



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2009

FACULTÉ DE PHARMACIE

Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C
Réactive au cabinet de pédiatrie

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 28 janvier 2010

pour obtenir :

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par

Mélina ZERBATO

née le 13 juillet 1985 à Nancy (54)

Membres du Jury

Président :

M. Jean-Yves JOUZEAU, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Directeur :

M. Gérard BELEY, Pédiatre

Juges :

Mlle Marie-Madeleine GALTEAU, Professeur Emérite, Faculté de Pharmacie de Nancy

M. Joseph HENNY, Docteur, Biologiste

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD & Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Gérald CATAU

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

| | |
|-------------------------------------|--|
| Gilles AULAGNER..... | Pharmacie clinique |
| Alain BAGREL | Biochimie |
| Jean-Claude BLOCK..... | Santé publique |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Chantal FINANCE | Virologie, Immunologie |
| Pascale FRIANT-MICHEL | Mathématiques, Physique, Audioprothèse |
| Christophe GANTZER..... | Microbiologie environnementale |
| Max HENRY | Botanique, Mycologie |
| Jean-Yves JOUZEAU | Bioanalyse du médicament |
| Pierre LABRUDE..... | Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile |
| Isabelle LARTAUD..... | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Dominique LAURAIN-MATTAR..... | Pharmacognosie |
| Brigitte LEININGER-MULLER..... | Biochimie |
| Pierre LEROY | Chimie physique générale |
| Philippe MAINCENT..... | Pharmacie galénique |
| Alain MARSURA | Chimie thérapeutique |
| Patrick MENU | Physiologie |
| Jean-Louis MERLIN | Biologie cellulaire oncologique |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | Chimie thérapeutique |
| Bertrand RIHN | Biochimie, Biologie moléculaire |
| Jean-Michel SIMON | Economie de la santé, législation pharmaceutique |

MAITRES DE CONFÉRENCES

| | |
|--------------------------|--|
| Monique ALBERT | Bactériologie, Virologie |
| Sandrine BANAS | Parasitologie |
| Mariette BEAUD..... | Biologie cellulaire |
| Emmanuelle BENOIT | Communication et santé |
| Isabelle BERTRAND | Microbiologie environnementale |
| Michel BOISBRUN..... | Chimie thérapeutique |
| François BONNEAUX..... | Chimie thérapeutique |
| Ariane BOUDIER | Chimie Physique |
| Cédric BOURA | Physiologie |
| Jean-Claude CHEVIN | Chimie générale et minérale |
| Igor CLAROT | Chimie analytique |
| Jocelyne COLLOMB..... | Parasitologie, Mycologie |
| Joël COULON | Biochimie |
| Sébastien DADE..... | Bio-informatique |
| Dominique DECOLIN..... | Chimie analytique |
| Béatrice DEMORE..... | Pharmacie clinique |
| Joël DUCOURNEAU..... | Biophysique, audioprothèse, acoustique |
| Florence DUMARCAY | Chimie thérapeutique |
| François DUPUIS | Pharmacologie |
| Raphaël DUVAL | Microbiologie clinique |

Béatrice FAIVRE Hématologie
 Adel FAIZ Biophysique-accoustique
 Luc FERRARI Toxicologie
 Stéphane GIBAUD Pharmacie clinique
 Thierry HUMBERT Chimie organique
 Frédéric JORAND Santé et environnement
 Olivier JOUBERT Toxicologie, sécurité sanitaire
 Francine KEDZIEREWICZ Pharmacie galénique
 Alexandrine LAMBERT Informatique, Biostatistiques
 Faten MERHI-SOUSSI Hématologie biologique
 Christophe MERLIN Microbiologie environnementale et moléculaire
 Blandine MOREAU Pharmacognosie
 Maxime MOURER Pharmacochimie supramoléculaire
 Francine PAULUS Informatique
 Christine PERDICAKIS Chimie organique
 Caroline PERRIN-SARRADO Pharmacologie
 Virginie PICHON Biophysique
 Anne SAPIN Pharmacie galénique
 Marie-Paule SAUDER Mycologie, Botanique
 Nathalie THILLY Santé publique
 Gabriel TROCKLE Pharmacologie
 Marie-Noëlle VAULTIER Biodiversité végétale et fongique
 Mohamed ZAIYOU Biochimie et Biologie moléculaire
 Colette ZINUTTI Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD Anglais

ASSISTANT


Annie PAVIS Bactériologie


Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)


Anne-Pascale PARRET Directeur


« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».


ERMENT DES POTBICAIRES


 E JURE EN PRESENCE DES MAITRES DE LA FACULTE DES
CONSEILLERS DE L'ORDRE DES PHARMACIENS ET DE MES
CONDISCIPLES.

 'HONORER CEUX QUI M'ONT INSTRUIT DANS LES
PRECEPTES DE MON ART ET DE LEUR TEMOIGNER
MA RECONNAISSANCE EN RESTANT FIDELE A LEUR
ENSEIGNEMENT.

 'EXERCER, DANS L'INTERET DE LA SANTE
PUBLIQUE, MA PROFESSION AVEC CONSCIENCE ET
DE RESPECTER NON SEULEMENT LA LEGISLATION EN
VIGUEUR, MAIS AUSSI LES REGLES DE L'BONNEUR, DE
LA PROBITE ET DU DESINTERESSEMENT.

 E DE JAMAIS OUBLIER MA RESPONSABILITE ET
MES DEVOIRS ENVERS LE MALADE ET SA DIGNITE
HUMAINE, EN AUCUN CAS JE NE CONSENTIRAI A
UTILISER MES CONNAISSANCES ET MON ETAT POUR
CORROMPRE LES MOEURS ET FAVORISER DES ACTES
CRIMINELS.

 UE LES HOMMES M'ACCORDENT LEUR ESTIME SI JE SUIS
FIDELE A MES PROMESSES.

 UE JE SOIS COUVERT D'OPPROBRE ET MEPRISE DE MES
CONFRERES SI J'Y MANQUE.

Remerciements

Je remercie le Professeur Jean-Yves Jouzeau d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse et ainsi d'avoir jugé mon travail.

Je remercie le docteur Gérard Beley de m'avoir proposé ce sujet, de m'avoir permis d'effectuer une étude au sein de son cabinet et de s'être rendu disponible à chacune de mes sollicitations.

Je remercie le Professeur émérite Marie-Madeleine Galteau de m'avoir suivie, conseillée et corrigée tout au long de mon travail.

Je remercie le biologiste Joseph Henny d'avoir bien voulu participer au jury de ma thèse.

A ma famille, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mon parcours scolaire et universitaire.

A Pierre qui a toujours su me reconforter et m'encourager dans tous les moments de doutes.

A Antoine, Aurélie, Dimitri, Emilie, Jonathan, Julien et Marie, pour m'avoir supportée ces 7 longues années !

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Liste des abréviations utilisées | 3 |
| Introduction | 5 |
| PARTIE I - Synthèse bibliographique..... | 6 |
| 1. La réaction inflammatoire | 7 |
| 1.1. Définition..... | 7 |
| 1.2. La réponse inflammatoire locale aiguë ou chronique (Autier et al. 2004)..... | 9 |
| 1.3. Les examens biologiques explorant les états inflammatoires..... | 21 |
| 2. Les protéines de l'inflammation..... | 29 |
| 2.1. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation..... | 29 |
| 3. La Protéine C réactive | 34 |
| 3.1. Historique | 34 |
| 3.2. Structure de la Protéine C réactive | 34 |
| 3.3. Régulation de l'expression du gène de la protéine C réactive..... | 40 |
| 3.4. Métabolisme | 42 |
| PARTIE II - Etude personnelle réalisée..... | 46 |
| 4. Justification de l'étude personnelle | 47 |
| 4.1. Introduction | 47 |
| 4.2. La méthode Nycocard CRP single test : description et qualités..... | 48 |
| 5. Etude au cabinet du Pédiatre | 52 |
| 5.1. Patients et méthode..... | 52 |
| 5.2. Mode opératoire..... | 53 |
| 5.3. Résultats | 55 |
| 5.4. Discussion et conclusion | 61 |
| Annexe 1 : Caractéristiques démographiques et cliniques des enfants entrés dans l'étude . | 64 |
| Annexe 2 : Documentation Nycocard | 66 |
| Bibliographie..... | 72 |
| Webographie..... | 73 |

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 - La réaction inflammatoire schématisée (Prin et al. 2009) | 8 |
| Figure 2 - La phase d'initiation (Prin et al. 2009) | 10 |
| Figure 3 - Les trois étapes de la traversée de l'endothélium par les leucocytes (Prin et al. 2009)..... | 12 |
| Figure 4 - cibles des facteurs chimiotactiques (Weill et al. 2003) | 14 |
| Figure 5 - Actions sur la cellule inflammatoire et conséquences (Prin et al. 2009)..... | 15 |
| Figure 6 - Cibles et conséquences de l'action des cytokines inflammatoires (d'après Prin et al. 2009)..... | 17 |
| Figure 7 - les cytokines anti et pro-inflammatoires (Prin et al. 2009)..... | 19 |
| Figure 8 - Profil électrophorétique normal (d'après Prin et al. 2009) | 23 |
| Figure 9 - Structure pentamérique de la protéine C réactive (Volanakis 2001)..... | 35 |
| Figure 10 - Comparaison d'une sous-unité de PCR et de SAP (Thompson et al. 1999)..... | 36 |
| Figure 11 - Cavités présentes sur chaque sous unité (Thompson et al. 1999)..... | 37 |
| Figure 12 - Représentation par deux sphères des deux ions calcium (Volanakis 2001) | 37 |
| Figure 13 - a :position des deux ions calcium (orange) et d'une molécule de phosphocholine ; b :représentation illustrant le positionnement des 5 molécules de phosphocholine (orange et noir) sur la protéine C réactive (Thompson et al. 1999) .. | 39 |
| Figure 14 - Représentation GRASP du site de liaison à la phosphocholine montrant la poche hydrophobe libre (Thompson et al. 1999) | 39 |
| Figure 15 - Courbe dose-réponse montrant les effets de IL-6 et IL-1 sur l'activation du promoteur du gène de la PCR (Ganter et al. 1989) | 41 |
| Figure 16 - Coopération entre IL-6 et IL-1 (Ganter et al. 1989) | 42 |
| Figure 17 - Diagnostics finaux | 56 |
| Figure 18 - Distribution des taux de PCR parmi les enfants | 57 |
| Figure 19 - Lien entre la température corporelle et le taux de PCR..... | 58 |
| Figure 20 - Comparaison des diagnostics finaux avec le taux de PCR..... | 59 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I - Valeurs standards de la VS chez l'être humain | 27 |
| Tableau II - Evolution des protéines de la phase aiguë au cours du processus inflammatoire | 32 |
| Tableau III - Relation entre PCR rapide et les décisions immédiates des 12 pédiatres (Godard et al. 2000)..... | 48 |
| Tableau IV - Résultats de l'étude réalisée en 2006-2007 (Cohen et al. 2008)..... | 50 |
| Tableau V - Trame du tableau de suivi des cas au cabinet..... | 52 |
| Tableau VI -Causes d'erreurs (Axis-shield 2006) | 54 |
| Tableau VII - Répétabilité du dosage « rapide » de la PCR..... | 54 |
| Tableau VIII - Reproductibilité du dosage « rapide » de la PCR..... | 55 |
| Tableau IX - Moyennes, écarts types et extrêmes | 55 |
| Tableau X - Actions mises en place suite au dosage rapide de la PCR..... | 60 |
| Tableau XI - Comparaison entre l'étude suisse (Godard et al. 2000) et la nôtre | 61 |

Liste des abréviations utilisées

Acides aminés : His (Histidine), Trp (Tryptophane), Asn (Asparagine), Phe (Phénylalanine), Leu (Leucine), Thr (Thréonine), Asp (Aspartate), Glu (Glutamate), Tyr (Tyrosine), Lys (Lysine), Ala (Alanine)

ARN, ARNm : acide ribonucléique, acide ribonucléique messenger

AVC : accident vasculaire cérébral

C1q : protéine C1q du complément

CAT : chloramphénicol acétyltransférase

CD31 : Cluster Differentiation 31

ECBU : examen cytobactériologique urinaire

ECP : protéine cationique de l'éosinophile

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

EPO : peroxydase spécifique de l'éosinophile

FcR : récepteurs reconnaissant la région Fc

GEA : gastro-entérite aiguë

HDL : high density lipoprotein

IL-1,2,5,6,8,10 : Interleukine 1...

IL-1ra : IL-1 receptor antagonist

IMC : indice de masse corporelle

IR : insuffisance rénale

KDa : kilo Dalton

LCR : liquide céphalo-rachidien

LTB₄, LTD₄ : leucotriène B₄, leucotriène D₄

MBP : major basic protein

MCP-1 : monocyte chemo attractant

MoCM : monocyte conditioned medium

MPO : myelopéroxydase neutrophile

NO : monoxyde d'azote

PAF : facteur d'activation plaquettaire

PCR : Protéine C Réactive

PCT : procalcitonine

PNN : polynucléaire neutrophile

SAA : serum amyloid associated

Thèse

SAP : composant amyloïde P

SOD : superoxyde dismutase

TDR : test de diagnostic rapide

TNF α : Tumor Necrosis Factor

TNF β : Tumor Growth factor

VS : vitesse de sédimentation

Introduction

Connu depuis 2000 ans dans ses manifestations cliniques, le syndrome inflammatoire est de connaissance plus récente sur le plan biologique.

Au cours de ce travail, nous découvrirons les différents acteurs d'une réaction inflammatoire et les examens biologiques permettant de l'explorer.

L'inflammation peut notamment être visualisée à travers le dosage de nombreuses protéines dont la protéine C réactive. En effet, son taux est très fortement augmenté face à la plupart des tissus lésés, des infections et inflammations.

C'est depuis les années 30, année de sa découverte, que la protéine C réactive suscite l'intérêt des chercheurs, qui ont successivement découvert son existence, sa structure, ses différents rôles ainsi que l'importance de son dosage par une technique rapide. Les valeurs de la PCR sont généralement mesurées pour avoir une idée de l'activité de la maladie ainsi qu'une idée quant à l'origine virale ou bactérienne. De nos jours, aucun polymorphisme ni aucune absence de PCR n'ont été découverts chez l'être humain, ceci nous démontre clairement que la PCR joue un rôle physiologique important.

Plusieurs études récentes ont démontré l'intérêt médical, humain et économique du dosage rapide de la protéine C réactive ; nous développerons donc ces intérêts à travers une partie portant sur différentes études cliniques et notamment la notre.

PARTIE I - Synthèse bibliographique

1. La réaction inflammatoire

1.1. Définition

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression ayant pour origine des éléments physiques : chaleur, froid, rayonnements ionisants... ou des éléments solides exogènes ou endogènes : pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques, composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...). Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables. La réaction inflammatoire peut être aiguë, voire suraiguë ; se manifeste immédiatement après l'intrusion des micro-organismes et dure jusqu'à 48 h environ. Elle est la réponse typique du système immunitaire inné. Pour exemple, on observe des états infectieux sévères lors de pancréatites aiguës, de brûlures... La réaction inflammatoire peut aussi être chronique et ainsi durer des semaines, voire des années.

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases (figure 1) :

- Une phase **d'initiation** qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.
- Une phase **d'amplification** avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.
- Une phase de **résolution** et de **réparation** qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Ces trois phases mettent en action différents systèmes et impliquent de nombreux médiateurs. La nature du développement de chacune de ces trois phases et la nature des effecteurs primaires et secondaires impliqués (cellules résidentes et recrutées ; médiateurs préformés et néoformés) conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère).

La réaction inflammatoire est caractérisée par les 4 signes cardinaux de Celsius (1^{er} siècle) : « Rubor et tumor cum calore et dolore » (rougeur et gonflement avec chaleur et douleur). Quelques siècles plus tard, Galien y ajouta un 5^{ème} signe : « functio laesa » (perte de fonction). (Russo-Marie et al. 1998)

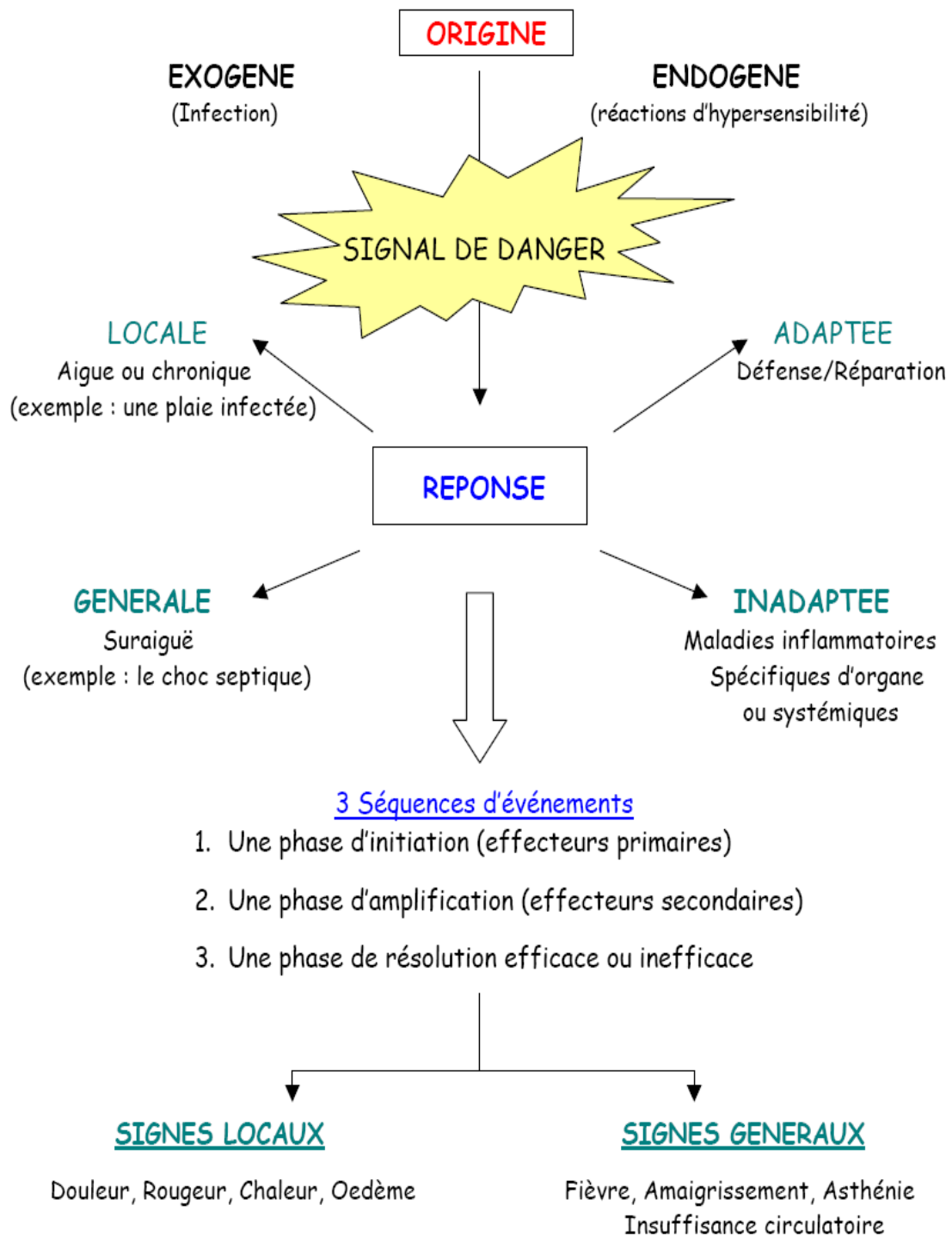


Figure 1 - La réaction inflammatoire schématisée (Prin et al. 2009)

1.2. La réponse inflammatoire locale aigue ou chronique (Autier et al. 2004)

1.2.1. Mécanismes

1.2.1.1. Initiation

Suite à une plaie avec une brèche vasculaire (figure 2), on observe une réaction locale immédiate (douleur, phase vasculaire) ainsi que la mise en jeu du système de l'hémostase et le recrutement des cellules inflammatoires :

- Activation des plaquettes (adhésion, agrégation, dégranulation) qui favorise la libération de médiateurs (facteurs vasoactifs) comme la sérotonine. Les plaquettes produisent également des cytokines et des facteurs de croissance actifs sur la phase vasculaire, le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (comme les neutrophiles et les monocytes).
- Activation des cellules endothéliales grâce à l'expression accrue des molécules de surface et à la libération de médiateurs
- Activation des éléments du système de contact et libération de la bradykinine
- Activation de la coagulation avec formation d'un caillot de fibrine
- Activation de la fibrinolyse qui dissout le caillot de fibrine, et production de plasmine qui active le complément et entraîne la libération par la cascade du complément d'anaphylatoxines C3a, C5a et de la C2-kinine (facteurs chimiotactiques, vasoactifs).

La libération de facteurs vasoactifs entraîne une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ces deux événements sont responsables de l'apparition d'un œdème. Ces facteurs, additionnés des facteurs chimiotactiques et de l'expression des molécules d'adhérence favorisent le recrutement des cellules inflammatoires.

