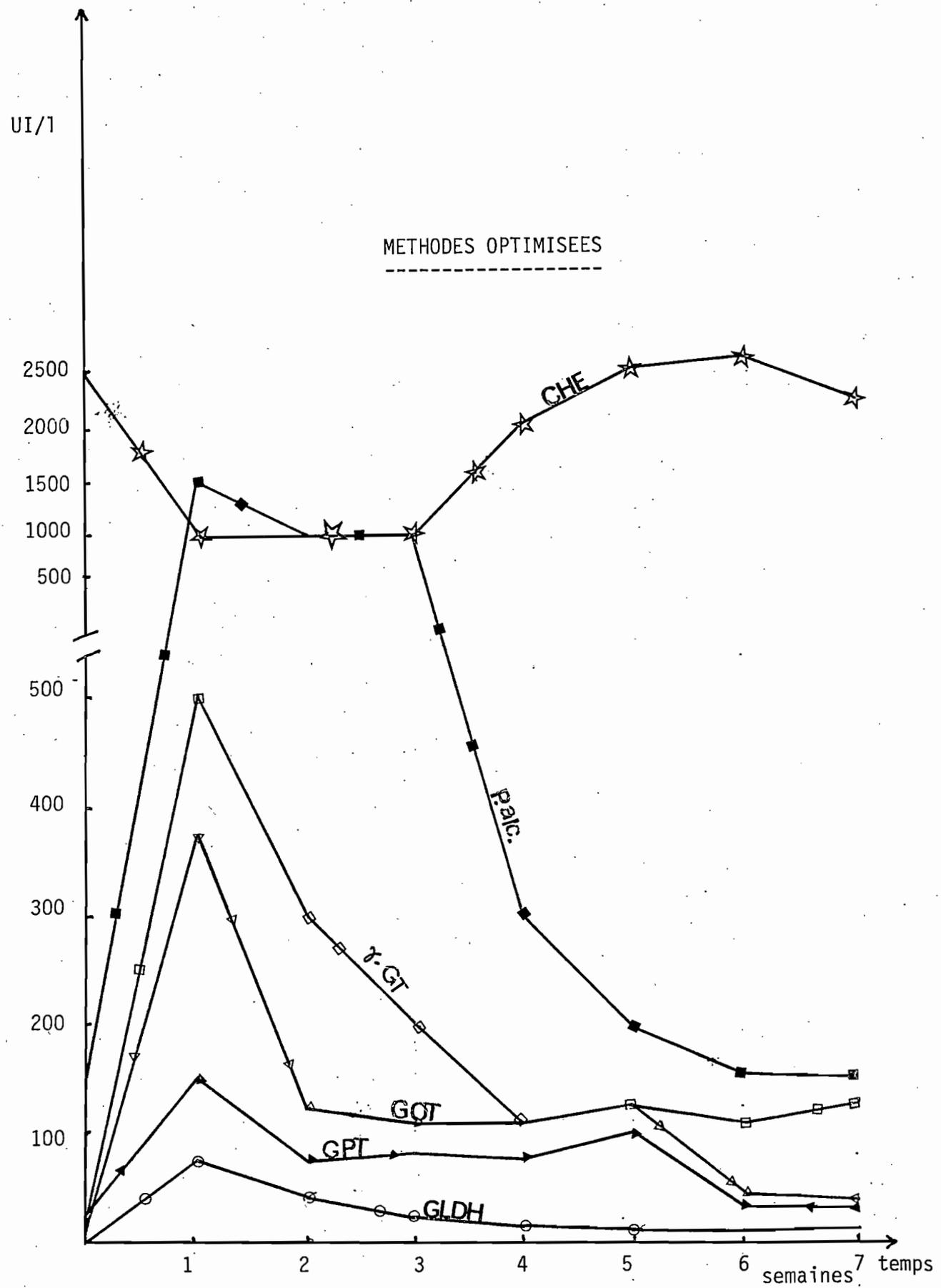


FIGURE 5

EVOLUTION D'UNE HEPATITE ETHYLIQUE AIGUE

Evolution des activités enzymatiques au cours de l'ictère obstructif

L'élévation des activités de la GLDH, beaucoup plus importante que celle des transaminases, constitue le meilleur indice fonctionnel de l'obstruction aiguë du canal biliaire.

Le rapport γ -GT/GOT (ou GPT) permet aussi de distinguer facilement l'obstruction du canal biliaire de l'hépatite virale : il est pratiquement toujours beaucoup plus élevé dans l'ictère par obstruction que dans l'hépatite virale.

Le taux de la phosphatase alcaline est nettement plus élevé dans l'ictère obstructif que dans l'hépatite virale, mais il n'atteint très souvent son niveau caractéristique qu'après la diminution des transaminases et de la GLDH.

