

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université ABOU BEK BELKAID.

FACULTE DE Médecine
DEPARTEMENT DE Pharmacie

Thème :

EXPLORATION BIOCHIMIQUE DES ICTERES

Mémoire de fin de cycle

▲ *Sous la direction de :*

Dr. SARI Fathallah

▲ *Présenté par :*

ALAHOUM Siham
BOUDJNANE Amel
BENYELLES Rajaa
BOUTERFAS Sihem

Année universitaire : 2009/2010

Table des matières

INTRODUCTION.....1

➤ Chapitre I : RAPPELS ANATOMO PHYSIOLOGIQUES :

Foie.....2

Voies biliaires.....5

Acides biliaires.....6

Bilirubine.....10

Schémas illustratifs.....11

➤ Chapitre II : ETIOLOGIE DES ICTÈRES :

Ictère à bilirubine non conjuguée..... 13

Ictère à bilirubine conjuguée..... 22

Ictère à bilirubine mixte.....24

➤ Chapitre III : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES ICTÈRES :

Introduction.....27

Techniques de dosages de la bilirubine.....28

Méthodes par diazoreaction.....28

Méthodes par spectrophotométrie directe.....33

Méthodes par oxydation.....34

Calculs.....34

Valeurs normales.....	36
Interprétation des Résultats	36
CONCLUSION.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40

INTRODUCTION

Symptôme de diverses maladies, l'ictère correspond à l'apparition d'une coloration jaune des tissus, en raison de l'augmentation du taux plasmatique de la bilirubine au-delà des valeurs usuelles, cette dernière provient du catabolisme de l'hème contenu dans l'hémoglobine. La bilirubine libre ainsi formée, insoluble dans l'eau est dirigée vers le foie via la circulation sanguine liée à l'albumine plasmatique. Les hépatocytes captent la bilirubine grâce à un transporteur d'anions, puis la conjuguent à l'acide glucuronique. Cette bilirubine conjuguée, soluble dans l'eau est alors excrétée dans la bile par des transporteurs d'anions. Dans la lumière intestinale, la bilirubine est réduite en Urobilinogène et Stercobilinogène, donnant ainsi la coloration normale des selles.

Par définition on distingue trois pathogénies pour l'ictère : L'ictère pré hépatique ou pré hépatocyttaire dit aussi hémolytique qui dû à une hémolyse intense entraînant une décharge importante de bilirubine, l'ictère hépatique ou hépatocyttaire dû à une insuffisance hépatique fonctionnelle, avec un trouble de la captation, de la conjugaison ou de l'excrétion de la bilirubine, l'ictère post hépatique ou post hépatocyttaire dit aussi cholestatique dû à une rétention de la bilirubine à la suite de l'obstruction, voire de l'occlusion des voies biliaires. Dans chacune de ces trois pathogénies l'ictère reconnaît plusieurs causes spécifiques d'origine parasitaire, immunotoxique et infectieuse.

Face à un ictérique, le médecin doit adopter une démarche clinique et diagnostique claire et organisée, afin de déterminer la cause de l'ictère, puis d'établir un pronostic et prescrire un traitement. Pour y parvenir, il dispose de nombreux examens complémentaires, parmi lesquels on peut citer le dosage de la bilirubine.

Notre travail a consisté de mettre en relief cette pathologie assez mal diagnostiquée dans notre pays. Néanmoins pour pouvoir interpréter les résultats biologiques des paramètres indicateurs de cette pathologie, il est impératif de connaître les valeurs usuelles de ces paramètres dont la bilirubine représente le paramètre le plus important.

La mesure de la bilirubinémie permet d'une part de confirmer l'ictère clinique, qui peut être plus ou moins intense et d'autre part, en différenciant les formes conjuguées (dites directes) et non conjuguées (dites indirectes).