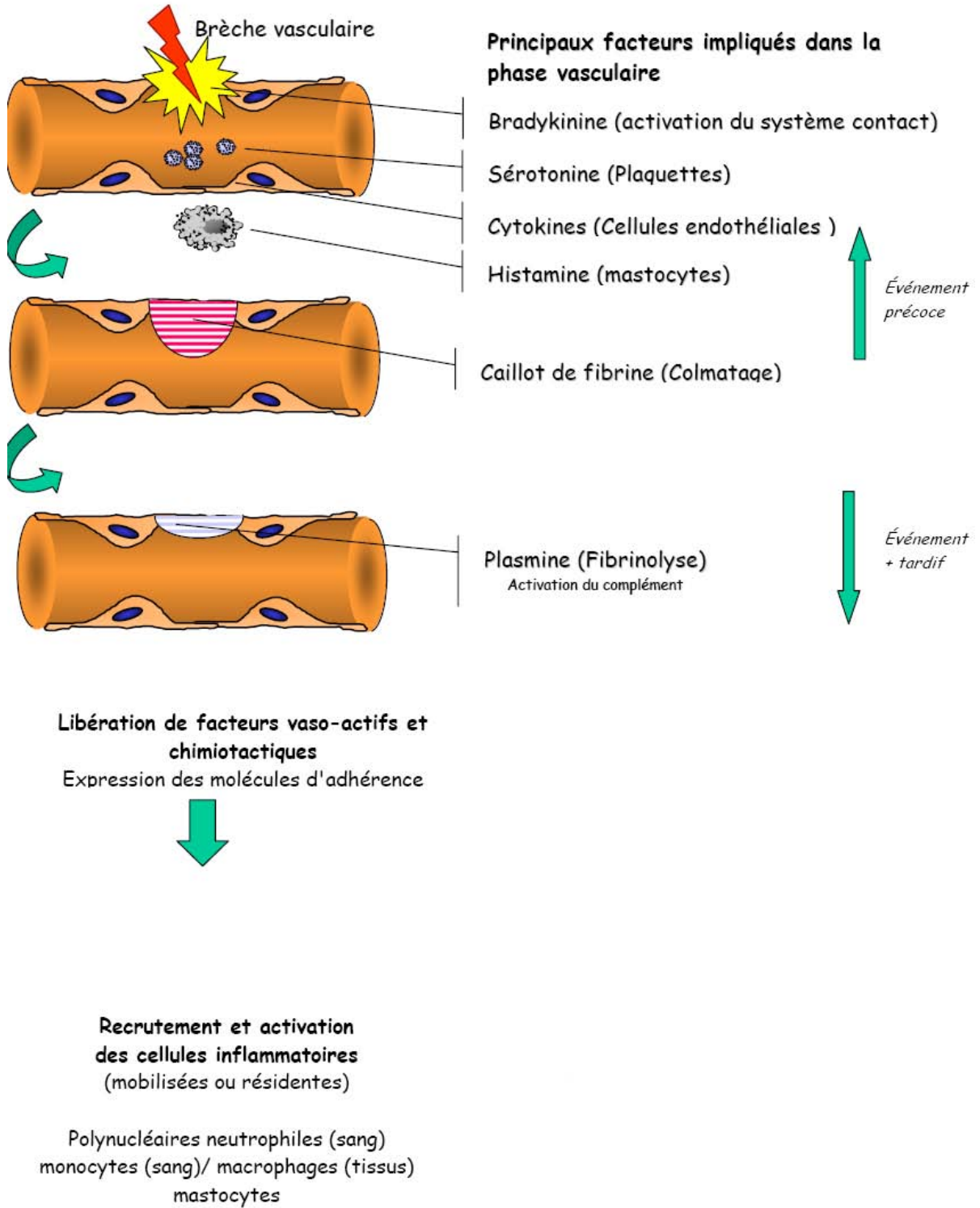


Figure 2 - La phase d'initiation (Prin et al. 2009)

1.2.1.2. Amplification

a. Rôle des cellules

Les différentes cellules impliquées dans une réaction inflammatoire sont :

Les cellules endothéliales : elles permettent l'adhésion puis la migration à travers l'endothélium des leucocytes. Les interactions endothélium - leucocytes sont situées dans une région de la microcirculation : les veinules post-capillaires. De nombreuses molécules d'adhérence ont été identifiées telles les sélectines, les intégrines...

Le passage du leucocyte à travers l'endothélium se fait en 3 étapes (figure 3) (Espinosa et al. 2006) :

- 1. L'adhérence par roulement à l'endothélium appelé aussi Rolling.** Le leucocyte se déplace plus lentement dans les vaisseaux que les globules rouges. Ceci est dû à une adhérence faible entre les sélectines P ou E des cellules endothéliales et les motifs osidiques du leucocyte ainsi qu'entre les sélectines L des leucocytes et les glycoprotéines présentes sur les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales expriment ces molécules suite à différents signaux comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor), la thrombine, les radicaux libres... leur indiquant ainsi un problème au niveau du tissu sous jacent.
- 2. L'adhérence ferme ou margination.** L'augmentation du volume sanguin, la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire conduisent à une stase et à une augmentation de la viscosité du sang. Cela permet la margination leucocytaire c'est-à-dire une fixation du leucocyte contre la paroi du vaisseau pendant plus de trente secondes. Ce phénomène est assuré à la fois par un ralentissement de la circulation sanguine et par la surexpression des molécules d'adhérence des cellules endothéliales activées. Cette adhérence est assurée par des molécules appartenant à la famille des intégrines ainsi qu'à la superfamille des immunoglobulines. L'adhérence est de forte affinité et permet donc au leucocyte de s'arrêter contre l'endothélium. C'est à ce niveau que la présence d'agents chimiotactiques confirme au leucocyte l'existence d'un problème sous jacent.
- 3. Diapédèse.** La traversée de l'endothélium est induite et guidée par des agents chimiotactiques. La pénétration du leucocyte se fait au niveau des jonctions serrées entre deux cellules épithéliales grâce à une interaction entre les molécules CD31 exprimées à la fois sur les leucocytes et les cellules endothéliales. Le cytosquelette du leucocyte assure sa déformation et sa migration entre les cellules (cytosquelette d'actine et filaments de myosine).

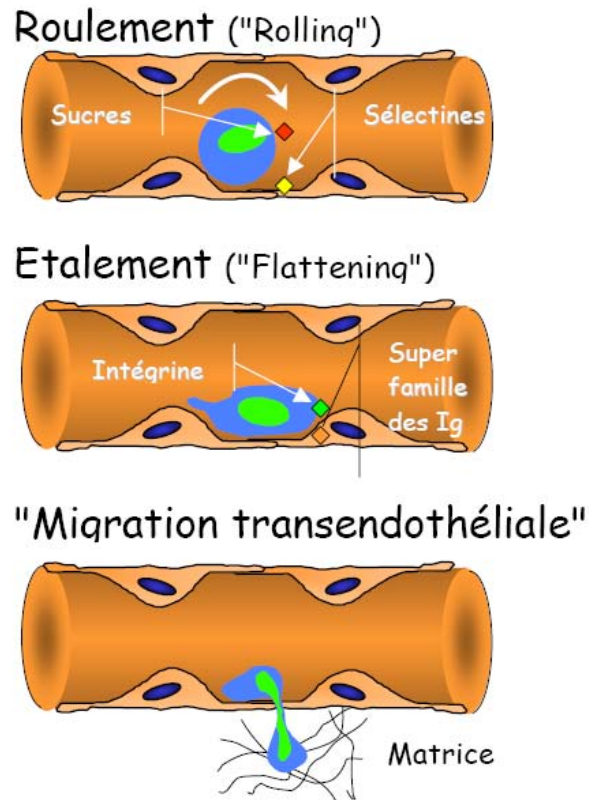


Figure 3 - Les trois étapes de la traversée de l'endothélium par les leucocytes (Prin et al. 2009)

Les cellules sanguines : lors d'une réaction inflammatoire, on observe un afflux de polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles) ou de cellules mononucléés (monocytes, lymphocytes)

Les cellules résidentes tissulaires : sont constituées par les mastocytes et les macrophages qui vont organiser la mise en place de la réponse inflammatoire aiguë ainsi que par les cellules dendritiques qui auront un rôle dans la réponse immunitaire adaptative. Les cellules résidentes tissulaires sont capables d'identifier immédiatement un microorganisme. Elles sont attirées par les bactéries en détectant des formyl-peptides que celles-ci produisent. Ces cellules possèdent donc des récepteurs aux formyl-peptides et migrent par chimiotactisme.

Rappel : le chimiotactisme est le phénomène d'attraction (chimiotactisme positif) ou de répulsion (chimiotactisme négatif) d'une cellule par une substance diffusible. La cellule possède un récepteur à la substance qui déclenche la migration cellulaire.

Rôle des mastocytes

Après la reconnaissance des microorganismes, ils répondent en sécrétant des médiateurs pro inflammatoires et chimiotactiques.

Ils libèrent ainsi 3 groupes de molécules :

1. Des molécules préformées et stockées dans des granules, libérées par degranulation (exocytose des granules). On y retrouve l'histamine (vasoactive), et d'autres messagers tels la substance P, l'adénosine...ainsi que des enzymes : protéases, glycosidases...
2. Des médiateurs lipidiques néoformés dérivant du métabolisme de l'acide arachidonique comme les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes.
3. Des cytokines : IL-1/IL-6/TNF α aussi appelé le trio inflammatoire

(interleukine1/interleukine6/Tumor Necrosis Factor)

Rôle des macrophages

Après sa reconnaissance, le macrophage phagocyte le microorganisme. Mais son rôle ne s'arrête pas là, en effet, il participe aussi à l'organisation de la réponse inflammatoire en sécrétant de nombreuses cytokines comme le trio inflammatoire, des chimiokines comme IL-8 (interleukine 8) qui recrutent des granulocytes neutrophiles...Enfin, ils contrôlent l'architecture tissulaire en préparant la réparation du tissu lésé.

b. les agents chimiotactiques

Parmi les principaux agents chimiotactiques, on trouve,

- les chimiokines
- les composants C5a et C3a du complément
- le PAF (facteur activant les plaquettes)

Ce grand nombre de molécules chimiotactiques permet un recrutement efficace des cellules de l'immunité mais aussi un contrôle du type de leucocyte recruté.

De nombreuses cellules sont sensibles à l'action des médiateurs lipidiques tels que le PAF-acether, les leucotriènes B4 et D4 (LTB4, LTD4...) ou les prostaglandines.

En revanche, une action plus ciblée peut expliquer l'afflux préférentiel d'une population cellulaire au sein du foyer inflammatoire. Par exemple, l'IL-8 (interleukine 8) exerce surtout ses effets sur la lignée neutrophile ; le MCP-1 (monocyte chemo attractant) agit sur la lignée monocyttaire ; l'IL-5 (interleukine 5) et l'éotaxine sont très actifs sur la lignée éosinophile. (Figure 4)

**Facteurs chimiotactiques
Ils recrutent et pré-activent****Action +/- ciblée**

- *Leucotriènes*
- *Prostaglandines*
- *Anaphylatoxines (C3a, C5a)*
- *Cytokines*

Action+ciblée

- *IL-8*→*neutrophiles*
- *MCP-1*→*monocytes*
- *éotaxine*→*éosinophiles*

Figure 4 - cibles des facteurs chimiotactiques (Weill and Batteux 2003)

c. Activation des cellules

Les cellules recrutées (neutrophiles, éosinophiles...) et les cellules résidentes sont sensibles aux nombreux messages chimiques de leur environnement. Elles interagissent localement avec les différents médiateurs libérés tels les cytokines, les chémokines, les fractions du complément, les médiateurs lipidiques...

Le décodage et l'intégration de ces signaux aboutissent à l'induction d'un programme fonctionnel (figure 5) :

- survie, apoptose ou nécrose cellulaire
- phagocytose des microorganismes, de débris cellulaires, exocytose de produits préformés ou sécrétion sélective de produits néoformés...

L'activation de cellules recrutées entraîne la production de chémokines et de cytokines comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF α . Celles-ci favorisent l'entretien et l'amplification de la réaction inflammatoire.

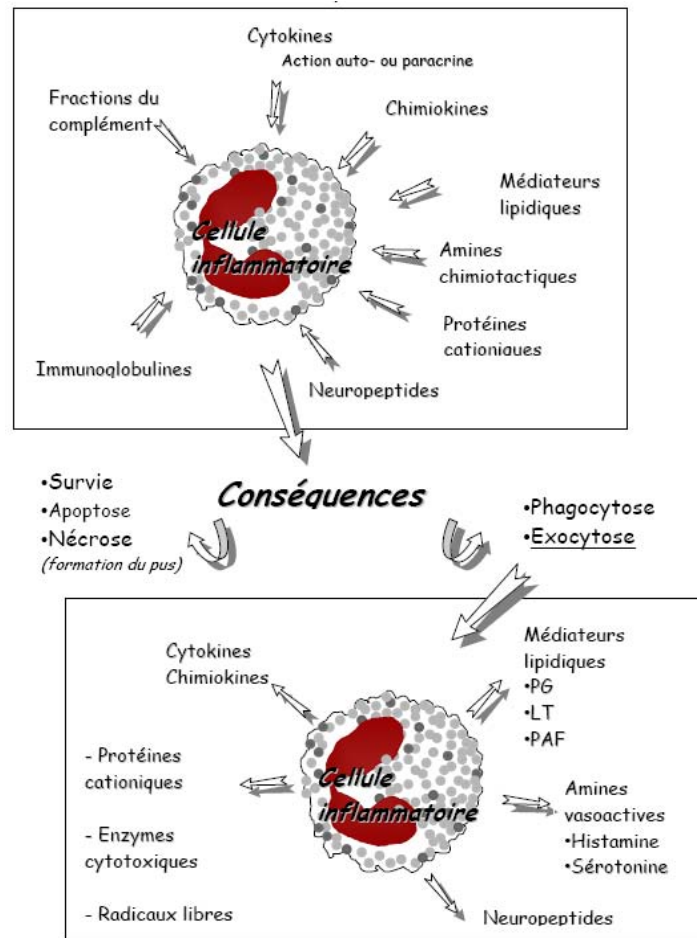


Figure 5 - Actions sur la cellule inflammatoire et conséquences (Prin et al. 2009)

d. Rôle des médiateurs

d.1. les médiateurs préformés

Ces médiateurs peuvent être libérés en totalité après l'exocytose des granules des leucocytes. On retrouve :

Les amines vasoactives : elles sont surtout impliquées dans la phase d'initiation. Parmi elle on distingue :

- Les acteurs du système de la coagulation comme la thrombine et la plasmine qui activent d'une part le complément et conduisent à la production d'anaphylatoxines C3a et C5a et d'autre part le système des kinines conduisant à la production de bradykinine vasodilatatrice.

- Les médiateurs de l'inflammation tels les leucotriènes, les prostaglandines, thromboxanes et histamine.
- Le monoxyde d'azote.

Ces molécules induisent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire.

La vasodilatation induit localement une baisse de la vitesse de circulation du sang d'où le terme « rubor » de Celsius. De plus, l'augmentation de la perméabilité vasculaire entraîne une fuite de liquide proche du plasma (exsudat) du sang vers les tissus d'où le terme « tumor » de Celsius : apparition de l'œdème.

Ce mécanisme permet avant tout de :

- recruter au niveau de la zone infectée les cellules adéquates
- de diluer le foyer inflammatoire
- de contenir ce foyer par la formation de fibrine et éviter ainsi sa dissémination.

Les protéases : elles sont surtout impliquées dans la phase d'initiation de la réaction inflammatoire (phase vasculaire). Elles interagissent dans le système de la coagulation, le système contact, la fibrinolyse, l'activation du complément...

Les protéines des granules des polynucléaires : les protéines cationiques sont surtout retrouvées dans les polynucléaires éosinophiles. Parmi elles on distingue : la MBP (major basic protein), l'ECP (protéine cationique de l'éosinophile)... Elles sont cytotoxiques et activatrices, en effet, elles peuvent stimuler les cellules voisines et induire la libération d'autres médiateurs comme les médiateurs lipidiques, les cytokines, les chémokines...

NB : les polynucléaires neutrophiles exercent surtout des activités d'endocytose et de phagocytose.

d.2 les médiateurs néoformés

Les chémokines et les cytokines : elles ont un rôle dans chacune des étapes de la réaction inflammatoire. Les cellules inflammatoires sont à la fois les émetteurs et des récepteurs de signaux dépendants des chémokines et des cytokines.

Elles sont capables d'agir à proximité du foyer d'induction (réaction locale et action autocrine) ou à distance (fièvre, réactions systémiques...et action paracrine) et peuvent avoir un rôle quant à la croissance, la différenciation, la migration et l'activation des cellules inflammatoires.

Les cytokines peuvent avoir un effet pro-inflammatoire ou anti inflammatoire.

Certaines favorisent la réaction inflammatoire : il s'agit surtout de l'IL-1, l'IL-6 et du TNF α . Après une agression, de nombreux signes clinico-biologiques sont la conséquence des effets des cytokines sur le système nerveux (fièvre, somnolence, anorexie), sur le foie (production des protéines de l'inflammation), sur la moelle osseuse (hyperleucocytose), sur les vaisseaux (margination, diapédèse), sur le muscle (cachexie), sur la production accrue de protéases. (figure 6).

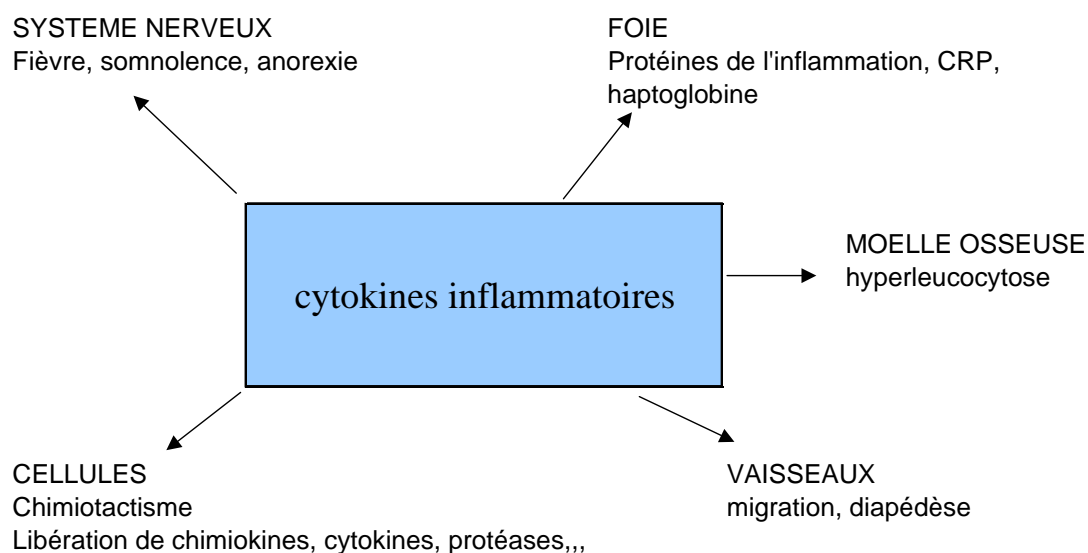


Figure 6 - Cibles et conséquences de l'action des cytokines inflammatoires (Prin et al. 2009)

Remarque : un excès de production de cytokines comme le TNF α -, peut entraîner une réaction inflammatoire systémique, prenons pour exemple le choc septique.

Rôle de l'IL-1

Elle est principalement produite par les monocytes (Espinosa et al. 2006). A faible concentration, elle agit sur les cellules endothéliales pour augmenter l'expression des molécules d'adhérence pour les leucocytes. A des concentrations moyennes, elle agit sur le système nerveux central ce qui provoque une élévation de la température corporelle ainsi que sur le foie entraînant une hausse de la production des protéines de l'inflammation. Les phagocytes produisent un analogue de l'IL-1 : l'IL-1ra qui se lie au récepteur sans induire de signal en assurant ainsi un rétrocontrôle négatif du message IL-1.

Rôle du TNF α ou Tumor Necrosis Factor

Il est principalement sécrété par les macrophages et les mastocytes activés.

A faible dose, le TNF α augmente l'expression des molécules d'adhérence sur l'endothélium.

A dose modérée, le TNF α agit de manière systémique et induit la synthèse hépatique de certaines protéines de la phase aigüe comme le fibrinogène et la SAP. Il stimule également l'hématopoïèse.

A forte dose, le TNF α est responsable du choc septique caractérisé par un effondrement de la pression artérielle, une faiblesse cardiaque, une perte des propriétés anticoagulantes de l'endothélium et des perturbations métaboliques.