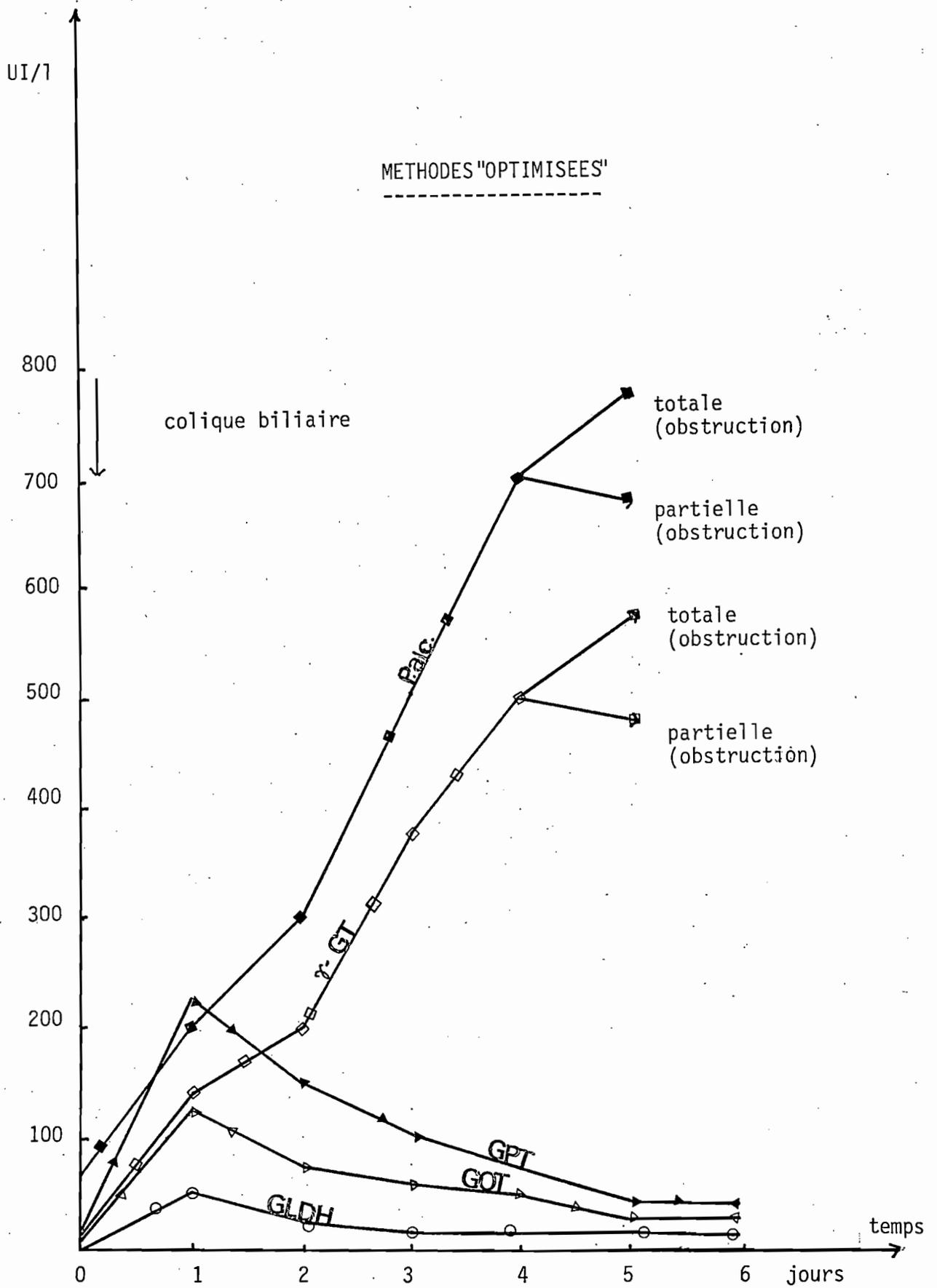


FIGURE 6
EVOLUTION DES ENZYMES AU COURS DE L'ICTERE OBSTRUCTIF

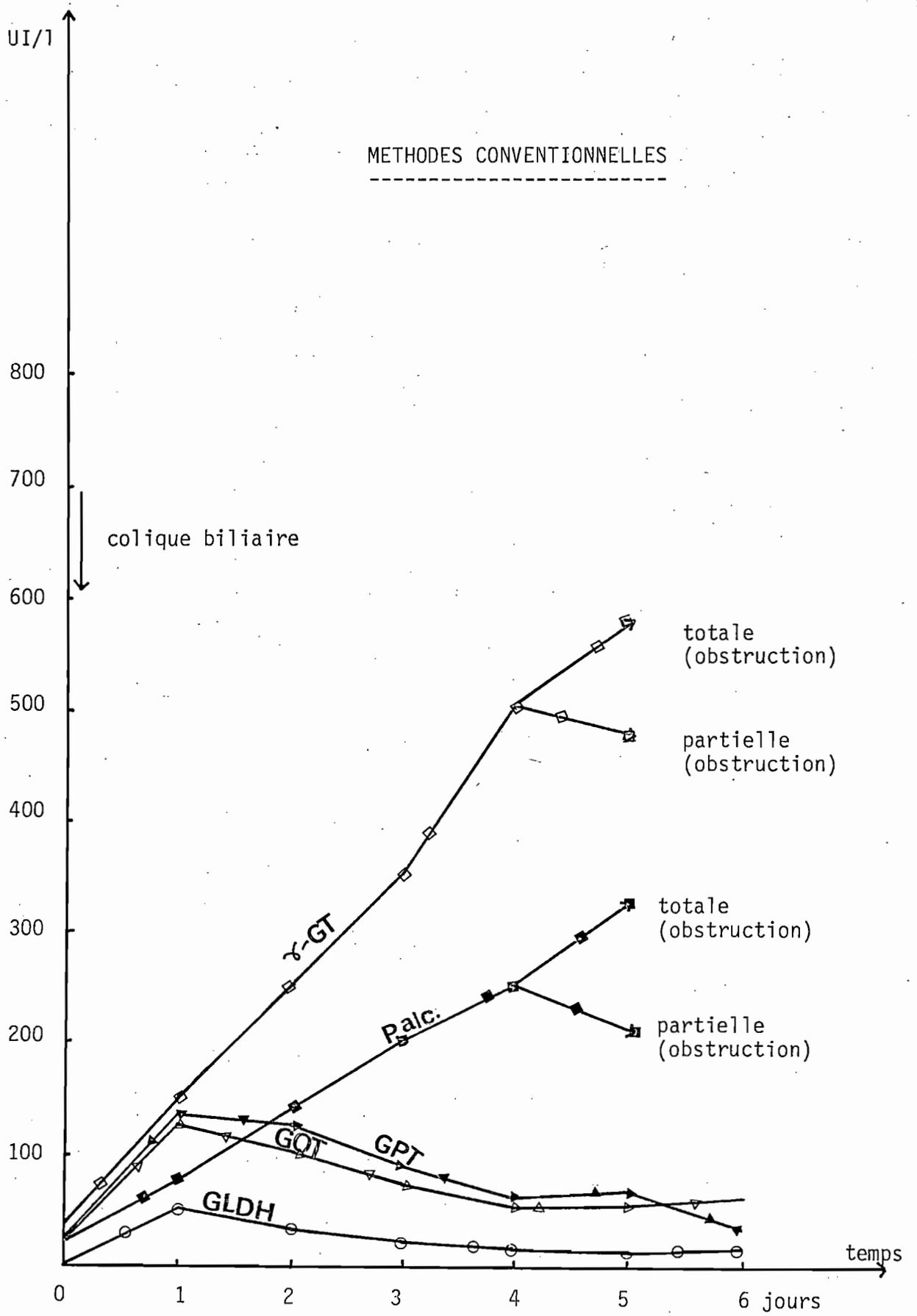


FIGURE 7

EVOLUTION DES ENZYMES AU COURS DE L'ICTERE OBSTRUCTIF

	GOT / GPT	$\frac{\text{GOT+GPT}}{\text{GLDH}}$	γ - GT/GOT
Hépatite virale aiguë	0,1 à 1,0	> 50	2
Hépatite alcoolotoxique aiguë	0,9 à 4,0	> 50	20
Poussée aiguë des affections hépatiques chroniques	dépend du stade	20 à 50	dépend de l'étiologie
Ictère obstructif	0,2 à 2,0	< 20	2
Cirrhoses biliaires	0,6 à 1,8	< 20	5
Métastases hépatiques	0,9 à 5,0	< 15	20

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES AFFECTIONS ICTERIQUES DU FOIE

On peut classer les différents ictères en :

- ictère préhépatique : dans l'ictère hémolytique, il y a une élévation relativement forte de la LDH avec des taux de transaminases normaux ou peu modifiés (rapport LDH/GOT supérieur à 12,5). Dans l'ictère fonctionnel, il n'y a pas d'augmentation de la LDH ; les taux de tous les enzymes sont normaux ;
- ictère hépatique : il se caractérise par une augmentation forte et souvent prolongée des transaminases ; la phosphatase alcaline et la GLDH ne sont que faiblement augmentées.
- ictère posthépatique : l'ictère obstructif mécanique s'accompagne d'une activité des transaminases faiblement à modérément augmentée. On note une forte élévation de la phosphatase alcaline, de la GLDH et de la γ -GT.

Profil enzymatique sérique en cas de métastases hépatiques

On observe une élévation faible à modérée des transaminases. Le rapport GOT/GPT est supérieur ou égal à 2. Il y a une augmentation relativement forte de la GLDH. Le rapport $\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$ est inférieur à 15.

La LDH est fortement augmentée. Le rapport $\gamma\text{-HBDH/LDH}$ est normal. La phosphatase alcaline et la leucine - aminopeptidase sont fortement augmentées. La $\gamma\text{-GT}$ est aussi fortement augmentée, alors que la cholinestérase diminue modérément.

Plus des deux tiers de ces caractéristiques sont observées chez plus de 80% des patients, le plus souvent anictériques, présentant des métastases hépatiques.

Carcinome primaire du foie

Une augmentation lente et continue de la GLDH, de la LDH, de la LAP et plus marquée de la $\gamma\text{-GT}$ dans le sérum indique l'existence d'un carcinome primaire du foie. La cholinestérase, déjà diminuée, tombe à des valeurs de plus en plus basses ; le quotient GOT/GPT dépasse 2 et le quotient $\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$ tombe souvent au-dessous de 20.

Si ces modifications s'accompagnent d'une nette augmentation des $\gamma\text{-foeto-protéines}$ sériques, l'existence d'un carcinome primaire du foie est beaucoup plus vraisemblable qu'une poussée de cirrhose avec importante cholostase concomitante.

III^{ème} PARTIE

RESULTATS
ET DISCUSSION

Nous avons obtenu ces résultats à partir de quelques malades hospitalisés dans le Service de Gastro-Entérologie dirigé par le Professeur SALDUCCI, à l'Hôpital Nord de Marseille.

Ces malades ont été suivis pendant la période allant du 7 Octobre au 30 Novembre 1981. Chez ces malades, nous avons effectué le dosage des enzymes suivants :

- . GOT
- . GPT
- . γ -GT
- . P. alc.

Nous avons dressé, pour chaque malade, un tableau récapitulatif avec les données duquel nous avons tracé les courbes correspondant à chacun des paramètres, puis nous avons tenté d'interpréter les résultats et nous avons confronté nos hypothèses au diagnostic clinique formulé dans le dossier médical que nous avons pu consulter, grâce à l'obligeance du chef de service.

Le dosage a été fait suivant les méthodes précédemment décrites. Nous avons comparé les résultats des dosages enzymatiques à ceux de paramètres non-enzymatiques pouvant aider à établir le diagnostic, comme la bilirubine et le cholestérol.

Nous présentons nos résultats sous trois rubriques :

- A - Syndromes caractérisés par une forte augmentation des transaminases : cas de Richard P. (cas n° 1), de Enzo B. (cas n° 2), et de Pierre M (cas n° 3).