Les objectifs principaux de cette étude sont :

1. Décrire le métabolisme de la bilirubine.
2. Décrire la physiopathologie de l'ictère simple du nouveau-né et citer quelques circonstances favorisantes.
3. Donner les taux sanguins pour lesquels l'hyperbilirubinémie non conjuguée peut devenir pathologique, toxique.
4. Citer les principales étiologies des ictères à bilirubine non conjuguées.
5. Citer méthodes et indications des différentes thérapeutiques.

RAPPELS ANATOMO PHYSIOLOGIQUES :

Foie :

✓ *Définition :*

Le foie est un organe abdominal impair et asymétrique, logé chez l'homme dans l'hypocondre droit, la loge sous-phrénique droite, la partie supérieure du creux épigastrique puis atteint l'hypocondre et qui assure trois fonctions vitales : une fonction d'épuration, une fonction de synthèse et une fonction de stockage. C'est le plus volumineux des viscères humains (deux pour cent du poids corporel, soit une moyenne de 1 500 grammes) et l'organe du corps humain qui effectue le plus grand nombre de transformations chimiques.

✓ *Anatomie :*

Le foie est divisé en secteurs, eux-mêmes divisés en segments.

-Les veines sus-hépatiques délimitent le foie en secteurs :

- i. La veine sus-hépatique gauche sépare le secteur latéral du secteur paramédian gauche,
- ii. La veine sus-hépatique médiane sépare le foie droit du foie gauche c'est-à-dire le secteur paramédian gauche du secteur antérieur droit (ou secteur paramédian droit)
- iii. La veine sus-hépatique droite sépare le secteur antérieur droit du secteur postérieur droit (ou secteur latéral droit).

-Les branches de division de la veine porte délimitent les secteurs du foie en huit **segments** numérotés de I à VIII sur la face inférieure du foie dans le sens inverse des aiguilles d'une montre :

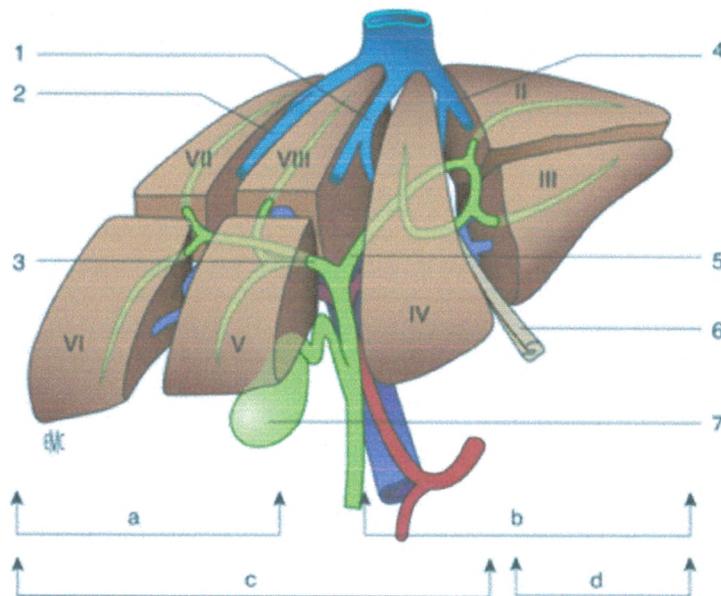
- ✚ le segment I correspond au lobe de Spiegel et à la partie du foie en avant de la veine cave ;
- ✚ le segment II correspond au secteur postérieur gauche ;
- ✚ les segments III et IV correspondent au secteur antérieur gauche ;
- ✚ le segment V correspond à la partie inférieure et le segment VIII à la partie supérieure du segment antérieur droit ;
- ✚ le segment VI correspond à la partie inférieure et le segment VII à la partie supérieur du segment postérieur droit.

Ainsi le foie droit contient les segments V, VI, VII et VIII et le foie gauche comprend les segments II, III et IV.