Rôle de l'IL-6

Elle est produite par les phagocytes, les cellules dendritiques, les fibroblastes et les cellules endothéliales. De nombreuses actions lui sont attribuées au niveau local:

- stimulation de la phagocytose
- augmentation des molécules d'adhérence pour monocytes par les cellules endothéliales
- elle favorise la synthèse de la matrice extracellulaire
- induction de la sécrétion d'une substance pour recruter les monocytes

Au niveau systémique, elle est responsable de la sécrétion par le foie des protéines de la phase aigüe et favorise la production de cellules de la lignée myéloïde par la moelle osseuse.

Remarque : les cytokines pro inflammatoires induisent par elles-mêmes un rétrocontrôle négatif.

Exemple de cytokines ayant un effet anti-inflammatoire : l'IL-10 (interleukine10), le TGF β (Tumor Growth Factor).

Différents mécanismes permettent de limiter la réaction inflammatoire (figure 7) :

- les cytokines ayant un effet antagoniste des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF β
- les cytokines compétitrices qui bloque le récepteur des cytokines pro-inflammatoires
- des récepteurs solubles de cytokines qui les fixent avant que celles-ci ne se fixent aux récepteurs membranaires
- les anticorps anti-cytokine pro-inflammatoire (exemple : Anticorps anti- TNF)

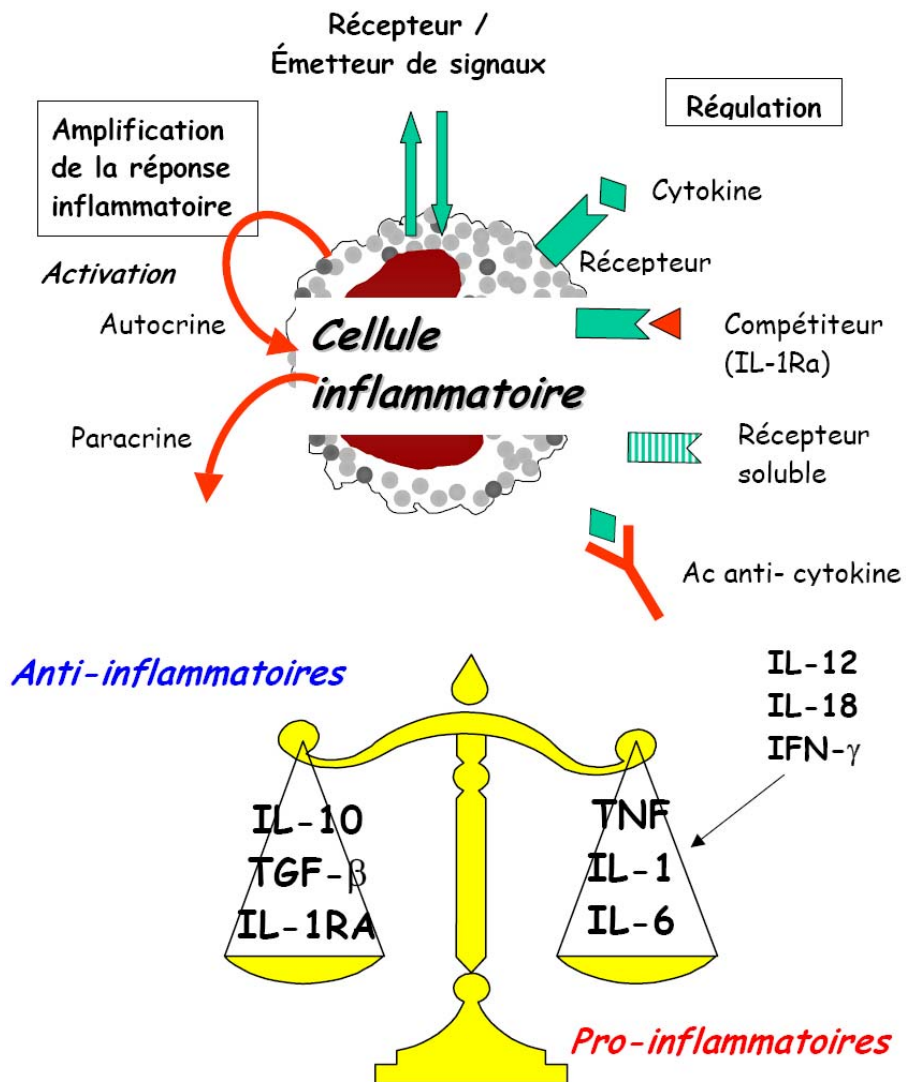


Figure 7 - les cytokines anti et pro-inflammatoires (Prin et al. 2009)

d.3 Les médiateurs lipidiques

Le PAF-acether et les eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) sont synthétisés à partir des phospholipides membranaires. Les eicosanoïdes sont obtenus selon deux voies :

- cyclo oxygénase pour les prostaglandines et le thromboxane qui ont un rôle dans la vasodilatation
- lipo oxygénase pour les leucotriènes qui ont un rôle dans le chimiotactisme.

Le PAF-acether joue quant à lui un rôle dans la vasodilatation et dans le chimiotactisme des polynucléaires. Il active également les phagocytes et a une action sur les fibroblastes et les fibres musculaires lisses.

d.4 Les radicaux libres oxygénés et nitrés

Ils sont produits par trois systèmes enzymatiques différents mais tous dépendants de l'oxygène :

- le système NADPH-Oxydase : il permet l'obtention des formes réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde, l'eau oxygénée, le radical hydroxyle et le singulet d'oxygène
- le système peroxydase : il permet l'obtention de myelopéroxydase neutrophile (MPO) et de peroxydase spécifique de l'éosinophile (EPO)
- Le système de la NO synthétase : il est inductible par les cytokines pro-inflammatoires et permet l'obtention de NO (monoxyde d'azote) qui est toxique pour les microorganismes.

Les radicaux libres sont toxiques envers les microorganismes mais le sont aussi envers les cellules (stress oxydant) et les tissus par une toxicité directe ou indirecte par activation d'autres systèmes.

C'est pourquoi des systèmes de défense anti-oxydants sont nécessaires à la survie de l'organisme comme la SOD (superoxyde dismutase), le système glutathion, les catalases...

d.5 Réponse immunitaire non adaptative

Elle implique les lymphocytes porteurs des récepteurs pour les antigènes peu variables.

Exemple : le lymphocyte natural killer, les lymphocytes B,

Ils servent à éliminer le microorganisme.

d.6 Réponse immunitaire adaptative

Si nécessaire, la réaction inflammatoire peut s'arrêter beaucoup plus tôt, lors d'une « petite » attaque par exemple.

1.2.1.3. Résolution ou réparation

Dès l'amplification, on assiste à différents mécanismes qui tendent à une réparation du tissu lésé :

- un système de contrôle de la réaction inflammatoire par les cytokines anti-inflammatoires, les anti-radicaux libres...

- un remodelage : équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines matricielles
- une néovascularisation : migration et maturation des cellules endothéliales (rôle important des cytokines !)

La résolution peut être totale ou partielle en fonction du degré des lésions des tissus.

Pour qu'il y ait une résolution totale, il faut que le facteur déclenchant soit éliminé, que les débris cellulaires soient phagocytés et que les systèmes de contrôle et de réparation soient efficaces.

La résolution ne sera que partielle si :

- le facteur déclenchant persiste : antigène...
- les systèmes de contrôle sont défaillants : déséquilibre de production entre les cytokines pro et anti-inflammatoires, les protéases et anti-protéases...
- les systèmes de réparation sont inefficaces : intégrité tissulaire non restaurée.

Il y a alors possibilité de passage à la chronicité.

1.3. Les examens biologiques explorant les états inflammatoires

1.3.1. L'hémogramme

Les hématies

L'anémie n'apparaît qu'après trois à quatre semaines d'inflammation et reste souvent modérée : entre 8 et 11 g d'hémoglobine par décilitre. Son intensité est en rapport avec la gravité de l'affection. Habituellement elle est normochrome et normocytaire mais devient microcytaire si l'inflammation persiste. Le taux de fer sérique est abaissé (Weill and Batteux 2003).

Les leucocytes

Au cours de l'inflammation, on observe généralement une hyperleucocytose. Les endotoxines bactériennes stimulent la production d'IL-1 qui agit sur la moelle osseuse pour augmenter la production de polynucléaires neutrophiles (PNN) dont les formes jeunes sont libérées dans le sang. Certaines chémokines exercent un effet ciblé sur certaines lignées de cellules sanguines : l'IL-8 sur le PNN, l'éotaxine sur l'éosinophile, le MCP-1 (monocyte chemo attractant) sur les monocytes. Toutefois, l'hyperleucocytose n'est pas constante dans les syndromes inflammatoires.

Les plaquettes

On note parfois une hyperplaquettose qui peut atteindre 10^6 plaquettes/mm³. Les interactions plaquettes-cellules endothéliales et leucocytes-cellules endothéliales jouent un rôle déterminant au cours d'une réaction inflammatoire, notamment grâce à l'action des molécules d'adhérence qui existent sous forme soluble dans le plasma.

1.3.2. L'électrophorèse des protéines sériques

Au cours du syndrome inflammatoire, on note des modifications des taux des protéines plasmatiques (Dubost et al. 1994; Weill and Batteux 2003). Certaines de ces modifications sont liées à l'activité de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 qui agit sur la synthèse protéique des hépatocytes. Le profil électrophorétique normal permet d'individualiser cinq fractions de l'anode vers la cathode (figure 8) :

1. l'albumine (33 à 50 g/L),
2. les α 1-globulines (1.5 à 4 g/L) qui comprennent l' α 1-antitrypsine, l'orosomucoïde et l' α 1-antichymotrypsine ;
3. les α 2-globulines (6 à 10 g/L) qui comprennent notamment l' α 2-macroglobuline, l'haptoglobine, la céruloplasmine ;
4. les β 2-globulines (6 à 13 g/L) qui comprennent notamment la transferrine, le composant C3 du complément
5. les γ -globulines (7.5 à 16 g/L) qui comprennent les immunoglobulines.

On sait que le foie produit les protéines de mobilité plus rapide que les γ -globulines alors que le tissu lymphoïde sécrète les protéines migrant dans la zone des γ -globulines. Ceci permet de distinguer d'un seul coup d'œil deux grands aspects pathologiques différents.

L'électrophorèse des protéines peut confirmer le syndrome inflammatoire en cas d'augmentation des fractions α 1 et α 2 globulines associée à une hypoalbuminémie mais doit être obligatoirement complétée par le dosage quantitatif des protéines totales du sérum.

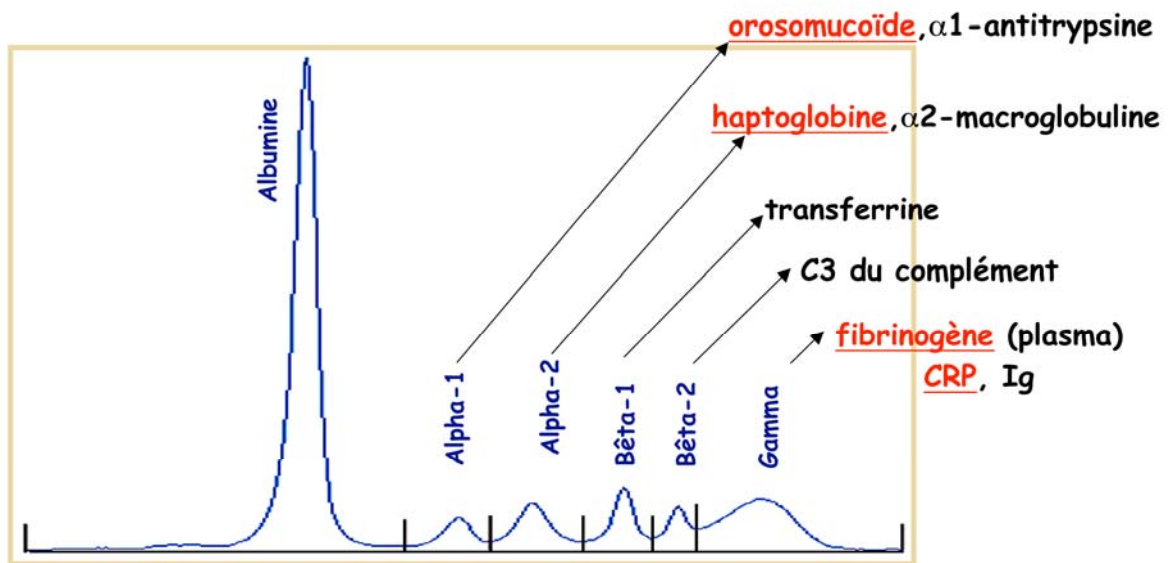


Figure 8 - Profil électrophorétique normal (d'après Prin et al. 2009)

1.3.2.1. Principe de l'électrophorèse

L'examen sépare les protéines du sérum en les soumettant à un champ électrique (Payment and Trudel 1989). Placées dans un milieu basique, ces molécules amphotères acquièrent une charge globale négative et, sous l'influence du champ électrique, migrent de la cathode vers l'anode. Ainsi séparées, les différentes fractions protéiques peuvent être colorées puis mesurées par densitométrie optique (mesure des quantités de colorants fixées le long du support).

En pratique quotidienne, on utilise l'électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose en tampon véronal sodique à pH=8,7. Une seule goutte de sérum suffit à l'examen mais le prélèvement ne doit pas être hémolysé. On n'utilise pas le plasma ce qui explique l'absence de fibrinogène sur les bandes. Les résultats de cet examen sont présentés sous deux formes :

1. Un graphique, résultat de l'intégration par densitométrie de la bande d'électrophorèse
2. Des valeurs chiffrées pour chacune des fractions : pourcentage et concentration en g/L calculés à partir de la protidémie totale ainsi que le rapport albumine/globulines.

1.3.2.2. Variations physiopathologiques de la protidémie

Le taux moyen des protéines sériques (prélèvement sur tube sec) est de 65 à 80 g/L chez l'adulte sain. Dans le plasma (prélèvement sur anticoagulant) cette valeur est majorée d'environ 3 g/L du fait de la présence du fibrinogène et de l'ensemble des protéines de la coagulation.

Les protides totaux à la naissance ne dépassent pas 40 à 60 g/L mais le rapport albumine/globuline (1,2 à 1,8) est le même chez l'enfant et l'adulte.

Chez le nourrisson, les gammaglobulines sont basses et il faudra attendre l'âge de 2 ans avant d'atteindre les valeurs de l'adulte.

Les hyperprotidémies sont dues à

- une augmentation de la masse protéique totale circulante : dysglobulinémie mono ou polyclonale
- une diminution de l'eau vasculaire (hémococoncentration) : insuffisance d'apports
- une perte liquidienne (coup de chaleur, diarrhée, vomissement).

Les hypoprotidémies sont dues à :

- une diminution de la masse protéique totale circulante : défaut d'apport (malnutrition), d'absorption, de synthèse hépatique, déperdition protéique (cutanée, rénale ou intestinale).
- une hémodilution : surcharge hydrique.

1.3.2.3. Modifications du protéinogramme au cours de la réponse inflammatoire

Modification de la fraction d'albumine

Hypoalbuminémie : L'albumine est exclusivement produite par le foie. La diminution de son taux sera toujours due à l'un des quatre mécanismes suivants :

- une diminution de sa synthèse due à une insuffisance hépatocellulaire (cirrhose, hépatites), inflammation
- un hyper catabolisme dû à des endocrinopathies acquises (thyrotoxicose, syndrome de Cushing), syndromes inflammatoires sévères
- une perte accrue de l'organisme : fuite urinaire, digestive ou cutanée
- une insuffisance d'apport : dénutrition chronique sévère

Hyperalbuminémie : Elle est sans signification pathologique chez le sujet sain mais chez le sujet hospitalisé elle traduit une hémococoncentration locale ou systémique ou bien elle est due à une perfusion d'albumine.

Modification des zones des α -1-globulines et α -2-globulines

Augmentation : on observe une augmentation dans les deux zones surtout dans les syndromes inflammatoires en raison de la localisation électrophorétique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

Lors d'un syndrome néphrotique on observe également une augmentation de la zone des α -2-globulines.

Diminution : on observe une diminution par insuffisance hépatocellulaire, dénutrition, fuite protéique ou hémolyse intra vasculaire.

Modifications de la zone des β -globulines

Augmentation : on a une hyper β -1globulinémie par hypertransferrinémie dans les anémies ferriprives.

On observe une hyper β -2globulinémie par hypercomplémentinémie C3 d'origine inflammatoire ou secondaire à une obstruction biliaire.

La zone β augmentée dans son ensemble et associée à un bloc β - γ traduit une cirrhose.

Diminution : on observe une diminution par insuffisance hépatocellulaire, une dénutrition, une fuite protéique en rapport avec une diminution de la transferrine migrant en zone γ -1.

On observe également une diminution par hypocomplémentémie C3 de consommation associée à une diminution de la zone β -2 qui correspond plus généralement à un sérum vieilli dont l'électrophorèse n'a pas été pratiquée le jour même.

Modifications de la zone des γ -globulines

Augmentation : Deux types d'augmentation se retrouvent :

1. une polyclonale correspondant sur le profil électrophorétique à une augmentation diffuse. On l'observe dans les syndromes inflammatoires d'origine hépatique, infectieuse ou auto-immune.
2. une monoclonale correspondant à un pic étroit, homogène, sur le profil électrophorétique. On l'observe lors de gammopathies bénignes, malignes (myélome) ou d'accompagnement (lymphomes).

Diminution : on observe une diminution chez le nourrisson (hypogammaglobulinémie physiologiques), lors de déficits immunitaires ou suite à l'utilisation de corticoïdes, d'immunosuppresseurs...

1.3.3. La vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation ou VS reste un examen très utilisé. C'est un examen biologique simple pour détecter un syndrome inflammatoire mais dont il faut bien en connaître les limites. Des facteurs physiologiques ou des situations non inflammatoires peuvent l'augmenter. Sa normalité peut parfois rassurer à tort (Weill and Batteux 2003).

De plus, il faut savoir que les cas d'une VS augmentée isolée ne sont pas rares (20%) !

En cas d'élévation de la VS, avant de conclure que cette élévation est due à un problème inflammatoire, il est indispensable de réaliser une électrophorèse des protéines sériques pour éliminer une dysglobulinémie mono ou polyclonale.

Mesure de la vitesse de sédimentation

Cette analyse consiste à mesurer, en millimètres, la hauteur de la colonne de sédiments constitués par les éléments du sang et les protéines sériques, lorsque le sang est mis dans un étroit tube appelé tube de Westergren, dressé à la verticale.

Les protéines de l'inflammation sont responsables d'une modification de la viscosité plasmatique, qui conduit à l'empilement des hématies en "rouleaux " qui sédimentent plus vite que les hématies

isolées. La première lecture de résultats se fait au bout d'une heure ; la deuxième au bout de deux heures et la troisième après vingt quatre heures. Bien que classiques, les mesures de la VS à la deuxième et vingt quatrième heure sont inutiles car elles n'apportent pas plus de renseignement qu'une mesure à la première heure. Les valeurs standards de la VS sont données dans le tableau I.

Tableau I - Valeurs standards de la VS chez l'être humain

| | Homme | Femme |
|-------|-------|-------|
| Jeune | <15 | <20 |
| Agé | <20 | <25 |

La VS de la deuxième heure est considérée comme normale lorsqu'elle est inférieure à 20 mm.

Augmentation non pathologiques de la VS

- la mesure de la VS n'est pas pratiquée pendant la grossesse car à partir du 2^{ème} trimestre, elle est régulièrement élevée et des valeurs de 40-50 mm sont habituelles.
- La prise de médicaments tels les estro-progestatifs, l'héparine... accélèrent la VS.
- Une erreur technique comme l'utilisation d'un tube non vertical ou non immobile, une température ambiante trop élevée, un prélèvement mal anti-coagulé peuvent fausser les résultats
- Au-delà de 50 ans la VS croît avec l'âge, surtout chez les femmes ménopausées.
- Une anémie sévère entraîne une multiplication par 2 voire 3 de la VS.

Accélération pathologiques de la VS

Une accélération de la VS indique un état inflammatoire sans préjuger de sa nature ; elle peut être d'origine :

- infectieuse, qui est la cause la plus fréquente. Après guérison d'une infection grave, la VS peut rester accélérée pendant plusieurs mois mais elle doit diminuer régulièrement.
- Tumorale
- Métabolique (crise de goutte)
- Non spécifique : maladies auto-immunes, sarcoïdose

VS faussement basse

Ici, la VS reste basse alors qu'il y a un syndrome inflammatoire. On retrouve cette situation dans les cas suivants :

- une polyglobulie : par un phénomène électrostatique, les globules rouges se repoussent quand l'hématocrite croît, ce qui fait chuter la VS

Thèse

- une hyperleucocytose
- un syndrome d'hyperviscosité
- des hémoglobinopathies
- un déficit de certaines protéines sériques : hypofibrinémie, hypohaptoglobulinémie...
- une prise de médicaments tels des anti-inflammatoires stéroïdiens (pas les anti-inflammatoires non stéroïdiens)

En conclusion, la mesure de la vitesse de sédimentation est un examen non spécifique : si l'on rencontre des valeurs pathologiques, il faut approfondir en effectuant d'autres analyses et en étudiant la numération de la formule sanguine.