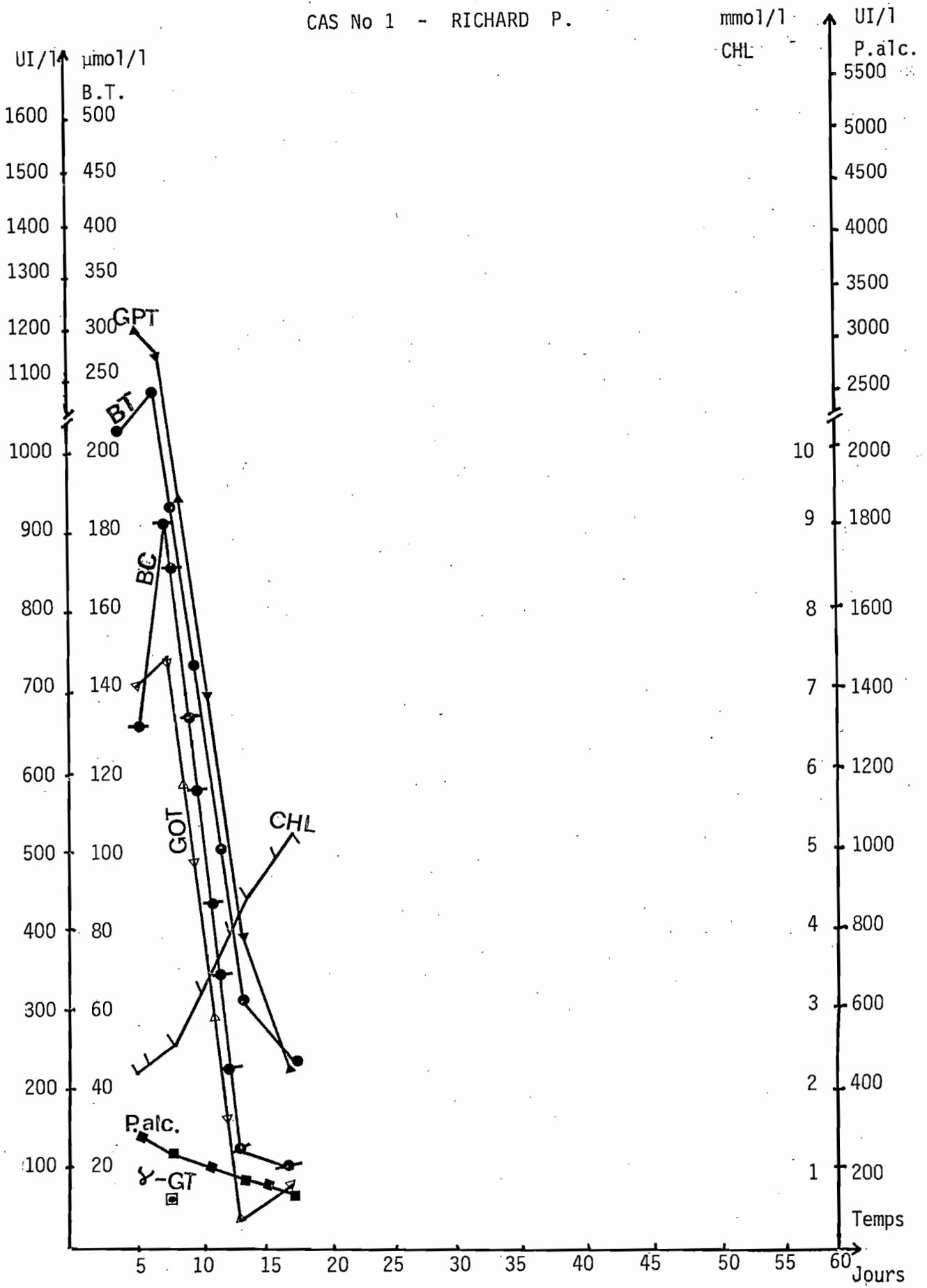
- B - Syndromes caractérisés par une très forte augmentation de la phosphatase alcaline et de la γ -glutamyl-transpeptidase avec accroissement concomitant du taux de la bilirubine et parfois du cholestérol : cas de Lucien M. (cas n° 4), de Raymond M. (cas n° 5), de Germaine S (cas n° 6) et d'Elise T. (cas n° 7).
- C - Syndrome caractérisé par une augmentation modérée des quatre enzymes, sans augmentation de la bilirubine et du cholestérol : (cas de Pascal C. (cas n° 8).

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème A

CAS No 1

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ-GT UI/l	BIL. TOT. μmol/l	BIL. CONJ. μmol/l	CHOLEST. mmol/l
RICHARD P.	5/10/81	712	1 205	275	non dosé	228	130	2,2
	6/10/81	748	1 162	246	60	241	188	2,5
	13/10/81	37	388	186	non dosé	62	27	4,43
	17/10/81	75	225	182	non dosé	45	24	5,2

CAS No 1 - RICHARD P.



CAS N° 1 : RICHARD P.

Les transaminases sont très élevées.

La GOT atteint son maximum à 748 UI/l (soit 40 fois la normale).

La GPT atteint son maximum à 1205 UI/l (soit 60 fois le taux de base).

Le rapport GOT/GPT est donc inférieur à 1.

La phosphatase alcaline est faiblement élevée.

La bilirubine totale est très élevée et constituée en majorité par la forme conjuguée (188 $\mu\text{mol/l}$).

Les différentes courbes évoluent dans le même sens à part le cholestérol qui augmente progressivement tandis que les autres paramètres diminuent.

Ce syndrome biologique correspond bien à celui de l'hépatite virale ictérique (figures 2 et 3), ce que confirme le diagnostic clinique.

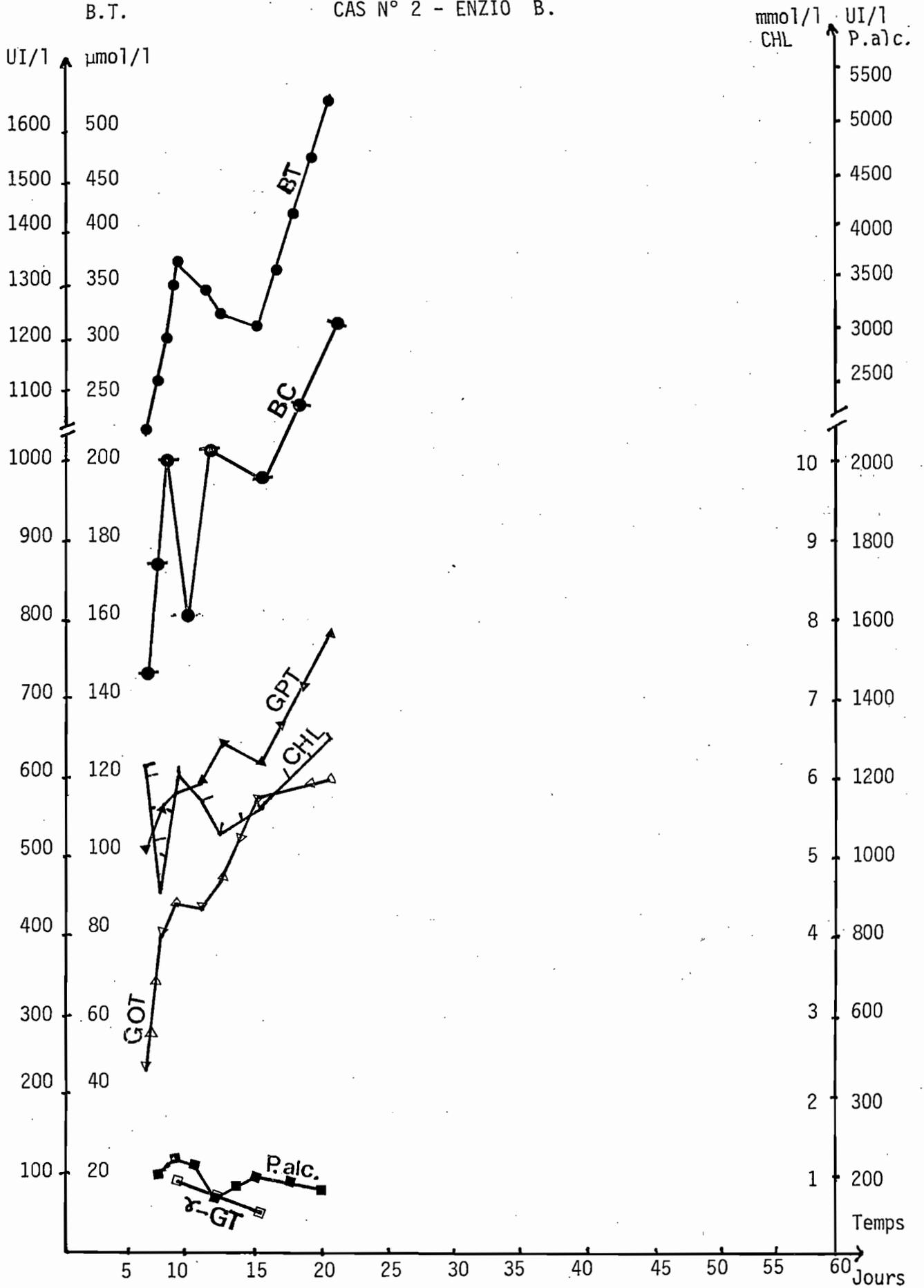
SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème C