-La division anatomique du foie divise le foie en deux lobes séparés par le ligament falciforme (ou ligament suspenseur):

- ✚ Le lobe droit (deux tiers du volume) comprend le foie droit plus le segment IV ;
- ✚ Le lobe gauche (un tiers du volume) comprend le foie gauche moins le segment IV : il contient donc les segments II et III.

En chirurgie, on décompose le foie en deux héli-foies : foie droit (segments I, II, III, IVa et IVb) et foie gauche (segments V, VI, VI, VII et VIII) Le foie gauche reçoit la branche gauche de division de l'artère hépatique et de la veine porte, le foie droit la branche droite. Cette segmentation est essentielle pour la chirurgie hépatique puisqu'elle permet l'ablation d'un segment sans gêner la vascularisation des autres segments. Il est entouré de la capsule de Glisson, composée de feuilletts péritonéaux ; c'est cette capsule qui véhicule la sensation douloureuse (le foie n'étant pas innervé il ne peut pas véhiculer les douleurs).



Segmentation hépatique de Couinaud :

1. Veine hépatique médiane ; 2. Veine hépatique droite ; 3. Canal hépatique droit ; 4. Veine hépatique gauche ; 5. Canal hépatique gauche ; 6. Ligament rond du foie ; 7. Vésicule. a. Foie droit ; b. foie gauche ; c. lobe droit ; d. lobe gauche. II à VIII : segments.

✓ *Vascularisation :*

L'apport sanguin est réalisé par l'artère hépatique, amenant le sang oxygéné, et par la veine porte ramenant le sang du tube digestif riche en nutriments en période post-prandiale. Le sang de ces deux vaisseaux se mélange dans les sinusoides hépatiques qui cheminent entre les travées d'hépatocytes pour se réunir dans une veine centrolobulaire. Le retour veineux du foie s'effectue par les veines hépatiques, également appelées veines sus-hépatiques, qui se jettent dans la veine cave inférieure.

✓ *Voies biliaires intra et extra-hépatiques :*

Les hépatocytes sécrètent la bile dans les canalicules biliaires qui confluent et forment les canaux hépatiques droit et gauche dont la réunion forme le canal hépatique commun qui quitte le foie au niveau du hile hépatique. Le canal cystique issu de la vésicule biliaire se jette dans le canal hépatique commun qui devient le cholédoque, lequel s'abouche dans le duodénum.

✓ *Structure :*

Le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique), qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie.

80 % des cellules du foie sont des hépatocytes mais il existe d'autres types cellulaires :

- cellules des canaux biliaires ;
- cellules endothéliales ;
- cellules de Küppfer (macrophage) ;
- cellules de Ito (fonction métabolique de la vitamine A et des lipides, et fabrique la matrice extracellulaire autour de cellules endothéliales) ;
- lymphocytes hépatocytaires.
- cellules ovales (cellules pluripotente) - fonction de régénération des hépatocytes et endothéliales

Les cellules hépatiques sont groupées à l'intérieur du foie en formations spéciales, les lobules hépatiques.

Les lobules hépatiques sont donc des groupements de cellules hépatiques, de forme polyédrique, dont l'agencement est déterminé par la disposition des vaisseaux et des voies biliaires intra hépatiques. Les lobules hépatiques sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif, auxquelles on donne le nom d'espace porte ou espace de Kiernan, où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intra hépatiques.

✓ *Fonctions :*

▪ **Fonction Nutritionnelle**

- Rôle dans le métabolisme des glucides :
 - décomposition de l'insuline et d'autres hormones.
 - néoglucogénèse (formation de glucose à partir d'acides aminés).
 - glycogénolyse (formation de glucose à partir de glycogène).
 - glycogénogénèse (formation de glycogène à partir de glucose).
- Rôle dans le métabolisme des lipides :
 - synthèse de cholestérol.
 - dégradation du cholestérol en acides biliaires (le foie est le seul organe permettant l'élimination du cholestérol)
 - production de triglycérides.
 - synthèse de lipoprotéines.