2. Les protéines de l'inflammation

2.1. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation

La mesure de la vitesse de sédimentation (VS) est certes un examen peu coûteux et simple à réaliser, il n'est cependant ni spécifique ni sensible et varie très lentement dans le temps. Il est donc utile de procéder à un dosage d'une protéine de cinétique rapide et de grande amplitude de réponse (Autier et al. 2004; Caquet 2008; Weill and Batteux 2003).

2.1.1. Les protéines d'apparition précoce

2.1.1.1. La Protéine C Réactive ou PCR

Après stimulation, on la décèle dès la 6^{ème} heure dans le sang. Le taux sérique normal de la PCR est compris entre 5 et 10 mg/L. Elle est synthétisée par le foie. Il n'y a pas de variations nyctémérales. La PCR n'augmente pas ou très peu au cours des infections virales. Son dosage est donc très intéressant pour distinguer les infections bactériennes des infections virales. Sa demi-vie est de 12 heures.

2.1.1.2. L'orosomucoïde

L'orosomucoïde ou α 1-glycoprotéine acide est le principal membre du groupe des séromucoïdes. C'est une protéine très glycosylée, de masse moléculaire de 40 KDa. Elle est synthétisée par le foie mais aussi par des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes. La demi-vie sérique est de 48 h. Sa concentration de base chez le nouveau-né atteint 0,4 à 0,8 g/l au bout d'un mois et augmente avec l'âge jusqu'à 1,5 g/l. Elle est diminuée pendant la grossesse et en cas d'insuffisances rénales ou hépatiques. Son délai d'apparition dans le sang suite à un stimulus est de 12 h. Son taux suit un rythme circadien et culmine à midi.

2.1.2. Les protéines d'apparition plus tardive

2.1.2.1. L' α 1-antitrypsine

C'est une glycoprotéine de 54 KDa. Elle est synthétisée par le foie et les lymphocytes. Sa demi-vie sérique est de 4 jours. Son taux sérique normal est compris entre 2 et 4 g/l. La production de cette protéine est soumise à un rythme circadien.

2.1.2.2. L'haptoglobine

Elle est aussi appelée α 2-globuline. Elle se complexe avec l'hémoglobine libre pour le recyclage du fer et est rapidement éliminée par le système des phagocytes mononucléés. Son taux sérique est compris entre 0,5 et 2 g/L et suit un rythme circadien avec un pic à 8 heures. On observe une élévation de son taux sérique 12 h après le début de l'inflammation pour atteindre son maximum 24 à 36 h plus tard. Sa demi-vie est de 3 à 6 jours. Le taux est inférieur à la normale lors d'une hémolyse, d'un traitement par Dapsone (hémolyse), d'une insuffisance hépatique sévère ou chez un nouveau-né. Il est supérieur à la normale lors d'une réaction inflammatoire chronique.

2.1.3. Les autres protéines de l'inflammation

2.1.3.1. Le fibrinogène

C'est une glycoprotéine de 341 KDa. Elle est synthétisée par les hépatocytes et les mégacaryocytes. Le fibrinogène joue un rôle majeur dans la coagulation. Son taux plasmatique normal est compris entre 2 et 4 g/L et augmente avec l'âge et la grossesse. Ses variations suivent un rythme circadien avec un pic à 18 heures. On observe une augmentation du taux à la 24^{ème} heure suite à une inflammation aiguë ; il atteint son maximum en 2 à 3 jours. C'est l'excès de fibrinogène qui est en grande partie responsable de l'augmentation de la VS.

2.1.3.2. La β 2-microglobuline

Cette protéine de 11,8 KDa est libérée dans le sérum, est filtrée par les glomérules rénaux, réabsorbée et catabolisée dans les tubes contournés proximaux. Son taux sérique s'élève lorsque la filtration glomérulaire diminue ou lorsque sa production augmente pendant les infections virales par exemple.

2.1.3.3. La fraction C3 du complément

L'hypercomplémentémie est constante quand l'inflammation n'est pas d'origine immunologique.

Il existe deux voies d'activation, l'une initiée par le complexe Antigène-Anticorps et l'autre, initiée par des substances naturelles (paroi bactérienne, venin..). Elles aboutissent au carrefour de la fraction C3 dont le clivage aboutit à la voie terminale et à l'action biologique.

Une baisse de la fraction C3 est observée lors de l'activation du complément. Par exemple au cours d'endocardite, d'anémie hémolytique, de glomérulonephrite ou d'insuffisance hépatocellulaire sévère. La fraction C3 augmente en cas de syndrome inflammatoire et de cirrhose biliaire primitive.

Le taux normal de la fraction C3 est de 0,15 à 2 g/L et ne varie pas avec l'âge.

2.1.3.4. Le composant amyloïde P

Le composant amyloïde P (SAP) est une glycoprotéine formée de dix peptides glycosylés organisés en deux disques pentamériques liés entre eux de façon non covalente.

Son taux sérique est de 33+/-10 mg/ml chez les sujets normaux et peut atteindre 100 mg/ml en cas de cancers ou d'inflammation.

2.1.3.5. La protéine SAA (serum amyloid associated)

C'est une apolipoprotéine de type HDL qui épure le cholestérol lors de la réaction inflammatoire. Elle est synthétisée par le foie, les poumons, les reins, l'intestin. Son taux normal est de 2,5 mg/L et sa demi-vie est de 1 jour. On observe une élévation précoce du taux de SAA lors de réaction inflammatoire, celui-ci pouvant atteindre 50 à 1000 mg/L.

L'élévation du taux de la SAA est plus spécifique que celui de la PCR mais elle n'est malheureusement pas dosable en ville.

2.1.3.6. La procalcitonine

Cette protéine de 116 acides aminés pourrait également être un marqueur utile à doser lors des syndromes inflammatoires puisqu'elle n'augmente qu'au cours des infections bactériennes.

On retrouve une comparaison des différentes protéines lors du processus inflammatoire dans le tableau II.

Tableau II - Evolution des protéines de la phase aiguë au cours du processus inflammatoire

| protéines | délai après le début de la réponse inflammatoire | | | | |
|--------------|--|-----|-----|------|------|
| | 6h | 12h | 1j | 2-3j | 1sem |
| PCR | + | ++ | +++ | ++ | + |
| OROSOMUCOÏDE | | + | ++ | +++ | ++ |
| HAPTOGLOBINE | | + | + | +++ | + |
| FIBRINOGENE | | | + | ++ | + |

L'amplitude de variation est différente d'une protéine à l'autre :

- x1,5 fraction C3, céruloplasmine
- x2-4 Orosomucoïde, alpha-1-antitrypsine, alpha-1-antichymotrypsine, fibrinogène, haptoglobine
- x1000 PCR, SAA
- Diminué : Albumine, Transferrine

2.1.3.7. Les cytokines

Il existe des trousse de dosages des cytokines de l'inflammation mais elles ne sont pas utilisées au cabinet de pédiatrie. En effet, l'utilisation d'anticoagulant lors du prélèvement peut entraîner la sécrétion de nouvelles cytokines in vitro et ainsi fausser le dosage.

2.1.4. Critères de la protéine idéale de l'inflammation

Ses variations ne dépendent que du syndrome inflammatoire.

En effet, différents facteurs peuvent influencer la concentration sérique des protéines de la phase aiguë : par exemple, les estrogènes augmentent la concentration en α 1-antitrypsine mais diminuent la concentration en orosomucoïde (Chabanne et al. 2006).

Elle est élevée quelque soit l'étiologie de l'inflammation.

Prenons le cas de la PCR : son taux est élevé lors d'une infection bactérienne mais pas dans les viroses. Dans ce cas, on préférera le dosage de l' α 1 antitrypsine qui est un meilleur marqueur d'infection d'origine virale.

Elle a une cinétique rapide.

La protéine idéale doit voir son taux s'élever très rapidement et revenir également rapidement à la normale grâce à sa demi-vie courte, permettant ainsi un meilleur suivi de l'évolution de la pathologie.

Elle s'élève fortement pour un syndrome inflammatoire modéré.

L'haptoglobine correspond bien à ce critère.

Sa détermination est simple et précise.

Evidemment, aucune protéine ne remplit tous ces critères. Il sera donc utile de doser des protéines de caractéristiques complémentaires :

- une protéine à demi-vie courte, de cinétique rapide et de grande amplitude de variations : la PCR constitue le modèle des marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation.
- une protéine ayant une réponse plus lente et une demi-vie plus longue : l'haptoglobine et l'orosomucoïde sont de bons marqueurs de la phase chronique de l'inflammation.

La société française de biologie clinique a proposé le dosage couplé de la PCR avec celui de l'haptoglobine et/ou de l'orosomucoïde pour le diagnostic et le suivi des maladies inflammatoires.

3. La Protéine C réactive

3.1. Historique

1930 : Découverte par William Tillet et Thomas Francis d'une protéine qui réagit avec le polysaccharide C du pneumocoque dans le sérum de patients présentant une inflammation aiguë (Ablj 2002).

1941 : Oswald Avery et Maclyn McCarty nomment la protéine de la phase aiguë de l'inflammation, protéine C réactive (Black et al. 2004).

1950 : Irving Kroop met en évidence l'augmentation de la concentration de la protéine C réactive après une ischémie coronarienne ou suite à une nécrose d'une partie du myocarde (Ridker 2008).

1979 : Oliveira décrit la structure primaire de la protéine.

1985 : John Volanakis et d'autres chercheurs identifient la structure pentamérique, l'importance de la présence du calcium pour la liaison de la protéine avec ses ligands, son site de production...

De nos jours : des études sont en cours pour mettre en rapport des variations du taux de protéine C réactive avec diverses pathologies : diabète, affections cardiovasculaires (Agrawal et al. 2001)...

3.2. Structure de la Protéine C Réactive

La structure cristallographique de la protéine C réactive a été déterminée au rayon X avec une résolution de 3 angströms (Thompson et al. 1999; Volanakis 2001).

Tout comme la SAP (serum amyloïde protein), une autre pentraxine de structure connue et ayant servi de modèle lors de la détermination de sa structure, la protéine C réactive est constituée de cinq sous-unités non covalentes, arrangées de manière symétrique autour d'un pore central (figure 9).

Le diamètre du pentamère est de 102 angströms, le diamètre du pore central est de 30 angströms et celui d'une sous-unité est de 36 angströms.

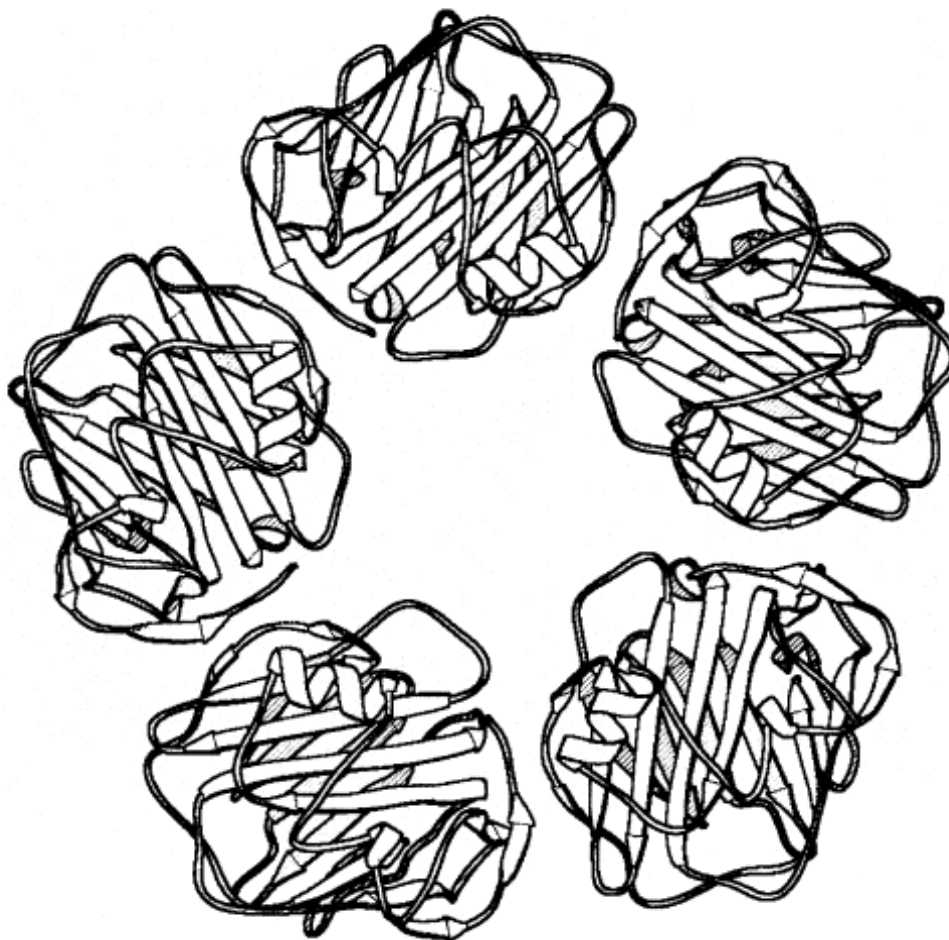


Figure 9 - Structure pentamérique de la protéine C réactive (Volanakis 2001)

Une sous unité est constituée de 206 acides aminés repliés en deux feuillets bêta antiparallèles. Cette structure est très similaire à celle de la SAP même si chacune garde des caractéristiques propres.

Après avoir effectué une rotation de 22° à une sous unité de la SAP afin de les avoir dans le même plan, Ribbon met en évidence les principales différences structurales de la SAP et de la PCR (figure 10). Celles-ci se trouvent dans la longueur des feuillets bêta ainsi qu'au niveau de trois boucles (acides aminés 43-48, 68-72, 85-91).

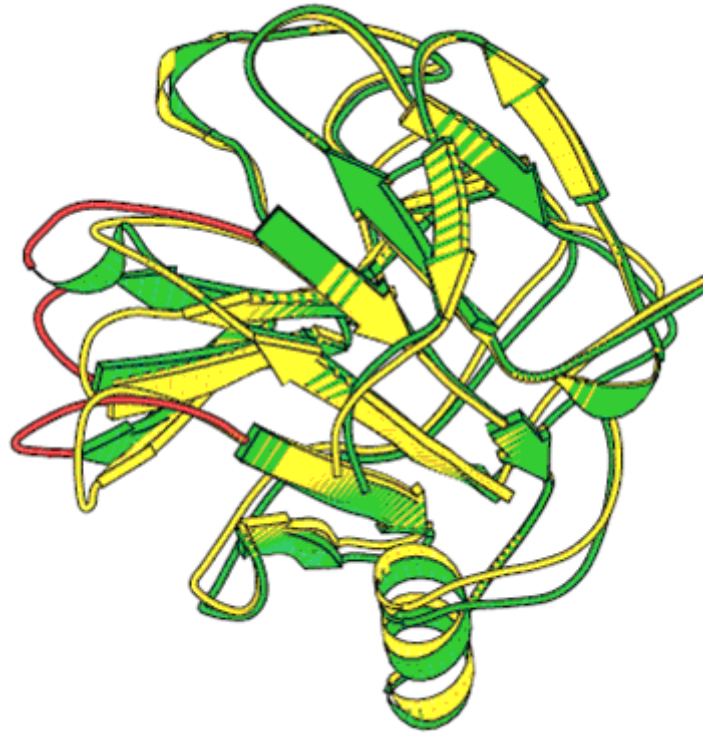


Figure 10 - Comparaison d'une sous-unité de PCR et de SAP (Thompson et al. 1999)

En jaune : une sous-unité de SAP ; en vert : une sous-unité de PCR

En rouge : les 3 boucles de la PCR qui constituent les régions qui diffèrent le plus entre les deux protéines.

Dans la chaîne de la Protéine C réactive, on retrouve une longue hélice alpha allant des acides aminés 168 à 176 ; elle est coincée contre un des deux feuillets bêta.

L'extrémité carboxylique de l'hélice et la boucle allant de l'acide aminé 177 à 182 constituent l'un des deux cotés d'une inhabituelle cavité qui s'étend du centre de la sous unité jusqu'au pore central (figure 11). L'autre coté de la cavité est formé des extrémités amines et carboxyliques de la sous unité. Cette cavité est étroite et profonde à son origine puis elle devient de moins en moins profonde au fur et à mesure que l'on se rapproche du pore central du pentamère.

Les zones où se trouvent les deux acides aminés His (38 et 95) ainsi que celle où se trouve Trp205 ressortent du coté peu profond de la cavité alors que la partie de la chaîne contenant Asn160 et Asn158 est située plus au centre de la cavité.

Les sites de liaison du C1q et peut être celui du FcR sont associés à cette cavité.

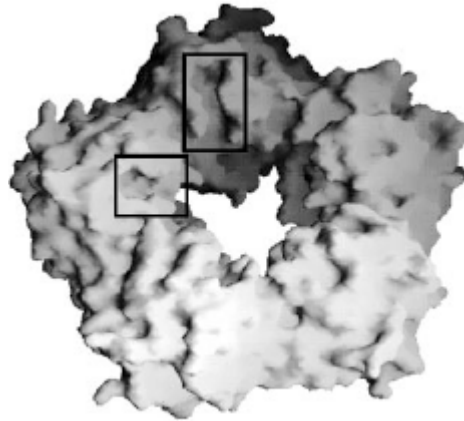


Figure 11 - Cavités présentes sur chaque sous unité (Thompson et al. 1999)

De l'autre côté des sous unités, deux ions calcium sont liés aux chaînes latérales et à la principale chaîne carbonyle de la chaîne polypeptidique à une distance de 4 angstroms l'un de l'autre (figure 12).

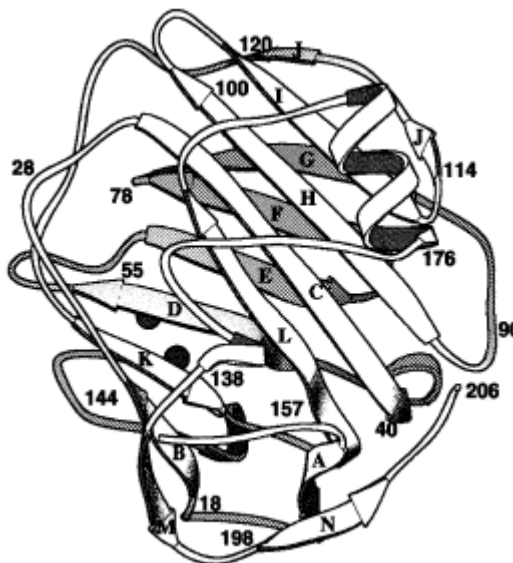


Figure 12 - Représentation par deux sphères des deux ions calcium (Volanakis 2001)

Les deux ions calcium sont nécessaires à la fixation d'un ligand.

Grâce à l'observation au microscope à électrons, on sait que lors de l'assemblage du pentamère, chaque sous unité a la même orientation. Ainsi le pentamère a deux faces : une face dédiée à la reconnaissance utilisant les cinq sites de liaison à la phosphocholine et une face effectrice contenant le site de liaison au C1q et vraisemblablement celui du FcR.

Les interactions entre sous unités sont constituées de ponts salins et se situent principalement au niveau de la boucle allant du 115^{ème} acide aminé au 123^{ème} de la première sous unité et au niveau des 197 à 202^{ème} de la sous unité voisine.

Chez la SAP, les interactions entre sous unités se font grâce à des liaisons de Van Der Waal et des ponts hydrogénés ; elles couvrent 1650 angstroms carré soit 20% de la surface totale de chaque sous unité. Cette surface est quasiment la même chez la protéine C réactive.

Contrairement à la SAP où toutes les sous unités sont dans le même plan, les sous unités de la protéine C réactive sont inclinées de 15 à 20° par rapport à un axe quasiment parallèle à l'hélice alpha et allant jusqu'au centre de la sous unité. Il a été suggéré que la position de ces sous unités est stabilisée par des liaisons cristallines ce qui explique pourquoi elles peuvent tourner autour de leur axe, autorisant ainsi de nombreuses liaisons possibles au pentamère avec les cellules.

Site de liaison de la phosphocholine

La protéine C réactive se fixe aux résidus phosphocholine des bactéries et aux phospholipides des corps apoptotiques permettent ainsi l'activation de la voie classique du complément et la phagocytose. Elle agit comme une opsonine.

Par contre, la protéine C réactive ne se lie pas à la phosphorylcholine présente dans la structure phospholipidique des membranes des cellules humaines.

Le site de liaison à la phosphocholine est constitué de deux ions calcium liés à la chaîne polypeptidique qui constitue une sous unité et d'une poche hydrophobe voisine formée des acides aminés Phe66, Leu64 et Thr76.

Le 1^{er} ion calcium est reconnu par les acides aminés Asp60, Asn61, Glu38, Asp140 et la chaîne principale carbonyle du Glu139.

Le second ion calcium est reconnu par Glu138, Asp140, Glu150 et Glu147 ; ce qui permet la fixation d'un ou deux ligands. Les deux sites ont une affinité identique pour les ions calcium.