CAS No 2

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ-GT UI/l	BIL. TOT. μ mol/l	BIL. CONJ. μ mol/l	CHOLEST. mmol/l
ENZIO B.	6/10/81	225	500	non dosée	non dosée	228	145	6,15
	7/10/81	394	562	190	92	300	non dosée	4,7
	8/10/81	432	579	221	non dosée	371	200	6,00
	10/10/81	423	597	213	non dosée	345	160	5,71
	12/10/81	457	638	177	non dosée	320	215	5,3
	15/10/81	566	617	194	56	309	197	5,6
	20/10/81	596	778	183	non dosée	530	342	6,54

B.T.

CAS N° 2 - ENZIO B.



CAS N° 2 - ENZIO B.

Les transaminases sont nettement augmentées, mais moins que dans le cas n° 1.

La GOT atteint son maximum à 596 UI/l (soit 31 fois la valeur normale).

La GPT est encore plus élevée : elle atteint son maximum à 778 UI/l (soit 32 fois la normale).

Le rapport GOT/GPT reste inférieur à 1.

La bilirubine totale est très élevée, davantage que précédemment, soit un maximum de 530 $\mu\text{mol/l}$.

La γ -GT et la phosphatase alcaline sont faiblement augmentées.

L'évolution des enzymes et des paramètres non-enzymatiques subit à peu-près les mêmes variations, le cholestérol s'alignant davantage sur les autres paramètres que précédemment.

Ce schéma rappelle le cas n° 1 avec des enzymes moins augmentés et des paramètres non-enzymatiques plus élevés. Il semble correspondre à un syndrome d'hépatite aiguë ictérique dans sa phase ascendante.

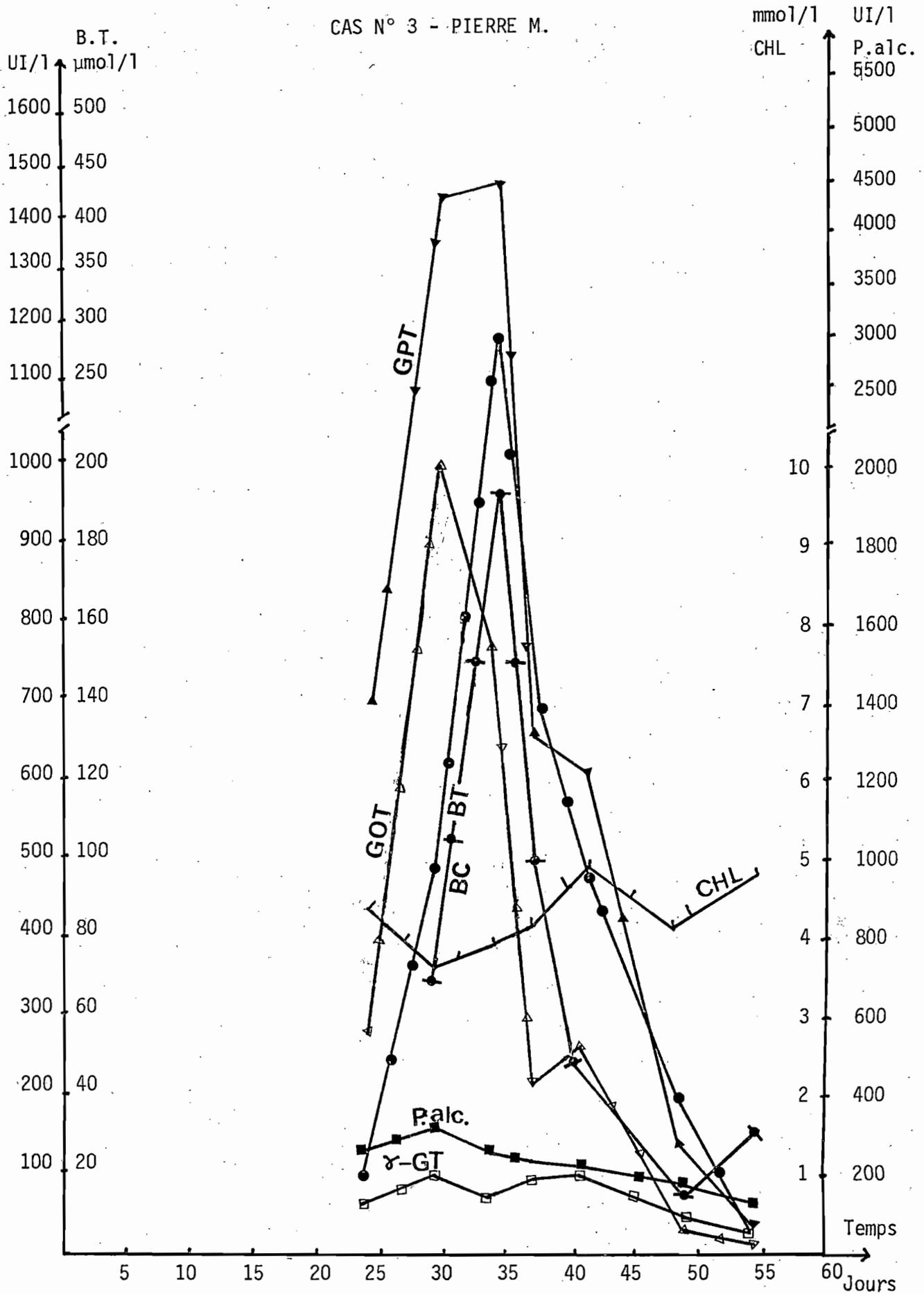
Le diagnostic porté dans le service de gastroentérologie est celui d'hépatite alcoolique aiguë. L'étiologie alcoolique nous a surpris dans la mesure où les valeurs de la γ -GT sont restées basses.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème B

CAS No 3

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ-GT UI/l	BIL. TOT. μ mol/l	BIL. CONJ. μ mol/l	CHOLEST. mmol/l
PIERRE M.	24/10/81	276	707	238	74	18	non dosée	4,2
	29/10/81	990	1 450	306	105	98	68	3,5
	3/11/81	775	1 470	257	82	295	194	3,8
	7/11/81	216	661	233	102	149	98	4,1
	11/11/81	266	621	228	124	95	49	4,7
	18/11/81	33	139	171	55	49	17	4,1
	24/11/81	17	34	124	30	32	30	4,7

CAS N° 3 - PIERRE M.



CAS n° 3 - PIERRE M.

Nous observons chez ce patient une élévation très nette des transaminases.

La GPT atteint jusqu'à 1470 UI/l et la GOT jusqu'à 990 UI/l. Le rapport GO/GP est inférieur à 1.

La phosphatase alcaline et la γ -GT sont augmentées modérément.

La bilirubine totale est élevée et se trouve essentiellement sous la forme conjuguée.

On remarque qu'au premier du dosage, les transaminases sont déjà très élevées (GOT : 276 ; GPT : 707) alors que la bilirubine totale reste dans des limites acceptables (18).

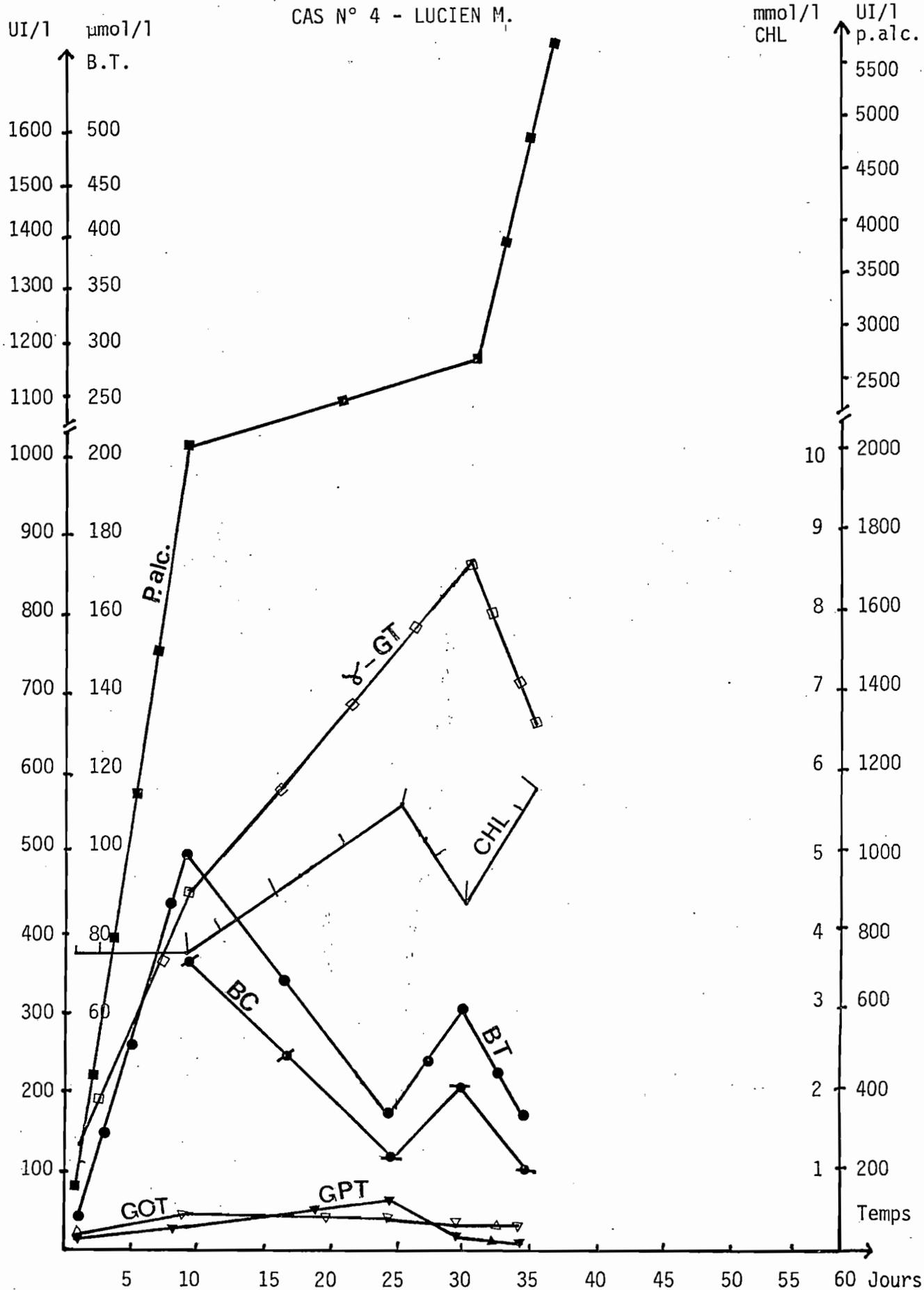
Le cas n° 3 ressemble beaucoup au cas n° 1 et nous portons le même diagnostic, qui est confirmé par la clinique. Il illustre parfaitement la donnée classique qui présente l'élévation des transaminases comme un élément de diagnostic précoce car elle se manifeste avant l'apparition de l'ictère.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème A

CAS No 4

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ-GT UI/l	BIL. TOT. μmol/l	BIL. CONJ. μmol/l	CHOLEST. mmol/l
LUCIEN M.	1/10/81	18	17	151	146	6	non dosé	3,6
	9/10/81	44	37	2 045	456	98	76	3,6
	24/10/81	43	45	non dosés	769	35	23	5,5
	29/10/81	42	34	2 740	883	61	41	4,2
	4/11/81	42	28	5 940	673	34	20	5,62

CAS N° 4 - LUCIEN M.



CAS N° 4 - LUCIEN M.

La phosphatase alcaline atteint des valeurs considérables : jusqu'à 5940 UI/l (soit 39 fois la normale).

La γ -GT est également très augmentée : elle atteint 883 UI/l (soit 33 fois la normale).

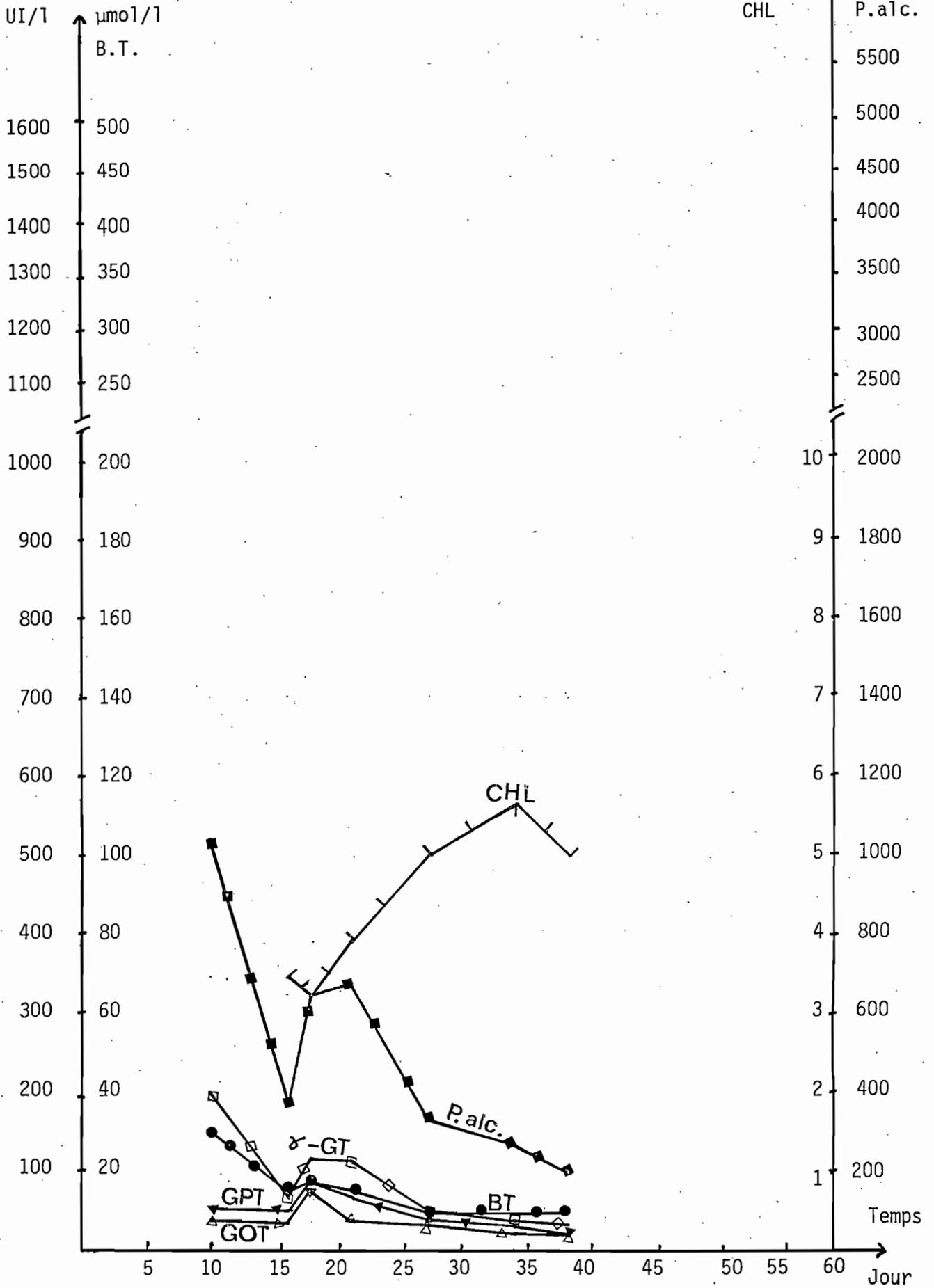
Par contre, les transaminases sont normales ou faiblement élevées. Quant à la bilirubine, elle reste dans des valeurs modérées (2 à 5 fois la normale).