L'analyse cristallographique du complexe protéine C réactive – phosphocholine a démontré que deux des atomes d'oxygène du groupement phosphate interagissent avec les deux ions calcium liés alors que le groupement choline reste à l'intérieur de la poche hydrophobe (figure 13).

On retrouve des liaisons hydrophobes entre Phe66 et les 3 groupements méthyle de la choline alors que la chaîne latérale du Glu81, qui est située de l'autre côté de la poche hydrophobe interagit avec les charges positives de l'ammonium quaternaire de la choline.

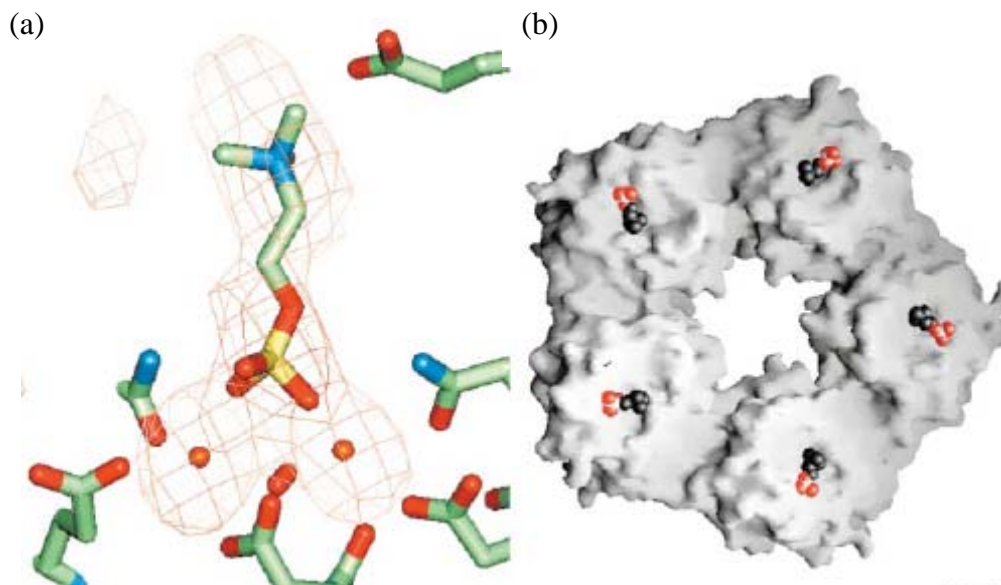


Figure 13 - a :position des deux ions calcium (orange) et d'une molécule de phosphocholine ; b :représentation illustrant le positionnement des 5 molécules de phosphocholine (orange et noir) sur la protéine C réactive (Thompson et al. 1999)

Des études où des mutations de certains acides aminés ont été effectuées démontrent l'importance de la poche hydrophobe dans la liaison avec la phosphocholine (figure 14).

Le remplacement de Thr176 par une Tyr entraîne une baisse importante de l'affinité des ligands pour la phosphocholine, ceci serait dû à la chaîne latérale de la Tyr qui encombrerait en partie la poche hydrophobe.

Le remplacement de la Trp67 par une Lys entraîne également une baisse de l'affinité très certainement parce que cette mutation change l'orientation de la Phe66 ; elle pourrait apparemment aussi entraîner la perte d'un des deux ions calcium.

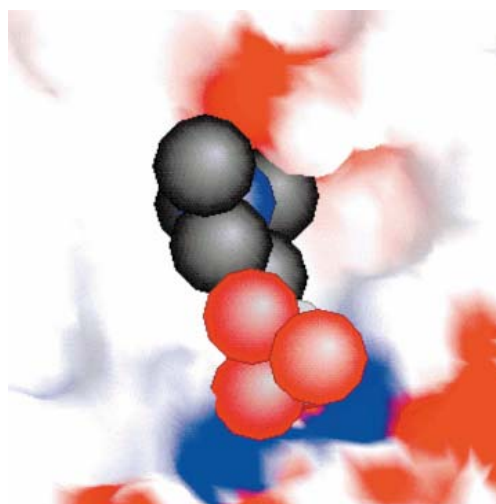


Figure 14 - Représentation GRASP du site de liaison à la phosphocholine montrant la poche hydrophobe libre (Thompson et al. 1999)

Site de liaison au C1q

La fixation de la PCR au composant C1q déclenche l'activation de la voie classique du complément.

La structure du site de liaison au C1q a elle aussi été identifiée suite à des expériences où l'on a procédé à des mutations dans la séquence polypeptidique (Agrawal et al. 2001; Thompson et al. 1999).

Ce site se trouve du coté effecteur de chaque sous unité, au niveau de l'extrémité peu profonde de la cavité, dans une poche. Les limites de cette poche sont constituées, d'une part par les boucles allant de l'acide aminé 86 à 92 et 112 à 114, et d'autre part, par l'extrémité C terminale de la chaîne de la sous unité ainsi que de Tyr 175. Les acides aminés Asp112 et Tyr175 permettent la liaison avec le C1q. Si on les remplace par Ala, on assiste alors à une baisse de l'affinité pour le C1q ainsi qu'à une diminution de la capacité à activer le complément. Le Glu88 semble influencer le changement de conformation du C1q nécessaire à l'activation du complément alors que Asn158 et His38 permettent certainement le maintien de la bonne configuration géométrique du site de liaison.

3.3. Régulation de l'expression du gène de la protéine C réactive

Les deux principales caractéristiques de la PCR sont (Murphy et al. 1995; Volanakis 2001):

- L'augmentation rapide de sa concentration dans le sérum pendant la phase d'inflammation. Celle-ci peut atteindre 1000 fois son taux basal.
- Un retour rapide au taux normal qui est très bas

L'expression de la PCR est régulée principalement au niveau de la transcription, mais des mécanismes post-traductionnels entrent également en jeu. Le gène de la PCR est localisé sur le chromosome 1 humain entre 1q21 et 1q23 ; il comprend 2263 nucléotides et 1 intron.

Le transcrit est caractérisé par la présence d'une longue région non traduite en 3', elle fait 1,2 kb. Elle est peut être responsable de la dégradation rapide de la protéine suite à la restauration de la structure du tissu et de sa fonction.

La synthèse de la PCR se fait dans le foie. La régulation de la transcription de la PCR a été étudiée in vivo et in vitro. Les deux études démontrent que l'interleukine 6 (IL-6) est le principal inducteur du gène de la PCR, alors que l'interleukine 1 (IL-1), les glucocorticoïdes, et d'autres facteurs dont les produits de l'activation du complément agissent en synergie avec IL-6 pour augmenter son effet (figure 15 et 16) (Ganter et al. 1989).

L'IL-1 agit par divers mécanismes incluant certainement la modulation de la traduction de l'ARNm.

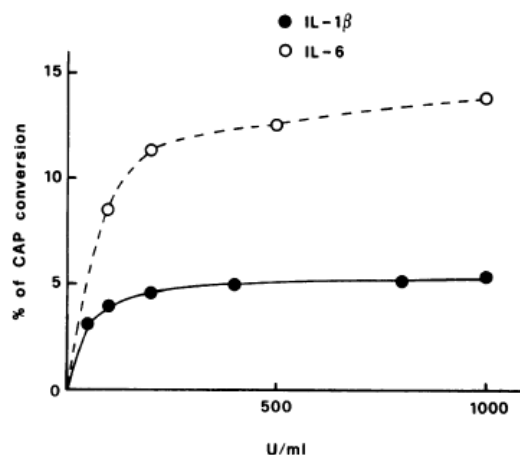


Figure 15 - Courbe dose-réponse montrant les effets de IL-6 et IL-1 sur l'activation du promoteur du gène de la PCR (Ganter et al. 1989)

De nos jours, cartographier les éléments indispensables au fonctionnement d'un promoteur eucaryote est une tâche relativement facile. Il existe des stratégies de mutagenèses rapides qui permettent de modifier les séquences des promoteurs et de les réintroduire ensuite dans des cellules en culture. Le paramètre mesuré dans ces expériences est souvent l'activité d'un gène rapporteur. Ce gène est couplé au promoteur étudié de manière à être transcrit comme l'ARN du gène d'intérêt. Les gènes rapporteurs codent le plus souvent pour une protéine dont la quantité est facilement mesurable. On utilise le gène bactérien codant pour la chloramphénicol acétyltransferase : CAT qui acétyle un antibiotique : le chloramphénicol.

Mesurer l'activité de cette enzyme est plus simple et souvent plus sensible que de mesurer la quantité d'ARNm.

Des études ont démontré que le promoteur du gène de la PCR lié à la bactérie CAT n'est pas actif lorsqu'il est transféré dans des cellules humaines de la lignée Hep3B. Cependant, si on incube ces cellules pendant 24 à 48 h dans un milieu contenant en plus 10% de MoCM (monocyte conditioned medium), la transcription se fait correctement et on observe une importante activité de la CAT.

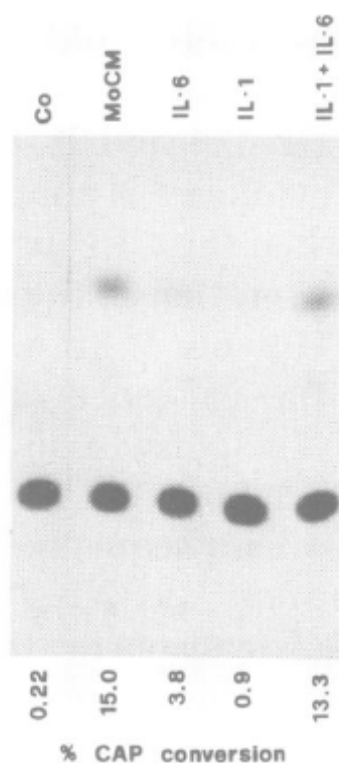


Figure 16 - Coopération entre IL-6 et IL-1 (Ganter et al. 1989)

On remarque ici la coopération entre IL-6 et IL-1. On obtient un résultat pratiquement identique à IL-6 + IL-1, en utilisant MoCM (90% de MoCM).

Remarque : le « % CAP conversion » correspond au rapport de chloramphénicol acétylé sur le chloramphénicol total, et nous permet donc d'avoir une idée de l'importance de l'activation du promoteur.

L'action d'autres cytokines a été étudiée : ni le TNF (facteur tumoral nécrotique), ni l'interleukine 2, ni l'interféron gamma seuls ou combinés avec IL-6 n'entraînent une augmentation de l'activité de la CAT. L'activation du promoteur n'est pas non plus influencée par la forskoline ni par la caféine.

3.4. Métabolisme

3.4.1 Synthèse

Le site de synthèse de la PCR a été étudié par Hurlimann. Lors de ses travaux, il a utilisé des tissus et organes provenant de lapins, de singes...

Par hépatectomie ou par autoradiographie de coupes tissulaires avec incorporation d'acides aminés marqués au carbone 14, il a démontré que la PCR était produite par les hépatocytes.

Ce sont les bactéries qui induisent la production par les macrophages de l'IL-6 qui entraîne la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes.

Après un stimulus, la synthèse démarre dans les hépatocytes périportaux. Puis la production s'étend successivement aux hépatocytes voisins jusqu'à la veine centrolobulaire.

L'évolution se fait concentriquement jusqu'au centre du lobule.

Grâce au microscope à électrons, on observe suite à un stimulus, une accumulation de la protéine C réactive dans les membranes et la lumière de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique granuleux et du réticulum endoplasmique lisse (Kushner and Feldmann 1978).

3.4.2. Diffusion

On a mis en évidence la PCR dans le sang, les liquides céphalorachidien, synovial, amniotique, pleural... La PCR ne passe pas la barrière foeto-placentaire et ne se trouve pas dans le lait maternel (Mery Pignon 1992).

3.4.3. Demi-vie et catabolisme

La demi-vie de la PCR chez l'homme est courte : environ 12 heures.

Son catabolisme n'est pas encore tout à fait connu (Mauris et al. 2005; Villiamier 1989).

3.4.4. Méthodes de dosages de la PCR

Le choix d'une technique se fait en fonction de :

- la sensibilité,
- la spécificité,
- le matériel disponible,
- le coût,
- le nombre de test à effectuer (automatisation, au coup par coup)
- le temps
- la nature du prélèvement
- la recherche d'anticorps ou d'antigène
- le résultat : qualitatif, semi quantitatif, quantitatif

De nombreuses techniques ont été mises au point au cours de l'histoire pour doser les protéines dont la protéine C réactive mais deux seulement sont actuellement utilisées par les laboratoires d'analyse (Descoutures 2005). Il s'agit de deux techniques d'immunoprécipitation en milieu liquide : la technique d'immunonephélométrie et celle d'immunoturbidimétrie.

Les laboratoires utilisent préférentiellement la technique d'immunoturbidimétrie car c'est la moins onéreuse. Ces deux techniques sont rapides et automatisées ; elles permettent un dosage quantitatif précis. Un dosage ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) aurait été possible mais n'étant pas automatisable et beaucoup plus long, il n'est pas utilisé (données fournies par le laboratoire d'analyse médicale Aubert, Maxéville)

La mesure par turbidimétrie est basée sur l'absorption de la lumière par des complexes immuns en milieu liquide. Elle nécessite, à la sortie, un spectrophotomètre d'une grande sensibilité. Les deux principaux problèmes rencontrés sont : l'excès d'antigène et les interférences (hémolyse, hyperlipémie).

La mesure par néphélométrie, quant à elle, est basée sur la propriété de déviation de la lumière d'un rayon laser par les complexes immuns en milieu liquide. Un rayon laser traverse le tube et la diffraction de la lumière est mesurée à la sortie. Plus il y a de complexes immuns plus le signal sera important sur le photomultiplicateur (appareil mesurant la diffraction) (Cerba 2007).

3.4.5. Variations physiologiques et pathologiques

La valeur normale de la protéine C réactive est inférieure à 5 mg/L. Néanmoins, des valeurs allant jusqu'à 10 mg/L sont acceptées et considérées comme non pathologiques.

La valeur peut être légèrement augmentée chez la femme enceinte ainsi que chez un gros fumeur.

L'obésité entraîne elle aussi une augmentation de la valeur ; en effet, les adipocytes produisent de grande quantité de PCR et d'IL-6.

Une prise de corticoïdes, d'anti-inflammatoires ou de statines entraîne une diminution de la PCR.

On observe une augmentation du taux de PCR lors de :

- D'état inflammatoire
- Pathologie bactérienne
- IR chronique (insuffisance rénale chronique) au stade de dialyse ou juste avant
- Maladie d'Alzheimer
- Cancer
- Asthme
- Arthrose

3.4.6. Intérêt de la Protéine C Réactive

De nombreuses études ont établi le lien entre une PCR élevée et diverses manifestations de l'athérosclérose. La PCR est augmentée dans l'angor chronique tout comme lors des syndromes coronariens aigus. Son taux est proportionnel à l'extension et à la sévérité des lésions (Deron 2003; Ridker 2008). Il a été démontré que chez les sujets appartenant au quantile supérieur de la distribution de la PCR, le risque relatif d'infarctus était multiplié par 3 et celui d'AVC par 2 par rapport au sujet appartenant au premier quantile.

Des études ont également démontré une corrélation entre un taux de PCR élevé et la présence de diabète (Marcovecchio et al. 2008).

Enfin la protéine C réactive est plus augmentée lors d'inflammation d'origine bactérienne que lors d'infection d'origine virale. Le dosage de celle-ci permet au médecin, après validation ou non de son hypothèse initiale, de s'orienter quant au choix du traitement et des autres examens biologiques à effectuer. Il existe 3 problèmes ne permettant pas l'affirmation d'une infection bactérienne qui nécessitent des investigations complémentaires :

- De nombreuses pathologies différentes d'une infection bactérienne entraînent une augmentation de la PCR
- L'augmentation de la PCR ne se voit qu'après plusieurs heures après le début de l'infection : si la valeur est prise dans les 24 premières heures, la sensibilité ne sera pas très bonne
- Certaines bactéries telles les mycobactéries n'entraînent que très rarement une élévation de la PCR.

Les examens à effectuer pour affirmer le diagnostic bactérien et guider l'antibiothérapie sont :

- Des hémocultures
- Un examen bactériologique du LCR
- Un examen cyto bactériologique
- Le test du streptocoque A (Bourrillon 2005)

Au final, le dosage de la PCR permet de raccourcir la prise en charge des patients et de suivre l'évolution d'un traitement par antibiothérapie. En effet, un traitement efficace permet la diminution par moitié du taux de PCR toutes les 24 h. Il permet également de réduire les coûts de prise en charge d'un patient et d'éviter toute antibiothérapie lourde et inutile chez le jeune enfant.

PARTIE II - Etude personnelle réalisée

4. Justification de l'étude personnelle

4.1. Introduction

Nous nous intéressons au test rapide de dosage de la PCR en microméthode mais il faut savoir qu'il en existe d'autres comme le test de dépistage rapide du streptocoque A (Wollner and Cohen 2007), la bandelette urinaire, les tests de diagnostic rapide de la grippe, du rotavirus ou du virus respiratoire syncytial.

Lorsqu'un enfant arrive au cabinet médical avec de la fièvre et ne présente aucun signe de foyer infectieux, il s'agit en général d'une maladie bénigne le plus souvent virale mais parfois, le médecin peut se trouver confronté à une infection bactérienne sévère naissante et potentiellement invasive (pyélonéphrite, pneumonie...). Du fait de cette incertitude, de nombreux examens complémentaires sont demandés, des antibiotiques et des hospitalisations qui s'avèreront par la suite inutiles sont prescrits augmentant ainsi :

- le risque d'effets indésirables,
- le risque de contraction d'infections nosocomiales,
- le coût de la prise en charge
- la résistance des bactéries aux antibiotiques utilisés

Il est difficile de lutter contre la mauvaise utilisation des moyens mis à la disposition des médecins, l'emploi des TDR (tests de diagnostic rapide) devrait diminuer la fréquence de cette mauvaise utilisation.

En effet, une étude effectuée dans un groupe de 12 pédiatres suisses a démontré que l'utilisation du test rapide de dosage de la protéine C réactive est très importante quant à la décision d'effectuer d'autres examens de laboratoire. Elle joue également un rôle dans la décision de prescrire d'emblée une antibiothérapie (tableau III) ainsi que dans la détection précoce d'une infection bactérienne sérieuse.

L'étude portait sur 191 enfants présentant une fièvre isolée depuis 12 heures à 5 jours et une température rectale de plus de 38,5°C à la première consultation. 17 patients ont été exclus ne répondant pas aux critères d'inclusions ou ayant un suivi incomplet (Godard et al. 2000).

Tableau III - Relation entre PCR rapide et les décisions immédiates des 12 pédiatres (Godard et al. 2000)

| PCR (mg/L) | n | Décision immédiate : formule sanguine n=65 | | Décision immédiate : analyse d'urine n=58 | | Autres tests de labo n=29 | | Antibiothérapie d'emblée n=24 | |
|------------|-----|--|------|---|------|---------------------------|------|-------------------------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| < 25 | 101 | 31 | 30,7 | 16 | 15,8 | 3 | 2,9 | 0 | 0 |
| 25 à 50 | 47 | 20 | 42,5 | 23 | 48,9 | 13 | 27,6 | 8 | 17 |
| > 50 | 26 | 14 | 53,8 | 19 | 73 | 13 | 50 | 16 | 61,5 |

On remarque que pour une PCR < 25 mg/L :

- les pédiatres prescrivent dans 30,7% des cas une formule sanguine
- 15,8% des enfants ont eu une analyse d'urine
- Aucun n'a eu d'antibiothérapie

Par contre pour une PCR > 50 mg/L :

- une formule sanguine a été prescrite dans 53,8% des cas
- 50% des enfants ont effectué une analyse d'urine
- 61,5% des enfants ont reçu une antibiothérapie d'emblée.

On peut ainsi dire que, plus la PCR est élevée, plus les pédiatres sont enclins à prescrire des examens complémentaires ainsi qu'une antibiothérapie d'emblée.

Les opinions diffèrent quant au seuil critique de PCR à prendre en compte pour prédire une infection bactérienne sérieuse. Certains recommandent le seuil de 20 mg/L, d'autres 40 mg/L.

Toutefois, une PCR basse n'exclut pas une infection bactérienne et une PCR élevée n'est pas toujours synonyme d'une infection bactérienne sérieuse comme c'est, par exemple, le cas lors d'infections respiratoires d'origine virale.

Lors de cette étude, il a été démontré que le dosage rapide d'une PCR présentant une élévation précoce (12 h après le début de la fièvre) a favorisé le diagnostic rapide d'infection urinaire.

4.2. La méthode Nycocard CRP single test : description et qualités

La technique par microméthode est simple, elle ne nécessite que 5 microlitres de sang prélevés au bout du doigt. Le « Nycocard CRP single test » est un test immunologique en phase solide de type

sandwich. Il a obtenu le marquage CE et permet d'obtenir des résultats quantitatifs avec des bornes < 8 et > 200 mg/L en moins de 5 minutes (Cohen et al. 2008).