Le dossier médical indique que ce patient présente un envahissement métastatique massif du foie par un adéno-carcinome, ce qui est parfaitement en accord avec les données précédentes.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème A

CAS No 5

NOM	DATE	GOT UI/I	GPT UI/I	P.A. UI/I	γ-GT UI/I	BIL. TOT. μmol/l	BIL. CONJ. μmol/l	CHOLEST. mmol/l
RAYMOND M.	10/10/81	40	62	1 067	199	29	non dosée	non dosé
	16/10/81	39	53	378	74	14	non dosée	3,5
	18/10/81	83	89	651	107	16	non dosée	3,2
	21/10/81	40	76	692	104	14	non dosée	3,9
	27/10/81	35	40	330	56	10	non dosée	5,0
	3/11/81	15	22	248	40	10	non dosée	5,7
	7/11/81	14	14	192	28	11	non dosée	5,0



CAS N° 5 - RAYMOND M.

Nous observons une légère augmentation des transaminases.

La bilirubine et le cholestérol sont pratiquement normaux.

La phosphatase alcaline est élevée, elle atteint 1067 UI/l ; la γ -GT l'est beaucoup moins (entre 2 et 4 fois le taux de base).

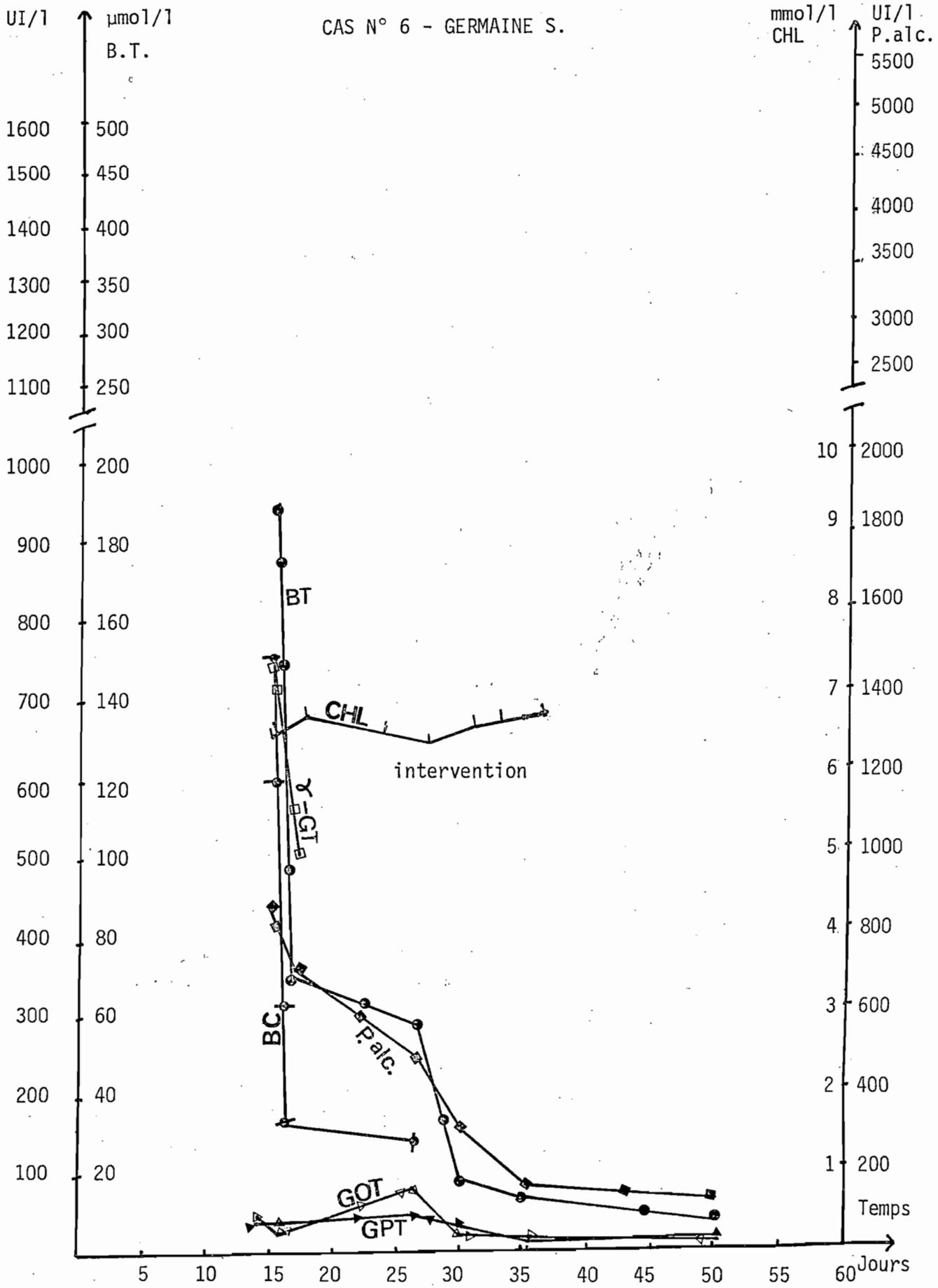
Le dossier médical suggère la migration d'un calcul vésiculaire avec cholécystite à minima chez un sujet de 82 ans.

En présence de ce diagnostic, le taux de bilirubine nous semble exceptionnellement bas.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème C

CAS No 6

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ -GT UI/l	BIL. TOT. μ mol/l	BIL. CONJ. μ mol/l	CHOLEST. mmol/l
GERMAINE S. Intervention	14/10/81	39	28	837	739	190	151	6,4
	16/10/81	25	28	689	516	69	36	6,7
	27/10/81	91	56	445	non dosée	57	32	6,3
	29/10/81							
	30/10/81	16	22	274	non dosée	21	non dosée	6,58
	6/11/81	11	12	162	non dosée	15	non dosée	6,7
	21/11/81	14	12	115	51	9	non dosée	non dosée



CAS N° 6 - GERMAINE S

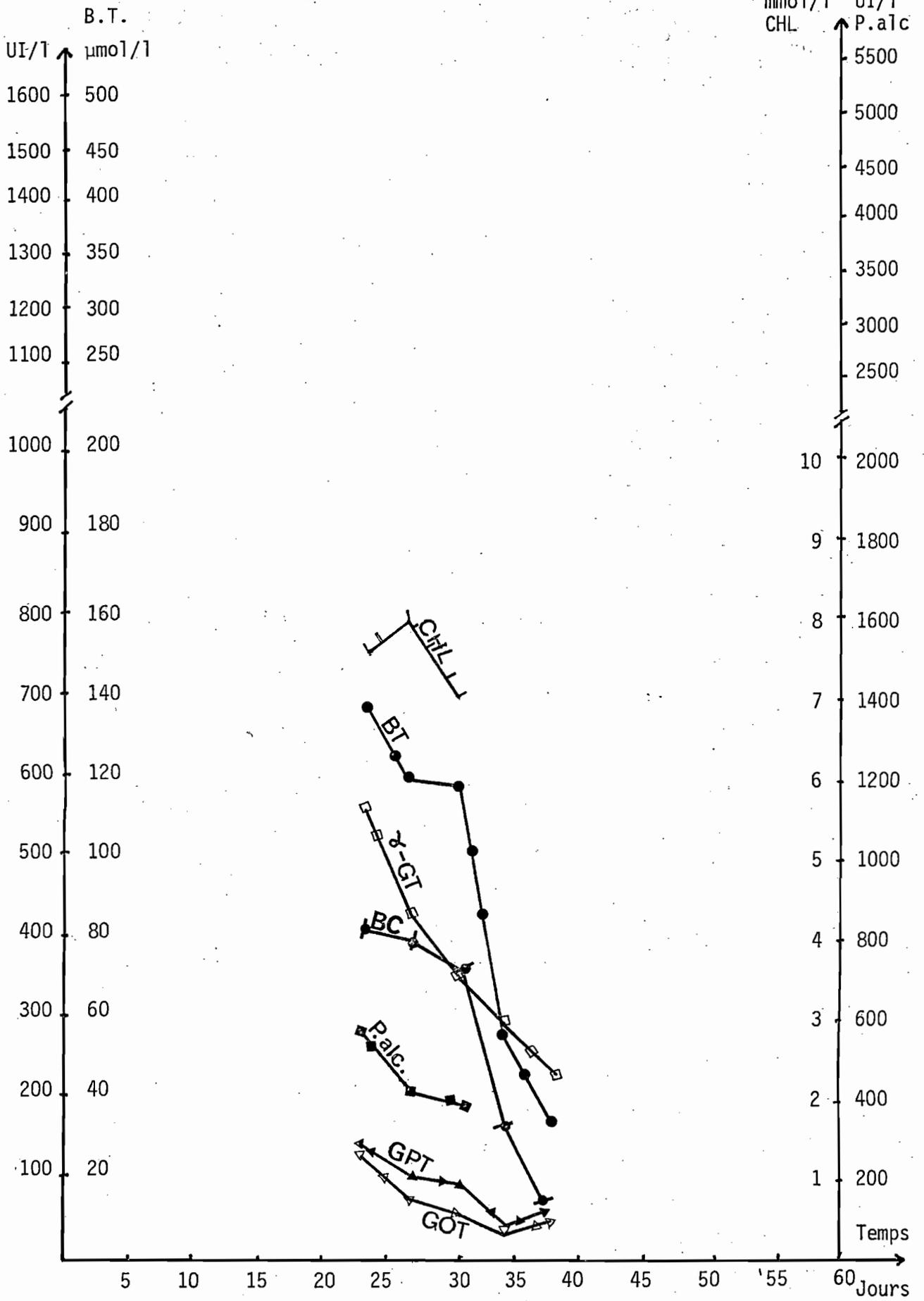
A part le cholestérol qui évolue peu, les autres paramètres accusent une baisse régulière à partir de valeurs généralement élevées au départ. On semble assister à la fin d'une cholostase. C'est effectivement ce que révèle le dossier médical : il s'agit d'une malade atteinte d'ampulome vaterien d'origine maligne sur lequel on a procédé à une duodéno pancréatectomie.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème A

CAS No 7

NOM	DATE	GOT UI/l	GPT UI/l	P.A. UI/l	γ -GT UI/l	BIL. TOT. μ mol/l	BIL. CONJ. μ mol/l	CHOLEST. mmol/l
ELISE T	23/10/81	118	139	556	559	137	81	7,6
	27/10/81	71	93	408	425	119	79	7,9
	31/10/81	57	81	382	346	117	71	7,0
	3/11/81	30	52	non dosée	296	54	33	non dosé
	7/11/81	47	54	324	231	36	13	6,7

CAS No 7 : ELISE T.



CAS N° 7 - ELISE T.

Ce cas rappelle assez le précédent dans l'évolution des paramètres biologiques.

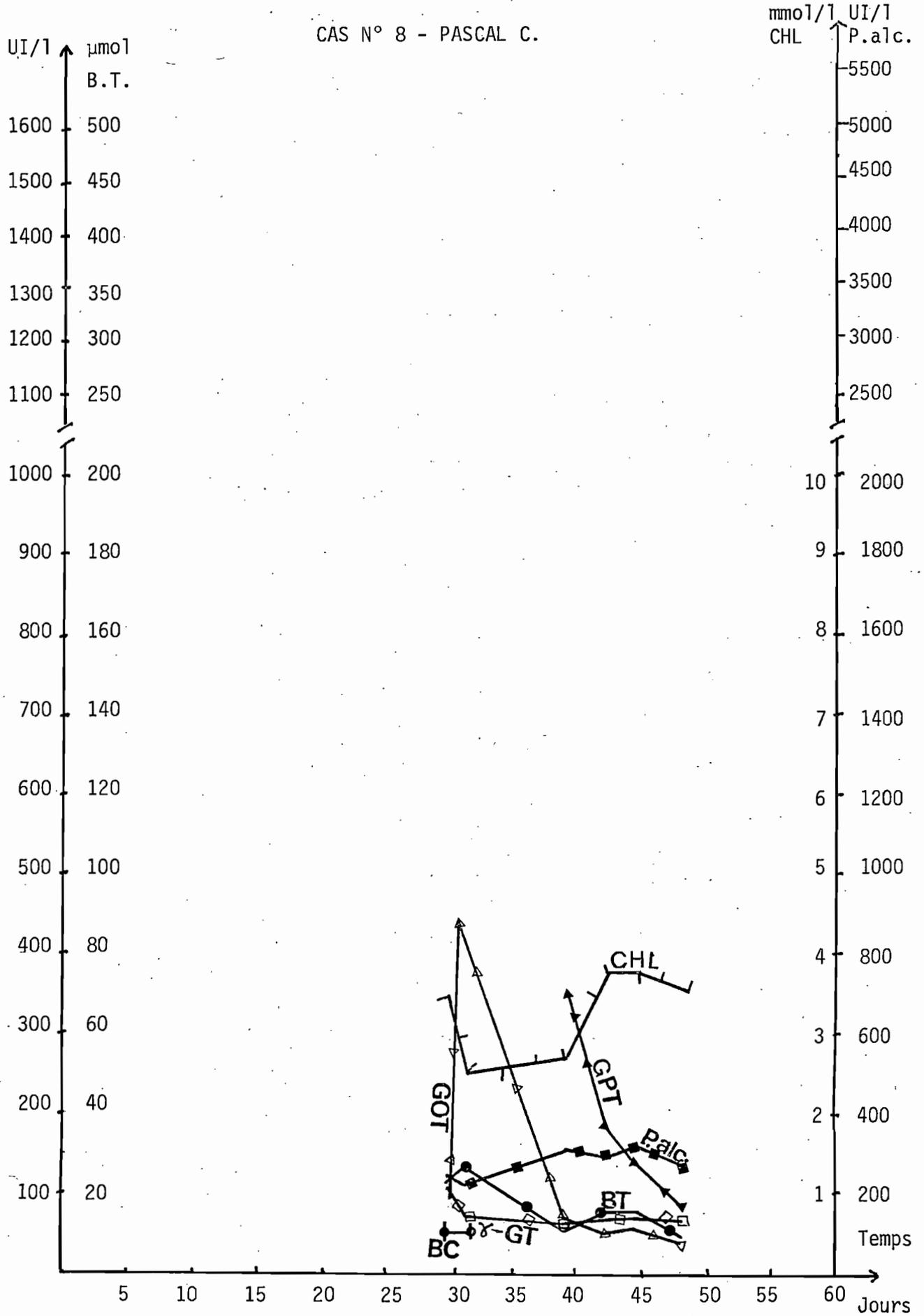
Le dossier médical nous apprend qu'il s'agit de l'élimination d'un calcul de la voie biliaire principale.

SERVICE : Professeur SALDUCCI - 9ème B

CAS No 8

NOM	DATE	GOT UI/I	GPT UI/I	P.A. UI/I	γ -GT UI/I	BIL. TOT. μ mol/l	BIL. CONJ. μ mol/l	CHOLEST. mmol/l
PASCAL C.	30/10/81	99	242	227	100	22	5	3,4
	31/10/81	420	non dosée	217	70	27	5	2,5
	8/11/81	68	355	309	54	12	non dosée	2,6
	11/11/81	47	189	283	68	14	non dosée	3,7
	13/11/81	51	145	302	73	15	non dosée	3,7
	17/11/81	43	86	276	68	8	non dosée	3,6

CAS N° 8 - PASCAL C.



CAS N° 8 - PASCAL C.

L'hypocholestérolémie, la bilirubinémie pratiquement normale, des enzymes modérément élevés avec chez les transaminases, la possibilité de voir la GOT dépasser la GPT, tous ces signes nous font penser à une cirrhose. La γ -GT relativement élevée nous suggère une étiologie alcoolique, ce que confirme la consultation du dossier médical.

CONCLUSION

CONCLUSION

De ce modeste travail, il ressort nettement que les dosages enzymatiques apportent une contribution importante au diagnostic clinique, le domaine choisi ici étant celui des affections hépatiques.

La détermination quantitative des enzymes pose, d'une manière plus aiguë que les autres dosages, le problème du choix de la méthode. En effet, des techniques, en apparence identiques, donnent souvent des résultats divergents. Par ailleurs, les valeurs normales et subnormales, lorsqu'elles correspondent à des chiffres peu élevés, sont difficiles à apprécier et à interpréter par rapport à des systèmes de référence très hétérogènes.

Ces problèmes sont surtout liés à l'utilisation des méthodes traditionnelles : ils sont résolus, dans la plupart des cas, par l'adoption des techniques optimisées.

Enfin, l'application de l'automatisation aux méthodes de routine pratiquées dans les laboratoires de biologie hospitalière permet non seulement de réaliser plusieurs analyses à la fois avec une économie considérable de temps et une simplification des tâches de secrétariat, mais aussi d'améliorer la fiabilité des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES GENERAUX

Colloque International γ -GT.