Le test rapide est moins douloureux et moins traumatisant pour l'enfant qu'une ponction veineuse et nettement moins angoissant pour les parents.

Plusieurs études aux urgences hospitalières ont démontré la fiabilité du dosage de la PCR par un test rapide réalisé en microméthode comparé au dosage classique réalisé au laboratoire par les méthodes usuelles. (Cohen et al. 2008).

En effet, lors d'une étude réalisée en 2004-2005 (Cohen et al. 2006) dans huit services d'urgences pédiatriques sur 268 enfants, des médecins ont prescrit un bilan biologique habituel avec une PCR dosée selon les techniques habituelles et ont effectué en même temps le test de dosage rapide de la PCR avec une goutte de sang recueillie lors du prélèvement veineux.

La comparaison de dosage entre les deux méthodes montre pour 247 enfants une liaison linéaire satisfaisante avec un coefficient de corrélation de 0,929.

Les 21 enfants restants avaient des valeurs de PCR supérieures aux bornes de lecture de l'appareil Nycocard reader, d'où un écart important dans les valeurs entre les deux techniques de dosage (Cohen et al. 2006).

Une étude française où l'appareil utilisé était le Nycocard CRP single test a montré que la durée de prise en charge était divisée par 2,4 en cas d'utilisation d'un test rapide et que le coût des examens complémentaires était divisé par 2,6 (Cohen et al. 2008).

Il faut savoir que le dosage de la PCR par macrométhode au laboratoire n'est généralement pas demandé seul mais avec une série d'autres dosages.

Un dosage par Nycocard a un coût moins élevé qu'un test habituel en laboratoire. En effet, après l'achat de l'appareil (ayant un coût d'environ 800 euros), un dosage revient à environ 2,5 euros alors qu'il revient à 8,1 euros au laboratoire (cotation B30 avec un point à 0,27 euros) (Assurance Maladie 2008).

L'étude réalisée en 2006-2007 concernait 22 pédiatres et 227 enfants fiévreux sans point d'appel. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau IV.

Tableau IV - Résultats de l'étude réalisée en 2006-2007 (Cohen et al. 2008)

| n | 159 | 68 |
|--|---|------------------------------|
| Dosage de la PCR | Test rapide au cabinet de pédiatrie | Test habituel au laboratoire |
| Fréquence d'utilisation de bandelettes urinaires | 22,6% | 4,4% |
| Fréquence de prescription de bilan sanguin (NFS, VS, hémoculture...) | 3,8% | 100% |
| Fréquence de prescription d' ECBU | 19,5% | 67,6% |
| Coûts des examens biologiques | 7,7 +/- 10,5 euros (-80% par rapport au groupe 2) | 39,3 +/- 10,3 euros |
| Examens radiologiques | Pas de différence entre les deux groupes | |
| Fréquence d'hospitalisation | 2,9% | 15,3% |

D'après ces résultats, on constate que, contrairement à l'utilisation d'un test habituel en laboratoire, lorsqu'un test rapide est effectué :

- la réalisation de bandelettes urinaires est plus fréquente
- des examens biologiques complémentaires sont moins fréquemment prescrits
- le coût des examens biologiques demandés est moins élevé avec une réduction de 80% du coût par rapport à l'utilisation d'un test habituel
- la fréquence d'hospitalisation est moins fréquente.

Les prescriptions sont différentes pour des taux de PCR équivalents, en effet, lors d'un test habituel, la PCR faisant partie d'un bilan standard, quelle que soit sa valeur, d'autres examens seront prescrits. Au contraire, si on utilise un test rapide, les autres examens ne sont que très rarement prescrits, surtout si les valeurs de la PCR sont basses.

Une étude effectuée en Slovénie a, quant à elle, confirmé une moindre utilisation d'antibiotiques lors de l'utilisation de test rapide (Cohen et al. 2008).

Il a été mis en évidence dans l'étude française, que le délai moyen d'obtention des résultats des examens prescrits au laboratoire est d'environ 11 h. Bien entendu, le service des laboratoires n'est pas continu, différant ainsi l'obtention des résultats ; de plus, les nuits, les dimanches, les jours fériés, les parents doivent alors chercher en catastrophe le laboratoire qui assure la garde

(Chalumeau et al. 2007). La possibilité d'obtenir le résultat en 5 minutes est d'autant plus intéressante !

Le test rapide de dosage de la PCR permet donc de corroborer ou de rendre moins probable une hypothèse diagnostique mais ne permet en aucun cas un diagnostic de certitude. Pour cela, il faut aussi tenir compte de l'examen clinique, de l'évolution du taux de PCR, voire du résultat des examens complémentaires éventuellement prescrits.

5. Etude au cabinet du Pédiatre

Nous avons décidé de réaliser une étude au cabinet d'un pédiatre afin de corroborer l'étude relatée précédemment.

L'étude a été mise en place de septembre 2008 à Août 2009 dans le cabinet du docteur Beley, pédiatre à Essey lès Nancy, et visait les enfants fiévreux sans point d'appel particulier.

5.1. Patients et méthode

Les critères permettant d'inclure les enfants étaient :

- un âge de plus de 3 mois
- une fièvre isolée depuis plus de 12 h
- absence de pathologie sous jacente connue

Au total, 61 enfants ont été inclus dans l'étude.

Un tableau (tableau V) a été conçu au préalable par mes soins, et à chaque utilisation du test au cabinet médical, le pédiatre a renseigné les différents champs.

Tableau V - Trame du tableau de suivi des cas au cabinet

| Enfant | Date | Sexe | Age (mois) | Poids (kilogrammes) | Taille (centimètres) | IMC | Temps passé depuis le début de la fièvre | Température °C | PCR (mg/L) | Autres examens/hospitalisation | Diagnostic | Antibiotiques | Evolution |
|--------|------------|------|------------|---------------------|----------------------|------|--|----------------|------------|--------------------------------|------------|---------------|-----------|
| E1 | 25/09/2008 | F | 9 | 6,7 | 66 | 15,3 | J2 | 39 | 10 | | roséole | non | B |
| E2 | 04/09/2008 | F | 14 | 10 | 77 | 16 | J3 | 39 | 9 | | | non | B |

Le test utilisé est le NycoCard CRP single test (Progen Biotechnique) (Axis-shield 2006). C'est un test immunologique en phase solide de type sandwich. La cassette test contient une membrane recouverte d'anticorps monoclonaux anti PCR. Lorsqu'on dépose le sang dilué, la PCR présente

dans l'échantillon va se fixer sur les anticorps. On ajoute ensuite une goutte de réactif contenant des anticorps marqués à l'or ; ceux-ci vont se fixer sur la PCR elle-même déjà fixée à des anticorps. On parle alors de méthode sandwich. L'excès de réactif est ensuite éliminé par une solution de rinçage. En présence d'une concentration pathologique de PCR, la membrane apparaît pourpre et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de PCR dans l'échantillon. L'intensité de la coloration se mesure alors quantitativement avec le Nycocard READERII (constitué d'une base et d'un stylo réflectomètre) et permet d'obtenir la concentration de PCR. Les bornes de lecture vont de 8 à 200 mg/L.

NB 1 : les valeurs usuelles de la PCR sont inférieures à 5 mg/L ; des valeurs supérieures à 10 mg/L sont considérées comme pathologiques.

NB 2 : un échantillon permettant le contrôle du test est fourni. Il faut le doser régulièrement (à l'ouverture du coffret puis chaque semaine) et le taux mesuré doit se situer dans l'intervalle autorisé indiqué sur l'étiquette du flacon (ici 25 +/- 10 mg/L).

5.2. Mode opératoire

1. Prélever au bout du doigt 5 μ L de sang du patient dans un tube capillaire et les déposer dans un microtube contenant 400 μ L d'un réactif diluant. On mélange par retournements 10 secondes.
2. 50 μ L d'échantillon dilué sont déposés sur la membrane ; on laisse pénétrer.
3. 1 goutte de réactif contenant les anticorps marqués est alors ajoutée et on laisse pénétrer.
4. 1 goutte de solution de rinçage est ajoutée et on laisse pénétrer.
5. Le lecteur est calibré grâce à la cassette de calibration (blanc)
6. Le résultat est obtenu dans les 5 minutes (Axis-shield 2007).

Les causes d'erreurs sont présentées dans le tableau VI :

Tableau VI - Causes d'erreurs (Axis-shield 2006)

| Problème | Cause possible | Action corrective |
|------------------------|---|--|
| Résultats trop faibles | Volume d'échantillon incorrect | Tester à nouveau l'échantillon. S'assurer que le capillaire est complètement rempli. Eviter les bulles d'air |
| | Volume d'échantillon dilué incorrect | Vérifier la pipette. S'assurer que la pointe de la pipette est bien adaptée. Refaire le test |
| | Temps trop long (supérieur à 2min) entre étape 2 et 3. | Tester à nouveau l'échantillon. Les étapes 2 à 4 doivent être réalisées sans interruption |
| Résultats trop forts | Dilution de l'échantillon peut être trouble (taux de leucocytes élevé) augmentant le temps d'absorption sur la membrane | Centrifuger l'échantillon |
| | Volume d'échantillon dilué incorrect | Idem résultats trop faibles |
| | Réactif appliqué avant que le précédent n'ait été absorbé | S'assurer que le réactif soit absorbé sur la membrane avant de passer à l'étape suivante |
| | Temps trop long entre l'étape 3 et 4 | Idem résultats trop faibles |

Suite à ma demande, le laboratoire qui commercialise le NycoCard CRP single test m'a envoyé les données obtenues lors de leurs tests portant sur la variabilité analytique instrumentale. Ceci va nous permettre d'utiliser l'appareil pour des mesures sans avoir besoin de le tester nous même sur sa précision (répétabilité + reproductibilité), sur d'éventuelles variations dues à l'utilisation de l'appareil par différents techniciens (voir annexe 2 et tableaux VII et VIII).

Un technicien a effectué 20 dosages pour des échantillons de valeurs moyennes croissantes.

Tableau VII - Répétabilité du dosage « rapide » de la PCR

| Concentration de PCR | Valeur moyenne (mg/L) | Coefficient de variation (%) |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| Basse | 16 | 5 |
| Moyenne | 28 | 3,6 |
| Moyenne à élevée | 49 | 3,1 |
| Elevée | 115 | 4,1 |

Les coefficients de variations obtenus sont bons, en effet, d'après les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique, les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité doivent être inférieurs à 10 voire 15% pour les tests immunochimiques.

Un technicien a dosé chaque échantillon 3 fois par jour pendant 5 jours ; les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII - Reproductibilité du dosage « rapide » de la PCR

| Concentration de PCR | Valeur moyenne (mg/L) | Coefficient de variation (%) |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| Basse | 10 | 2 |
| Moyenne | 21 | 3,3 |
| Moyenne à élevée | 66 | 2,3 |
| Elevée | 112 | 3,3 |

Les coefficients de variations sont corrects.

Cinq techniciens ont dosé 3 fois de suite chaque échantillon (faible, moyenne, moyenne à élevée et forte concentration de PCR), la moyenne des coefficients de variation de tous les dosages est de 7,5% ce qui est acceptable.

5.3. Résultats

Un enfant qui déviait du protocole a été conservé dans l'analyse, il n'avait que 2 mois au lieu des 3 requis. Les résultats complets sont présentés en annexe 1.

5.3.1. Caractéristiques physiologiques et cliniques des enfants

L'étude a porté sur 25 garçons et 36 filles.

Le tableau IX présente les caractéristiques physiologiques des enfants entrés dans l'étude.

Tableau IX - Moyennes, écarts types et extrêmes

| | Moyenne | Ecart-type | Extrêmes |
|----------------|---------|------------|-----------|
| Age (mois) | 16,5 | 15,1 | 2,0-78,0 |
| Poids (kg) | 9,1 | 2,1 | 5,1-13,7 |
| Taille (cm) | 72,0 | 7,9 | 60,0-81,5 |
| IMC | 17,1 | 1,4 | 14,9-20,4 |
| Température °C | 39,1 | 0,3 | 38,0-39,8 |
| PCR (mg/L) | 34,2 | 43,7 | 8,0-200,0 |

L'IMC est l'Indice de Masse Corporelle ; elle est calculée à partir de la formule :

$$\text{IMC} = \frac{\text{poids (kg)}}{[\text{taille (m)}]^2}$$

L'OMS a défini cet indice de masse corporelle comme le standard pour évaluer les risques liés au surpoids chez l'adulte. Les valeurs de 18 et 25 constituent des repères communément admis pour un IMC normal chez un adulte ; chez un enfant, on se réfère aux courbes présentes dans les carnets de santé pour vérifier que la valeur de son IMC est correcte.

Diagnostiques finaux :

La figure 17 présente les pathologies diagnostiquées parmi les enfants entrés dans l'étude.

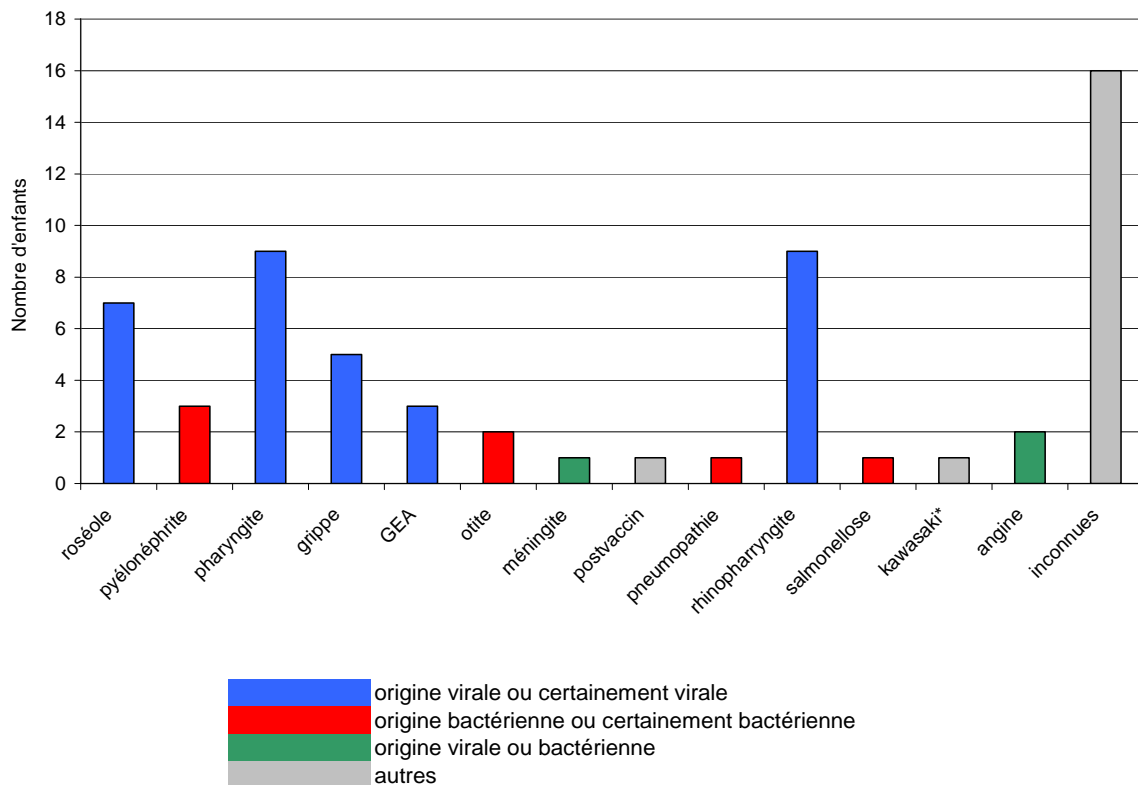


Figure 17 - Diagnostiques finaux

Les pathologies dont l'origine est virale ou certainement virale sont représentées en bleu et les pathologies dont l'origine est bactérienne ou certainement bactérienne sont représentées en rouge. Lorsque l'origine peut être soit virale soit bactérienne, les pathologies sont représentées en vert.

D'après les résultats, on peut dire qu'une fièvre d'étiologie inconnue chez un enfant ne présentant pas de point d'appel est le plus souvent d'origine virale. En admettant que les pharyngites, les GEA, les rhinopharyngites sont bien d'origine virale (ce qui est le plus probable), on obtient 75,5% des pathologies diagnostiquées d'origine virale.

*La maladie de Kawasaki est un syndrome adenocutanéomuqueux qui touche essentiellement les enfants. C'est une vascularite fébrile dont l'étiologie reste inconnue. Les principaux symptômes sont une fièvre inexplicée qui dure une dizaine de jours sans traitement, un exanthème, une conjonctivite, des lésions dans la bouche et dans 50% des cas, une adénopathie. Le pronostic est essentiellement cardiovasculaire (anévrisme des coronaires). Le traitement est constitué d'injections de gammaglobulines en IV et d'aspirine.

La figure 18 nous présente la répartition des enfants en fonction de leur PCR.

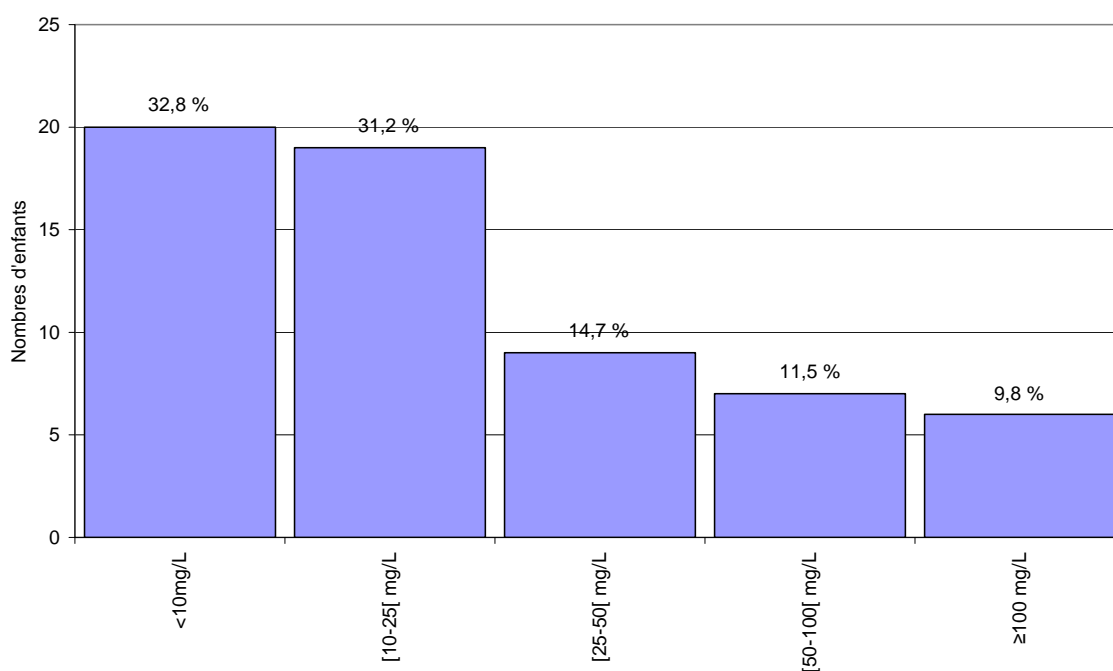


Figure 18 - Distribution des taux de PCR parmi les enfants

Dans cette étude, la majorité des enfants (64%) a une PCR inférieure à 25 mg/L. On remarque aussi que seuls 9,8% des enfants ont une PCR égale ou supérieure à 100 mg/L. Ceci confirme bien que la plupart des fièvres sans point d'appel sont d'origine virale.

5.3.2. La température et la PCR sont-elles reliées ?

Pour pouvoir répondre à cette question, il est nécessaire d'étudier la relation éventuelle entre la PCR et la température de chaque enfant (figure 19).

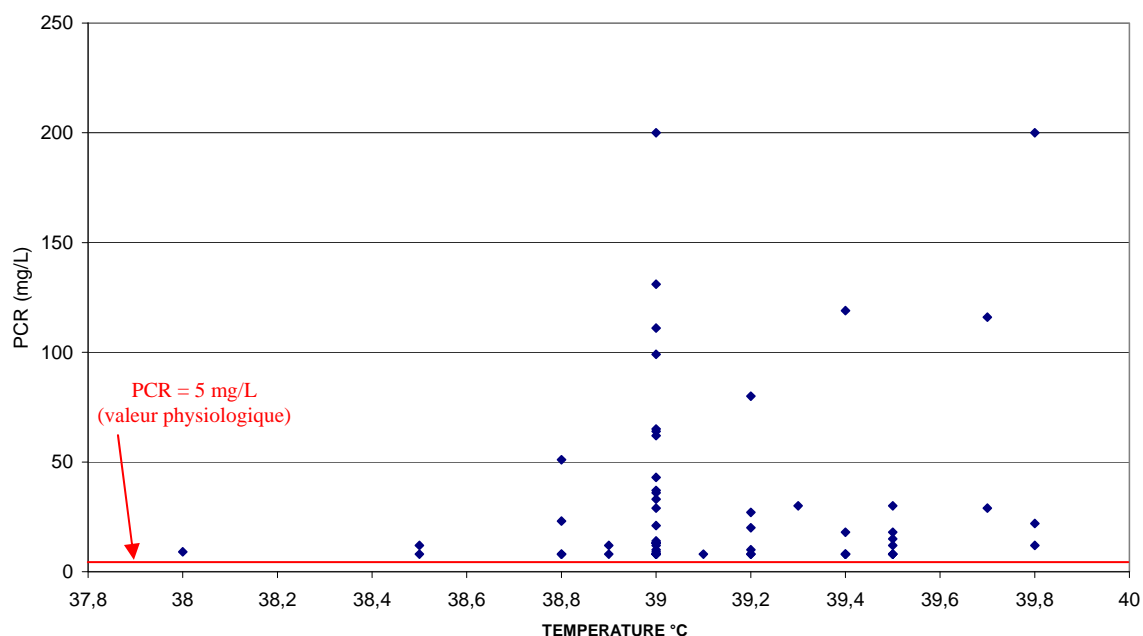


Figure 19 - Lien entre la température corporelle et le taux de PCR

La température moyenne est de 39,1°C avec un écart type de 0,31°C. La température la plus basse relevée est de 38°C et la plus élevée de 39,8°C.