Apport de la détermination de la γ -glutamyl-transpeptidase à la séméiologie hépatique. Paris. Boehringer Mannheim, 1973, 173 p., graph.

DIEBOLT G.

De l'importance du dosage des transaminases sériques chez les donneurs de sang dans les centres de transfusion en Afrique noire.
Thèse : Pharm. Dakar, 1966, N° 2.

LISSITZKY S. et ROLLAND M.

Cours de biochimie. 2 - Biochimie métabolique.
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille.
Chaire de Biochimie Médicale.
3° édition, Novembre 1969, 231 p.

LOUISOT P.

Séméiologie biochimique. Analyses biologiques. Explorations fonctionnelles.
Simpéditions, 1969, 47-49 Villeurbanne.

SCHMIDT E. et SCHMIDT F.

Les enzymes en pratique médicale. Paris. Boehringer Mannheim, 1969, 46 p., graph.

SCHMIDT E. et SCHMIDT F.

Les principes du diagnostic enzymatique. Paris. Boehringer Mannheim., 1972, 51 p., graph.

SCHMIDT E. et SCHMIDT F.

Manuel d'enzymologie clinique.
Paris. Boehringer Mannheim., 1973, 72 p., graph.

MEMOIRES ORIGINAUX

ARONSEN K.F., NOSSLIN B. et PIHL B.

The value of γ -glutamyl-transpeptidase as a screen test for liver tumor.
Acta Chir. Scand., 1970, 136, 17.

BANG N.V., MADSEN S. et IVESEN K.

Hépatite épidémique et transaminase sérique ; détermination de la transaminase dans une épidémie d'hépatite dans un home d'enfants.
Nordisk Méd., 1957, 58, 1013.

BESSION R. et BENHAMOU J.P.

Modification des phosphatases alcalines dans les maladies du foie.
Path. Biol., 1962, 9, 1601.

BISERTE G., JACQUET A., GENGE M. et GUERIN F.

Transaminases sériques au cours des affections hépatiques.
Lille Méd., 1958, 3, 518.

BOIVIN P.

Transaminases du sérum et variations pathologiques.
Rev. Fr. Clin. et Biol., 1958, 3, 1090.

Détermination de la phosphatase alcaline par la méthode optimisée
Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem., 1972, 10, 182.

FEIGELSON J. et PECAU Y.

L'activité sérique de la γ -GT dans les complications hépatiques de la mucoviscidose.
Nouv. Presse Méd., 1972, 1, 1899.

FUMAGALLI E. et MONTEVERDE A.

Les transaminases dans les affections hépatiques.
Minerva.Méd., 1959, 11, 324.

GIRARD M., BEL A., LARBRE F., TURCHOT R. et PROKOPENKO M.

Les transaminases sériques. Leur intérêt en pathologie digestive et particulièrement en hépatologie : à propos de 110 dosages.
J. Méd. Lyon, 1961, 42, 1241.

JACOBS W.L.W.

γ -glutamyl-transpeptidase in diseases of the liver, cardio-vascular system and diabetes mellitus.
Clin. Chim. Acta , 1972, 38 , 419.

LAUDAHN G., HARTMANNE., ROSENFELD E.M., WEYER H. et HUTH H.W.

Normal-Werte der serum-transaminasen bei Verwendung substratoptimierter Test-ansätze zur Aktivitätsmessung.
Klin. Wschr., 1970, 48, 838.

LUM G. et GAMBINO S.R.

Serum γ -GT activity as an indicator of disease of liver, pancreas or bone.
Clin. Chem., 1972, 18, 358.

MADSEN S., BANG NV et IVESEN K.

Serum glutamo-oxaloacetic transaminase in diseases of the liver and biliary cirrhosis.
Brit. Med. J., 1958, 543, 5070.

MANNING R.T., WEBER R.W. et DELP M.

Infections hepatitis : the use of transaminase determination during an intra-hospital epidemic.
Amer. J. Sci., 1961, 241, 454.

NERY J. et GRONATO V.

Transaminases dans les hépatopathies. Importance du rapport $\frac{TGO}{TGP}$.
Rev. Bres. Méd. 1959, 15, 399.

PAGET M.

De l'intérêt de l'évolution de l'activité transaminasique du sérum en pathologie hépato-biliaire.
Ann. Biol. Clin., 1957, 15, 650.

PHELAN M.B., NEALE G. et MOSS D.W.

Serial studies of serum alkaline phosphatase and 5'- nucleotidase levels in hepato-biliary disease., 1971, 32, 95.

Recommandations of the German Society for Clinical Chemistry
Standardization of methods : the estimation of enzyme activity in biological fluids.

Détermination des transaminases par la méthode optimisée.
Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem., 1970, 8, 658.

ROLLASON J.G.

Serum γ -GT in relation to alcohol consumption.
Clin. Chim. Acta, 1972, 39, 75.

RGSALKI S.B., RAU D., LEHMANN D. et PRENTICE M.

Determination of γ -GT activity and its clinical applications.
Ann. Clin. Biochem., 1970, 7, 143.

SAAD A., STEIGMANN F. et DUBIN A.

Enzyme profile in the differential diagnosis of liver disease.
Amer. J. Clin. Path. Gastroentérol., 1963, 39, 635.

SCHWARZMANN V.

Les transaminases sériques dans les maladies du foie.
Soc. Fr. Gastroentérol. 1956, 12, 11.

SMITH M.J.H.

Les variations enzymatiques sanguines au cours des maladies du foie.
Intérêt diagnostique et pratique.
(Rapport au 6^e Congrès Int. de Méd. Interne, Londres, Août 1960).

SOMMERVILLE R.L., FLEISHER G.A., DEARING W.H., HALLENBERG G.
et DOCKECTY M.B.

Transaminases in hepatic tissue and serum in hepatic disease.
Gastro-entérol., 1960, 38, 926.

SZASZ G.

Détermination cinétique de la γ -glutamyl-transpeptidase selon
G. SZASZ.
Clin. Chem. 1969, 15, 124.

SZEZCKLIK E., ORLOWSKI M. et SZEWFZUK A.

Serum γ -GT activity in liver disease.
Gastroenterol. 1961, 41, 353.

WEST M. et ZIMMERMANN H.J.

Serum enzymes in hepatic diseases.
Med. Clin. North.Amer., 1959, 43, 371.

WROBLEWSKI F.

The clinical significance of alteration in transaminases activities
of serum and body fluids.
Arch. Clin. Chem., 1958, 1, 313.

WROBLEWSKI F., JEWIS G. et LADUE J.S.

Diagnostic, pronostic et signification épidémiologique des altérations de la transaminase sérique oxalo-acétique dans l'hépatite aigue. Ann. Int. Méd., 1956, 45, 75.

WROBLEWSKI F. et LADUE J.S.

Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic diseases. Proc. Soc. Exp. Biol. Clin., 1956, 91, 569.

SOMMAIRE

1ère PARTIE : ENZYMOLOGIE

1.1.	INTRODUCTION	1
1.2.	HISTORIQUE	2
1.3.	DEFINITION D'UN ENZYME	4
1.4.	ENZYMES SERIQUES	5
1.5.	UNITE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE	6

2ème PARTIE : PRINCIPE DU DOSAGE DES ENZYMES

2.1.	GENERALITES	7
2.2.	METHODES DE DOSAGE	8
2.2.1.	Méthode colorimétrique	8
2.2.2.	Principes des dosages utilisant un nucléotide pyridinique	9
2.3.	PRECAUTIONS A PRENDRE	10
2.4.	DOSAGE DES ENZYMES LES PLUS COURANTS EN PATHOLOGIE HEPATIQUE	14
2.4.1.	Détermination de la GOT par la méthode cinétique optimisée selon les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique	15
2.4.2.	Détermination de la GPT par la méthode cinétique optimisée selon les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique	18
2.4.3.	Détermination cinétique de la γ -glutamyl- transpeptidase selon G. SZASZ	23
2.4.4.	Détermination des phosphatases alcalines par la méthode cinétique optimisée selon les recom- mandation de la Société Allemande de Chimie Clinique	27

2.4.5. Addendum : dosages complémentaires de paramètres non-enzymatiques	31
2.4.6. Variations des activités enzymatiques dans les différentes affections du foie et des voies biliaires	41
<u>IIIème PARTIE - RESULTATS ET DISCUSSION</u>	58
CONCLUSION	84
BIBLIOGRAPHIE	