La moyenne des PCR relevées est de 34,2 mg/L avec un écart type de 43,7. Les deux extrêmes sont les deux bornes de l'appareil : 8 à 200 mg/L.

Pour les températures inférieures à 39°C, les PCR ne sont pas très élevées et ne dépassent pas 50 mg/L. S'il existait une relation de proportionnalité entre la température et la PCR, on devrait retrouver des PCR élevées pour des températures élevées. Or pour des températures très élevées, les PCR dosées ne sont pas particulièrement élevées. On ne peut donc établir aucune corrélation entre l'élévation de la température et le taux de PCR.

5.3.3. Relation entre l'origine virale ou bactérienne d'une pathologie et la PCR

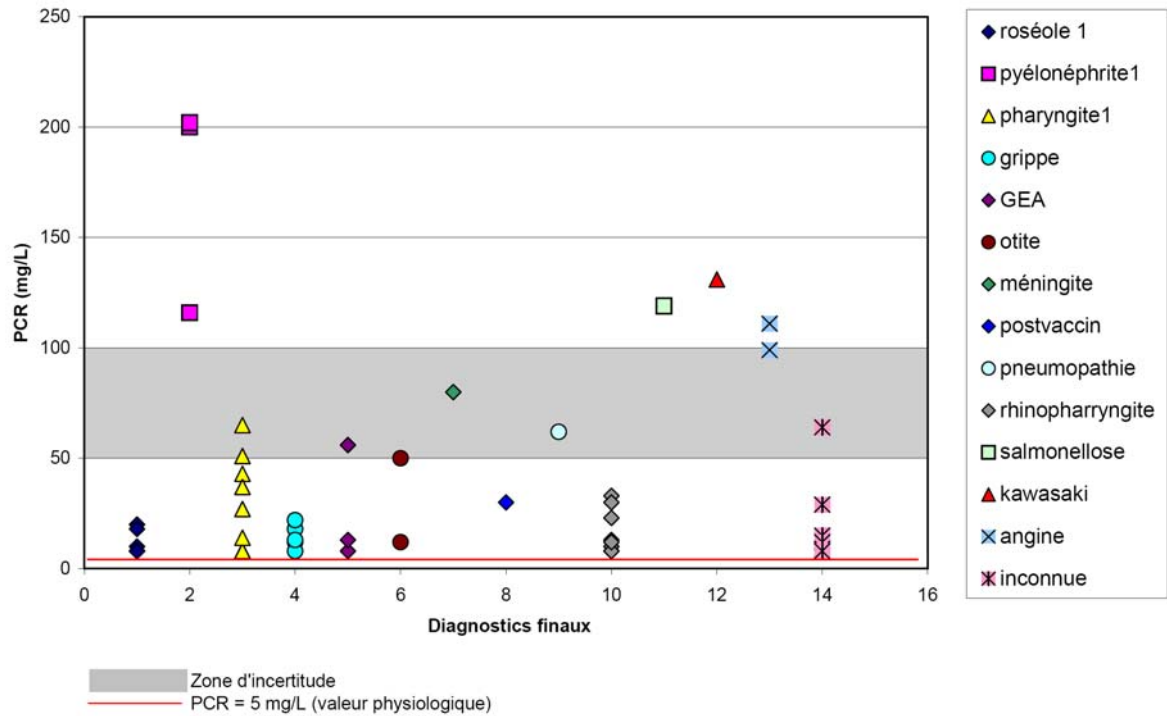


Figure 20 - Comparaison des diagnostics finaux avec le taux de PCR

Hormis le cas de suspicion de Kawasaki, tous les enfants dont la PCR est supérieure à 100 mg/L sont atteints d'une pathologie bactérienne.

Sur la figure 20, on peut distinguer deux bandeaux horizontaux :

- le bandeau où la PCR est inférieure à 50 mg/L : on y retrouve principalement des pathologies d'origine virale
- le bandeau où la PCR est supérieure à 100 mg/L : on y retrouve des pathologies d'origine bactérienne
- Entre ces deux zones (bandeau grisé sur la figure 20), on retrouve des pathologies aussi bien d'origine virale que bactérienne, le taux de PCR n'étant donc pas dans cette zone un bon indicateur de l'origine présumée de la pathologie.

5.3.4. Intérêt du dosage par microméthode de la PCR

Tableau X - Actions mises en place suite au dosage rapide de la PCR

| PCR | n | Décisions immédiates: ECBU,TDR | | Antibiothérapie | | Hospitalisation | |
|---------------|----|-----------------------------------|------|-----------------|------|-----------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % |
| <10 mg/L | 20 | 2 | 10,0 | 0 | 0,0 | 2 | 10,0 |
| [10-25[mg/L | 19 | 3 | 15,8 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| [25-50[mg/L | 9 | 2 | 22,2 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| [50-100[mg/L | 7 | 2 | 28,6 | 1 | 14,3 | 2 | 28,6 |
| ≥100 mg/L | 6 | 3 | 50,0 | 4 | 66,7 | 2 | 33,3 |

NB 1 : Les 16 autres enfants ayant une PCR inférieure à 10 mg/L, n'ont eu ni antibiothérapie, ni analyses supplémentaires.

NB 2 : 1 enfant ayant une PCR comprise entre 50 et 100 mg/L a eu à la fois un test de diagnostic rapide de détection du streptocoque A (TDR) et des antibiotiques.

NB 3 : 3 enfants ayant une PCR égale ou supérieure à 100 mg/L ont eu à la fois un ECBU (examen cyto bactériologique des urines) et des antibiotiques d'où un total différent de 6.

D'après le tableau X, on peut dire que : plus la PCR est élevée, plus le prescripteur aura tendance à prescrire des antibiotiques et à faire des examens complémentaires. En effet, lorsque la PCR est inférieure à 10 mg/L, il n'y a que 10% des enfants qui sont soumis à des examens complémentaires et il n'y a aucune prescription d'antibiotiques. Par contre, lorsque la PCR égale ou supérieure à 100 mg/L, 50% des enfants sont soumis à des examens complémentaires et 66,7% sont placés sous antibiothérapie. Pour des valeurs de PCR comprises entre 11 et 99 mg/L, on observe parallèlement à la hausse de la valeur de la PCR une augmentation du pourcentage d'enfants ayant subi des examens complémentaires ou ayant pris des antibiotiques. De plus, l'hospitalisation est, en règle générale, plus fréquente lorsque les PCR sont élevées.

Parmi les 61 enfants de l'étude :

- 6 ont été hospitalisés d'emblée soit 9,8%,
- 5 ont reçu un traitement antibiotique d'emblée soit 8,2%,

- 12 ont subi des examens complémentaires tels un ECBU et/ou un test de dépistage rapide du streptocoque A soit 19,6%, ce qui est peu, car si le test n'est pas pratiqué au cabinet et que le dosage de PCR est demandé au laboratoire, il est, dans la majorité des cas, accompagné d'autres demandes de dosage.

5.4. Discussion et conclusion

D'après nos résultats, une fièvre d'étiologie inconnue et sans point d'appel particulier est dans 75,5% des cas d'origine virale.

Nos résultats corroborent ceux des études précédentes (tableau XI). En effet, dans l'étude suisse, il a été démontré que plus la valeur de la PCR était élevée plus les médecins prescrivaient des antibiotiques et des examens complémentaires. Ainsi pour une PCR inférieure à 25 mg/L, dans 30,7% des cas, une formule sanguine a été prescrite et 15,8% des enfants ont fait une analyse d'urine.

Lorsque la PCR est comprise entre 25 et 50 mg/L, 42,5% des enfants ont eu une analyse de la formule sanguine, 48,9% ont fait une analyse d'urine et 17% ont eu des antibiotiques.

Pour une PCR supérieure à 50 mg/L, 53,8% des enfants ont eu une analyse de la formule sanguine, 73% ont fait une analyse d'urine et 61,5% ont eu des antibiotiques d'emblée.

Dans notre étude, pour une PCR inférieure à 10 mg/L, 10% des enfants ont fait une analyse d'urine ou un TDR et aucun n'a eu d'antibiotiques. Pour une PCR comprise entre 50 et 100 mg/L, 28,6% des enfants ont subi un examen complémentaire (ECBU ou TDR) et 14,3% ont eu des antibiotiques. Pour une PCR égale ou supérieure à 100 mg/L, 50% des enfants ont eu un examen complémentaire et 66,7% des antibiotiques.

Tableau XI - Comparaison entre l'étude suisse (Godard et al. 2000) et la nôtre

| | Etude suisse (Godard et al.) | Etude nancéenne | Etude suisse (Godard et al.) | Etude nancéenne |
|-------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Taux PCR | Examens complémentaires | Examens complémentaires | Antibiothérapie | Antibiothérapie |
| PCR basse | + | + | 0,0% | 0,0% |
| PCR moyenne | ++ | ++ | 17,0% | 14,3% |
| PCR haute | +++ | +++ | 61,5% | 66,7% |

Ce tableau montre l'augmentation de prescription d'examens complémentaires et d'antibiothérapie d'emblée parallèlement à la hausse du taux de PCR. Les deux études n'utilisant pas les mêmes

Thèse

valeurs de PCR, pour pouvoir les comparer, on se contentera de les classer en PCR basse, moyenne et haute.

Le dosage rapide de la PCR permet de réaliser des économies car il évite une sur-prescription d'antibiotiques et d'examen complémentaires. Les hospitalisations sont elles aussi réduites, en effet pour une PCR comprise entre 50 et 100 mg/L, elles représentent 28,6 % des cas (dans notre étude) alors qu'on atteint 33,3 % des cas pour une PCR égale ou supérieure à 100 mg/L.

Le dosage rapide de PCR va permettre de renforcer ou non l'hypothèse initiale émise quant à l'origine de la pathologie, il en découlera une prise en charge différente selon la probabilité d'une origine bactérienne ou virale.

On ne peut donc qu'encourager les pédiatres à se doter d'un appareil permettant le dosage rapide de la PCR.

Il n'existe pas de relation entre la température corporelle et le taux de PCR.

Dans notre étude, 100% des enfants ayant une PCR supérieure à 100 mg/L étaient atteints d'une pathologie bactérienne. A contrario la majorité des enfants ayant une PCR inférieure à 50 mg/L avait des pathologies d'origine virale. Pour des valeurs extrêmes la PCR est un assez bon indicateur de l'origine présumée de la pathologie.

Dans les années à venir, un nouveau dosage rapide de protéine remplacera peut être celui de la PCR, il s'agit de celui de la procalcitonine. (Chalumeau et al. 2007)

En effet, l'élévation de la procalcitonine (PCT) débute 4 heures après le début de l'infection. Le taux de procalcitonine n'augmente pas ou que très peu en cas d'infection virale.

Actuellement c'est le marqueur de l'infection bactérienne le plus sensible au stade précoce et le plus spécifique. Le taux de PCT est dosé sur plasma ou sérum par 2 méthodes standardisées :

- une technique immunoluminométrique qui nécessite une incubation d'1 heure et une calibration à chaque dosage
- une technique immunofluorométrique automatisée qui nécessite des appareils spécifiques

Très peu de services disposent d'un dosage quantitatif en temps réel 24 h / 24.

Un test de dosage rapide de la PCT a été mis au point. Il s'agit d'un test semi-quantitatif immunochromatographique. Le souci est qu'il ne s'effectue que sur du sérum ou du plasma ce qui nécessite une centrifugation d'un prélèvement veineux ; le dosage ne se fait donc qu'en laboratoire.

Des améliorations sont attendues et sont actuellement à l'étude :

- diminution du seuil inférieur de détection pour augmenter la sensibilité et la spécificité
- standardisation des mesures : élimination du biais humain lié à la vision des couleurs
- dosage sur sang total prélevé au bout du doigt pour permettre une utilisation au cabinet médical.

En conclusion, le diagnostic d'une fièvre isolée chez un jeune enfant est parfois difficile. L'examen clinique reste l'élément majeur pour rechercher une étiologie et surtout pour juger de la tolérance de la maladie (fréquence respiratoire, fréquence cardiaque, temps de recoloration...).

En urgence, le dosage rapide de la PCR permet :

- de mieux évaluer la gravité, la nécessité d'examen complémentaires et la nécessité d'un traitement rapide en cas de PCR élevée (> 100 mg/L)
- de rassurer la famille (et le médecin) en cas de PCR basse
- de diminuer le nombre d'hospitalisations inutiles

La pratique d'autres tests de diagnostic rapide et peut-être l'utilisation de la PCT permettent d'espérer des progrès dans la pratique de la médecine et de la pédiatrie ambulatoire.

Annexe 1 : Caractéristiques démographiques et cliniques des enfants entrés dans l'étude

| Enfant | Sexe | Age (mois) | Poids (kg) | Taille (cm) | IMC (kg.m ⁻²) | Durée depuis le début de la fièvre (jour) | T (°C) | PCR (mg.L ⁻¹) | Autres examens/hospitalisation | Diagnostic | ATB | Evolution |
|--------|------|------------|------------|-------------|---------------------------|---|--------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|-----|-----------|
| E1 | F | 9 | 6,7 | 66 | 15,3 | 2 | 39 | 10 | | roséole | non | B |
| E2 | F | 14 | 10 | 77 | 16 | 3 | 39 | 9 | | | non | B |
| E3 | F | 14 | 10 | | | 3 | 39,8 | 200 | ECBU | pyélonéphrite | oui | |
| E4 | F | 11 | 9,5 | 68 | 20 | 3 | 39 | 13 | | | non | B |
| E5 | F | 22 | 11 | 78 | 18 | 3 | 39,2 | 27 | | pharyngite | non | B |
| E6 | M | 11 | 8,7 | 73 | 16,3 | 2 | 39,5 | 15 | | | non | B |
| E7 | F | 28 | 13 | 87 | 17,4 | 4 | 39 | 8 | | | non | B |
| E8 | F | 17 | 11 | 77 | 18,7 | 3 | 39,4 | 8 | | pharyngite | non | B |
| E9 | M | 20 | 11 | 81 | 16,6 | 4 | 39,5 | 8 | | pharyngite | non | B |
| E10 | F | 22 | 10,2 | 79 | 16,3 | 4 | 39,2 | 10 | | rhinopharyngite | non | B |
| E11 | M | 6 | | | | 3 | 39 | 8 | | rhinopharyngite | non | B |
| E12 | M | 9 | 7,7 | 70 | 15,8 | 2 | 39,2 | 8 | | rhinopharyngite | non | B |
| E13 | F | 9 | 8,5 | 69,5 | 17,4 | 4 | 38,9 | 12 | | grippe | non | B |
| E14 | M | 7 | 8,1 | 73 | 15,4 | 2 | 39 | 21 | | rhinopharyngite | non | B |
| E15 | M | 12 | 10,3 | 74,3 | 18,6 | 3 | 39,4 | 18 | | grippe | non | B |
| E16 | F | 3 | 5,1 | 56,3 | 16,2 | 2 | 38,8 | 8 | | GEA | non | B |
| E17 | M | 11 | 11,9 | 77,5 | 19,9 | 5 | | 50 | | otite | oui | B |
| E18 | F | 5 | 7,2 | 64,3 | 17,5 | 5 | 39,5 | 8 | | grippe | non | B |
| E19 | M | 17 | 10,8 | 79 | 17,4 | 1 | 38,8 | 8 | | | non | B |
| E20 | F | 66 | | | | 4 | 39,8 | 22 | ECBU=normale | grippe | non | B |
| E21 | F | 7 | 7,3 | 65,5 | 17 | 3 | 39 | 13 | | grippe | non | B |
| E22 | M | 10 | 8,7 | 71 | 17,4 | 2 | 39,2 | 8 | | | non | B |
| E23 | F | 15 | | | | 2 | 39,4 | 8 | | roséole | | |
| E24 | F | 22 | 11,1 | 79,3 | 17,6 | 3 | 39 | 13 | | rhinopharyngite | non | B |
| E25 | F | 2 | 5,8 | 53,5 | 20,4 | 2 | 39,2 | 80 | hospitalisation | méningite | | |
| E26 | F | 5 | 5,8 | 60 | 16,1 | 2 | 39 | 13 | | GEA | non | B |
| E27 | M | 4 | 6,85 | 63 | 17,3 | 3 | 39,5 | 30 | | postvaccin | | |
| E28 | F | 14 | 8,2 | 70 | 16,3 | 6 | 39,8 | 12 | ECBU=normale | rhinopharyngite | non | B |
| E29 | F | 7 | 7,8 | 71 | 15,5 | 3 | 39 | 33 | | rhinopharyngite | non | B |
| E30 | M | 5 | 6,8 | 65 | 16,2 | 3 | 39,7 | 29 | ECBU=normale | | non | B à J5 |
| E31 | F | 6 | 7,28 | 64,3 | 17,5 | 2 | 38,8 | 23 | | rhinopharyngite | non | B |

NB : Il y a des cases qui ne sont pas remplies dans la colonne « Evolution » : soit l'enfant n'est pas revenu par la suite au cabinet soit le champ n'a pas été rempli. A notre connaissance, il n'y a pas eu de cas d'aggravation.

| Enfant | Sexe | Age (mois) | Poids (kg) | Taille (cm) | IMC (kg.m ⁻²) | Durée depuis le début de la fièvre (jour) | T (°C) | PCR (mg.L ⁻¹) | Autres examens/hospitalisation | Diagnostic | ATB | Evolution |
|--------|------|------------|------------|-------------|---------------------------|---|--------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----|---------------|
| E32 | F | 15 | 8,53 | | | 3 | 38,5 | 12 | | otite sérumuqueuse | non | |
| E33 | M | 6 | 7 | 65 | 16,6 | 2 | 39,2 | 20 | ECBU=normale | roséole | non | B |
| E34 | F | 14 | 8,3 | 73 | 15,6 | 2 | 39,7 | 116 | ECBU | pyélonéphrite | oui | |
| E35 | F | 6 | 7 | 64,7 | 16,9 | 3 | 38,9 | 8 | ECBU=normale | pharyngite | non | B |
| E36 | F | 10 | 9 | 72 | 17 | 2 | 39 | 62 | hospitalisation | pneumopathie | | |
| E37 | M | 17 | 11,2 | 78 | 18,4 | 3 | 39,5 | 12 | | | non | B |
| E38 | F | 11 | | | | 3 | 39 | 8 | ECBU=normale | roséole | non | B |
| E39 | M | 17 | 10,6 | 76,5 | 18,1 | 3 | 39 | 43 | TDR strpetoA négatif | pharyngite | non | B |
| E40 | M | 20 | 11,15 | | | 4 | 39 | 37 | | pharyngite | non | |
| E41 | F | 12 | 9,3 | 74,3 | 17,8 | 2 | 39,5 | 18 | | roséole | non | B |
| E42 | M | 12 | 8,97 | | | 3 | 39,4 | 119 | hospitalisation | salmonellose | | |
| E43 | M | 13 | 9,3 | 74 | 17 | 3 | 39 | 111 | ECBU=normale | angine sévère | oui | |
| E44 | F | 16 | | | | 3 | 39 | 14 | | pharyngite | non | |
| E45 | M | 78 | | | | 5 | 39 | 131 | hospitalisation | suspicion de kawasaki | | |
| E46 | F | 36 | 14 | | | 4 | 39 | 200 | | pyélonéphrite | oui | |
| E47 | F | 6 | 6 | 60 | 16 | 2 | 39,4 | 8 | | roséole | non | B |
| E48 | M | 10 | 10 | 72 | 19 | 2 | 39,1 | 8 | | | non | B |
| E49 | F | 11 | 9,3 | 72,3 | 17,7 | 1 | 38,8 | 51 | ECBU=normale | pharyngite | non | B |
| E50 | F | 5 | 6,84 | 65 | 16,1 | 2 | 38,5 | 8 | | | non | B |
| E51 | M | 15 | 13,7 | 82 | 20,4 | 2 | 39 | 64 | ECBU=normale | | non | éruption à J4 |
| E52 | M | 13 | 8,3 | 72,3 | 15,8 | 2 | 39,3 | 30 | | rhinopharyngite | non | B |
| E53 | F | 36 | | | | 3 | 39 | 65 | | pharyngite sévère | oui | B |
| E54 | F | 72 | 7 | 65 | 16,6 | 3 | 39 | 12 | | | non | B |
| E55 | M | 21 | 10,79 | 78 | 17,7 | 2 | 39,5 | 8 | | | non | B |
| E56 | F | 23 | 9,6 | 79 | 15,2 | 2 | 39 | 29 | | | non | B |
| E57 | M | 12 | 8,37 | 72 | 16,1 | 2 | 39 | 8 | hospitalisation | roséole | | |
| E58 | F | 13 | 8,4 | 69 | 17,7 | 2 | 39 | 36 | | GEA | | |
| E59 | M | 48 | 13,1 | 96 | 14,9 | 5 | 39 | 99 | TDR streptoA négatif | angine sévère | oui | |
| E60 | M | 20 | 12 | 81,5 | 18 | 3 | 38 | 9 | hospitalisation | | non | |
| E61 | F | 11 | 7,8 | | | 2 | 39 | 8 | | | non | B |

Annexe 2 : Documentation Nycocard

3.3 PRECISION

3.3.1 Within run precision

Two series of *in house* serum preparations and heparin whole blood added CRP (Scripps) to four CRP levels (low, medium, medium high and high) were analysed with all three trial productions of NycoCard® CRP Single Test. One technician analysed each sample 20 times. The NycoCard® READER II CRP Serum/Plasma curve was used for measurement of serum samples and the CRP Whole Blood curve for measurement of whole blood samples. Results and statistical data from the within run precision studies are shown in *Table 3.4* (serum samples) and *Table 3.5* (whole blood samples).

Table 3.4

Within run precision for serum samples. Serum samples with low, medium, medium high and high CRP levels were analysed (n=20) with all three trial production lots and measured with the NycoCard® READER II, CRP Serum/Plasma curve.

| CRP-level | Trial prod. | Mean (mg/L) | Range (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------|--------|
| Low | 1 | 10.0 | 9-11 | 0.6 | 6.0 |
| | 2 | 7.0 | 6-8 | 0.6 | 8.6 |
| | 3 | 8.0 | 7-9 | 0.8 | 10.0 |
| Medium | 1 | 21.0 | 18-23 | 1.4 | 6.6 |
| | 2 | 20.0 | 18-22 | 1.2 | 6.0 |
| | 3 | 20.0 | 18-22 | 1.2 | 6.0 |
| Medium high | 1 | 72.0 | 66-77 | 3.2 | 4.4 |
| | 2 | 69.0 | 64-75 | 3.4 | 4.9 |
| | 3 | 65.0 | 61-70 | 2.8 | 4.3 |
| High | 1 | 136 | 126-149 | 5.4 | 4.0 |
| | 2 | 111 | 101-118 | 4.1 | 4.1 |
| | 3 | 113 | 103-119 | 5.0 | 5.0 |

Table 3.5

Within run precision for whole blood samples. Whole blood (heparin) samples with low, medium, medium high and high CRP levels were analysed (n=20) with all three trial production lots and measured with the NycoCard® READER II, CRP Whole Blood curve.

| CRP level | Trial prod. | Mean (mg/L) | Range (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------|--------|
| Low | 1 | 16.0 | 14-17 | 0.8 | 5.0 |
| | 2 | 16.0 | 14-18 | 1.2 | 7.5 |
| | 3 | 12.0 | 11-13 | 0.6 | 5.0 |
| Medium | 1 | 28.0 | 26-30 | 1.0 | 3.6 |
| | 2 | 29.0 | 27-31 | 1.4 | 4.8 |
| | 3 | 22.0 | 20-23 | 0.9 | 4.1 |
| Medium high | 1 | 50.0 | 45-54 | 2.5 | 5.0 |
| | 2 | 49.0 | 46-51 | 1.5 | 3.1 |
| | 3 | 55.0 | 52-59 | 1.9 | 3.5 |
| High | 1 | 113 | 105-123 | 5.4 | 4.8 |
| | 2 | 112 | 102-118 | 5.1 | 4.6 |
| | 3 | 115 | 104-124 | 4.7 | 4.1 |

No significant differences in within run precision between serum and whole blood samples were observed. Whole blood samples gave though slightly lower CV at low, medium and medium high CRP levels compared to serum samples in this study.

- A tendency of slightly higher imprecision in the lower CRP concentration range (< 20 mg/L), both for serum and whole blood samples was observed.

It is important to notice that the measuring intervals of 1 mg/L will be conducive towards a higher CV in the lower concentration range, as the results are not measured more accurately than each integral concentration unit with the NycoCard® READER II.

Within run precision for serum samples

Mean CVs (n=3) at low, medium, medium high and high CRP levels were 8.2, 6.2, 4.5 and 4.0%, respectively.

Within run precision for whole blood samples

Mean CVs (n=3) for low, medium, medium high and high CRP levels were 5.8, 4.2, 3.9 and 4.5%, respectively.

In the package insert of NycoCard® CRP Single Test, an expected CV below 7% in the CRP range below 20 mg/L and a CV below 5% in the range above 20 mg/L is indicated.

3.3.2 Between runs precision

Two series of *in house* serum preparations at four different CRP levels (low, medium, medium high and high) were analysed with all three trial productions of NycoCard® CRP Single Test. One technician analysed each sample 3 times per day in 5 days. The NycoCard® READER II, CRP Serum/Plasma curve was used for measurement of the test signals.

Results and statistical data from the between runs precision study are shown in *Table 3.6*. The precision, expressed as CV (%), was calculated both on basis of mean results each day and of the results from the second analysis each day.

Table 3.6

Between runs precision for serum samples. Serum samples with low, medium, medium high and high CRP levels were analysed (n=3) for five days with all three trial production lots. The signals were measured with the NycoCard® READER II, CRP Serum/Plasma curve. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated based on mean result each day and the second analysis (n2) each day.

| CRP levels | Trial prod. | Range (mg/L) | Based on mean, each day | | | Based on n2, each day | | |
|-------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------|--------|-----------------------|-----------|--------|
| | | | mean (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) | mean (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) |
| Low | 1 | 9-11 | 10 | 0.2 | 2.0 | 10 | 0.5 | 5.0 |
| | 2 | 6-8 | 7 | 0.6 | 8.6 | 7 | 0.8 | 11.0 |
| | 3 | 6-9 | 8 | 0.8 | 10.0 | 7 | 0.9 | 12.9 |
| Medium | 1 | 19-22 | 21 | 0.7 | 3.3 | 20 | 1.3 | 6.5 |
| | 2 | 17-22 | 19 | 0.9 | 4.7 | 19 | 1.5 | 7.9 |
| | 3 | 18-21 | 19 | 0.7 | 3.7 | 19 | 1.3 | 6.8 |
| Medium high | 1 | 71-89 | 81 | 4.6 | 5.7 | 80 | 5.9 | 7.4 |
| | 2 | 63-73 | 66 | 1.5 | 2.3 | 67 | 1.3 | 1.9 |
| | 3 | 70-62 | 67 | 4.1 | 4.1 | 67 | 4.6 | 6.9 |
| High | 1 | 117-132 | 112 | 3.7 | 3.3 | 126 | 5.1 | 4.1 |
| | 2 | 101-123 | 112 | 5.5 | 4.9 | 113 | 4.5 | 4.5 |
| | 3 | 102-126 | 112 | 4.6 | 4.1 | 112 | 4.6 | 4.1 |

Slightly higher imprecision (CV) at the low CRP level was observed, 6.9% (n=3) and 9.6% (n=3) based on mean and second analysis respectively. As mentioned in *Chapter 3.3.1* this is probably due to the fact that the measuring interval of the NycoCard® READER II is 1 mg/L.

Between run precision

Mean CVs (n=3) at low, medium, medium high and high CRP concentration levels were 6.9, 3.9, 4.0 and 4.1% respectively, calculated from the mean results per day.

Mean CVs (n=3) for low, medium, medium high and high CRP concentration levels were 9.6, 7.1, 5.4 and 4.2% respectively, calculated from the second analysis each day.

3.3.3 Between persons variation

- Two series of *in house* serum preparations at four different CRP levels (low, medium, medium high and high) were analysed with all three trial productions of NycoCard[®] CRP Single Test. Five technicians analysed each sample 3 times. The NycoCard[®] READER II, CRP Serum/Plasma curve was used for measurement of the test signals.

Results and statistical data from the between persons reproducibility study are shown in Table 3.7. The coefficient of variation (CV) was calculated both on basis of mean result each day and of results from the second analysis each day.

Table 3.7

Between persons variation. Serum samples with low, medium, medium high and high CRP levels were analysed (n=3) by five persons with all three trial production lots and measured with the NycoCard[®] READER II, CRP Serum/Plasma curve. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated based on mean result each person and second analysis (n2) each person.

| CRP levels | Trial prod | Range (mg/L) | based on mean, each person | | | based on n2, each person | | |
|-------------|------------|--------------|----------------------------|-----------|--------|--------------------------|-----------|--------|
| | | | mean (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) | mean (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) |
| Low | 1 | 5-9 | 7 | 0.6 | 8.6 | 8 | 0.7 | 8.8 |
| | 2 | 5-8 | 7 | 0.7 | 10.0 | 8 | 0.7 | 8.8 |
| | 3 | 6-9 | 8 | 0.6 | 7.5 | 8 | 0.6 | 7.5 |
| Medium | 1 | 18-25 | 21 | 1.5 | 7.1 | 20 | 1.4 | 7.1 |
| | 2 | 16-22 | 19 | 1.4 | 7.4 | 20 | 1.4 | 7.0 |
| | 3 | 17-21 | 19 | 1.2 | 6.3 | 19 | 1.1 | 5.8 |
| Medium high | 1 | 57-75 | 69 | 5.9 | 8.6 | 70 | 5.8 | 8.4 |
| | 2 | 58-74 | 67 | 4.8 | 7.2 | 70 | 5.8 | 8.3 |
| | 3 | 55-77 | 66 | 6.9 | 10.5 | 66 | 8.0 | 12.1 |
| High | 1 | 95-123 | 112 | 9.9 | 8.8 | 113 | 8.4 | 7.7 |
| | 2 | 92-119 | 112 | 8.1 | 7.2 | 113 | 8.4 | 7.4 |
| | 3 | 103-126 | 114 | 6.5 | 5.7 | 113 | 6.8 | 6.0 |

Between persons variation

No significant differences in CVs between the four CRP concentration levels (low, medium, medium high and high) were observed. The mean CV for all concentration levels was 7.5%, calculated from the mean of the results obtained by each person, and 7.9%, calculated from the results from the second analysis by each person.

3.3.4 Between lots variation

All three trial production lots of NycoCard® CRP Single Test were included in the study. A series of *in house* serum preparations at five CRP levels (10, 20, 40, 60 and 100 mg/L) were used as samples. Each serum sample was analysed in four parallels with all three lots. The NycoCard® READER II CRP Serum/Plasma curve was used for measurement of the signals.

Results and statistical data from the between lots reproducibility studies are shown in *Table 3.8*.

Table 3.8

Between lots reproducibility. Serum samples at 5 different CRP concentration levels were analysed with all three trial production lots (serum samples). Mean (n = 20), range, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) at each CRP level is shown.

| CRP conc. (mg/L) | Range (mg/L) | Mean (mg/L) | SD (mg/L) | CV (%) |
|------------------|--------------|-------------|-----------|--------|
| 10 | 11-12 | 11 | 0.5 | 4.5 |
| 20 | 18-21 | 19 | 1.0 | 5.3 |
| 40 | 38-41 | 40 | 1.6 | 4.0 |
| 60 | 56-66 | 61 | 2.4 | 3.9 |
| 100 | 97-114 | 105 | 5.4 | 5.7 |

Between lots variation

No significant differences in between lots variation for the five CRP concentration levels (10, 20, 40, 60 and 100 mg/L) were observed. The mean between lots CV for all concentration levels (n=5) was 4.7%.

Bibliographie

- Ablj H. 2002. C-reactive protein : history and revival. *Eur. J. Intern. Med.* 13(7):412-22.
- Agrawal A, Shrive A, Greenhough T, Volanakis J. 2001. Topology and Structure of the C1q-Binding Site on C-Reactive Protein. *J Immunol* 166(6):3998-4004.
- Assurance Maladie. 2008. Table Nationale de Codage de Biologie. Paris: AMELI.
- Autier J, Miyara M, Buyse S. 2004. Module 8 : immunopathologie, réaction inflammatoire. item112, editor. Issy-les-Moulineaux: Estem. 192 p.
- Axis-shield. 2006. Nycocard CRP single test-notice. Oslo: Axis-shield. 47 p.
- Axis-shield. 2007. Procédure de test. Oslo: Axis-shield. p 8.
- Black S, Kushner I, Samols D. 2004. C reactiv protein. *J Biol Chem* 279(47):48487-90.
- Bourrillon A. 2005. Pédiatrie. Paris: Masson. 837 p.
- Caquet R. 2008. 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation. Paris: Elsevier Masson. 437 p.
- Cerba L. 2007. Guide des analyses spécialisées. Paris: Elsevier Masson. 1041 p.
- Chabanne L, Ponce F, Prélaud P. 2006. Immunologie clinique du chien et du chat: Elsevier Masson. 374 p.
- Chalumeau M, Leroy S, Gendrel D, Bréart G, Moulin F, Dubos F. 2007. Procalcitonine semi-quantitative aux urgences pédiatriques *Arch Ped* 14(6):529-31
- Cohen R, Lécuyer A, Wollner C, Deberdt P, Thollot F, Henriquet V, de La Rocque F. 2008. Evaluation de l'impact du test rapide de la CRP en microméthode par des pédiatres de ville prenant en charge des enfants de plus de trois mois avec fièvre isolée. *Arch Ped* 15(6):1126-32.
- Cohen R, Romain O, Levy C, Perreaux F, Decobert M, Hau I, Lécuyer A, Lesprit E, Maman L, Roullaud S et al.. 2006. Impact de la protéine C-réactive (CRP) en microméthode sur la prise en charge des enfants fébriles aux urgences pédiatriques en Ile-de-France. *Arch Ped* 13(12):1566-71.
- Deron S. 2003. C-reactive protein: everything you need to know about CRP and why it's more important than cholesterol to your health. New York: McGraw-Hill Professional. 208 p.
- Descoutures J. 2005. Pathologies cardiaques et vasculaires : 12e Journées de l'Internat des Hôpitaux de Paris-Ile-de-France Biologie médicale et pharmacie. Paris: John Libbey Eurotext. 383 p.
- Dubost J, Soubrier M, Meunier M, Sauvezie B. 1994. De la vitesse de sédimentation au profil protéique. *Rev Med Int* 15:727-33.
- Espinosa E, Chillet P, Valitutti S. 2006. Immunologie. Paris: Ellipses. 432 p.
- Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G. 1989. Dual control of c reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *EMBO J* 8:3773-9.
- Godard C, Friedli G, Deglon P, Maherzi M, Reinhardt M. 2000. Fievre aiguë isolée chez le jeune enfant -interet de la mesure rapide de la protéine-C-réactive. *Le Pédiatre* 36(181):5-9.
- Kushner I, Feldmann G. 1978. Control of the acute phase response. Demonstration of c-reactiv protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med* 148(2):466-77.

- Marcovecchio M, Giannini C, Widmer B, Dalton RN, Martinotti S, Chiarelli F, Dunger DB. 2008. C-Reactive Protein in Relation to the Development of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes *Diabetes care* 31(5):974-6.
- Mauris A, Morandi PA, Borghini T, Deom A. 2005. Fiche technique 6. Chene-Bourg: Centre Suisse de Controle de Qualité. p 2.
- Mery Pignon L. 1992. La PCR : protéine de l'inflammation (thèse d'exercice) [Pharmacie]. Marseille: Faculté de pharmacie de Marseille.
- Murphy C, Beckers J, Rütter U. 1995. Regulation of the Human C-reactive Protein Gene in Transgenic Mice *ASBMB* 270(13):704-8.
- Payment P, Trudel M. 1989. Manuel de techniques virologiques. Québec: Presses de l'Université du Québec. 350 p.
- Prin L, Hachulla E, Hennache B, Bonnotte B, Dubucquoi S, Abbal M, Faure G, Bouletreau P; 2009; Available from: http://w3med.univ-lille2.fr/inflammation/documents/Immuno_1.pdf
- Ridker P. 2008. CRP: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem* 55(2):209-15.
- Russo-Marie F, Peltier A, Polla BS. 1998. L'inflammation. Paris: John Libbey Eurotext. 565 p.
- Thompson D, Pepys MB, Wood S. 1999. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine *Structure* 7(2):169-77.
- Villiamier F. 1989. La C réactive protéine. Paris: Faculté de Pharmacie de Paris V.
- Volanakis J. 2001. Human C-reactive protein: expression, structure, and function *Mol Immunol* 38(2-3):189-97.
- Weill B, Batteux F. 2003. Immunopathologie et réaction inflammatoire. Bruxelles: De Boeck 310 p.
- Wollner A, Cohen R. 2007. Utilisation des tests de dépistage rapide du streptocoque A dans les infections inhabituelles à streptocoque du groupe A. *Arch Ped* 14(6):527-8.

Webographie

- Prin L, Hachulla E, Hennache B, Bonnotte B, Dubucquoi S, Abbal M, Faure G, Bouletreau P; 2009; Available from: http://w3med.univlille2.fr/inflammation/documents/Immuno_1.pdf

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : jeudi 28 janvier 2010

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIEprésenté par **Mélina ZERBATO**Sujet :**Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine
C Réactive au cabinet de pédiatrie**Jury :

Président :

M. Jean-Yves JOUZEAU, Professeur

Juges :

Mlle Marie-Madeleine GALTEAU, Professeur Emérite**M. Gérard BELEY, Pédiatre****M. Joseph HENNY, Docteur, Biologiste**

Vu,

Nancy, le

17/12/09


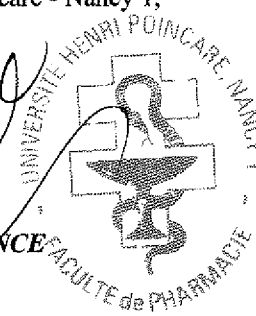
Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. J-Y. JOUZEAU, Professeur M. G. BELEY, Pédiatre

Vu et approuvé,

Nancy, le 18 Décembre 2009

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Chantal FINANCE FACULTE de PHARMACIE

Vu,

Nancy, le

22.12.2009

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,
Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,
C. CAPDEVILLE-ATKINSON
Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement :

3185

TITRE

Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie

Thèse soutenue le jeudi 28 janvier 2010
par Méлина ZERBATO

RÉSUMÉ

Découverte en 1930, la Protéine C Réactive (PCR) a de tout temps suscité l'intérêt des chercheurs ; ainsi, de nombreuses études récentes ont établi le lien entre une PCR élevée et de l'angor chronique, la présence de diabète et diverses manifestations de l'athérosclérose.

La structure complexe de la PCR a été déterminée en plusieurs étapes et est responsable de son activité. Elle est constituée de cinq sous unités non covalentes arrangées de manière symétrique autour d'un pore central. Sa demi-vie est de 12 heures et son catabolisme reste encore inconnu. Par contre, le lieu de sa synthèse est connu grâce aux travaux de Hurlimann : la PCR est synthétisée par les hépatocytes et sa synthèse se fait de manière concentrique de l'extérieur vers le centre du lobule.

La PCR a deux principales caractéristiques. D'une part, l'augmentation rapide de sa concentration dans le sérum pendant la phase d'inflammation ; en effet, celle-ci peut atteindre 1000 fois son taux basal ; et d'autre part un retour rapide au taux normal qui est très bas : 5mg/L.

Ce qui nous intéresse ici, est l'intérêt du dosage rapide de la PCR dans le cas d'un état inflammatoire d'étiologie inconnue. En effet, le diagnostic d'une fièvre isolée chez le jeune enfant est parfois difficile et nous avons démontré, à travers une étude réalisée de septembre 2008 à Août 2009 sur 61 enfants dans un cabinet de pédiatrie à Essey-lès-Nancy, que le dosage rapide de la PCR permet de mieux évaluer la gravité, la nécessité d'examen complémentaires et la nécessité d'un traitement rapide en cas de PCR élevée. Au contraire, ce dosage permettra de rassurer la famille (et le médecin) en cas de PCR basse ainsi que de diminuer le nombre d'hospitalisations inutiles.

MOTS CLÉS

Protéine C Réactive ; Réaction inflammatoire ; Pharmaco-économie ; dosage par microméthode.

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|----------------------|-------------------------|---|
| Docteur Gérard Beley | - | Expérimentale Bibliographique X Thème |

Thèmes

1 - Sciences fondamentales

3 - Médicament

5 - Biologie

2 - Hygiène/Environnement

4 - Alimentation - Nutrition

6 - Pratique professionnelle