▪ **Fonction Sanguine**

- Rôle dans le métabolisme des protéines :
 - production des facteurs de coagulation (I (fibrinogène) III, V, VII, IX, XI).

- Destruction des hématies et leucocytes vieillissants, ainsi que de certaines bactéries présentes dans le sang ;
- Transformation de la bilirubine libre en bilirubine conjuguée..

Le foie est aussi le plus important régulateur de glycémie dans le sang (et plus précisément le plasma). En effet, il est le seul organe à passer de producteur à stockeur de glucose. On dit qu'il est hypoglycémiant (stockage de glucose sous forme de glycogène) ainsi qu'hyperglycémiant (libère du glucose dans le sang après avoir fait une glycogénolyse).

C'est en période de jeûne que le foie rejette du glucose dans le sang. Grâce à l'enzyme glucose-6-phosphatase, il transforme le glycogène, synthétisé pour le stockage, en glucose. Cette enzyme étant inexistante dans les tissus adipeux (comme les muscles), le glycogène synthétisé ne peut pas y être détruit en glucose puis libéré dans le sang. Le foie est donc le seul organe hyperglycémiant, bien que les lipocytes (tissus adipeux) et les myocytes (cellules musculaires) puissent stocker du glycogène.

▪ **Fonction Antitoxique**

- Destruction des toxines et des médicaments (clairance hépatique).
- Conversion de l'ammoniac en urée.

▪ **Fonction Martiale**

- Stockage d'une multitude de substances, dont la vitamine B12, le fer, le cuivre et le glucose (sous forme de glycogène). Celles-ci sont récupérées lors de la destruction des vieilles hématies.

Voies biliaires :

✓ *La bile :*

La bile est formée par les hépatocytes et drainée par des sillons creusés sur les surfaces pariétales des hépatocytes.

Des gouttières appartenant à deux hépatocytes, placées en vis-à-vis, forment des canalicules borgnes d'un diamètre de 1µm. Elles convergent pour former des ductules biliaires ayant une paroi épithéliale propre. De là, la bile va se trouver stockée par la vésicule biliaire et/ou progresser vers le tube digestif par le canal cholédoque dont l'extrémité est fermée par le sphincter d'Oddi.

La bile résulte à la fois de processus de sécrétion et d'excrétion.

Les produits de sécrétion sont les phospholipides, immunoglobulines A, acides biliaires et les produits d'excrétion sont le cholestérol, les pigments biliaires, les métabolites des xénobiotiques....

Les fonctions d'excrétion sont assurées par des transporteurs membranaires (MDR, MRP...) situés sur les membranes canaliculaires.

La bile est la sécrétion exocrine du foie, son principal rôle est de favoriser l'absorption des graisses grâce aux sels biliaires.

Chez l'homme, les hépatocytes secrètent quotidiennement environ 1L de bile.

La bile est un liquide jaune (bile hépatique) ou vert olive (bile vésiculaire), son pH est basique entre 7.6 et 8.6.

La bile est principalement formée d'eau (97% pour la bile hépatique et 87% pour la bile vésiculaire) et d'acides biliaires (1.5 à 3% de la matière sèche de la bile), de cholestérol (rendu soluble par les sels biliaires et la lécithine), de phospholipides appelés lécithines, de pigments biliaires (déchets provenant de la dégradation de l'hémoglobine et donnant sa couleur à la bile) et d'ions notamment de bicarbonates.

La bile est sécrétée en continu par le foie, puis éventuellement stockée dans la vésicule biliaire qui la concentre ce qui explique une composition différente pour la bile hépatique et la bile vésiculaire.

✓ *La vésicule biliaire :*

La vésicule biliaire est une poche borgne, elle stocke la bile produite par le foie en période interprandiale . Cela évite d'exposer inutilement la muqueuse digestive pendant la période de jeûne aux sels biliaires qui sont toxiques pour les entérocytes. La muqueuse vésiculaire va réabsorber de l'eau et des électrolytes (Na^+ et Cl^-) pour limiter le volume de bile à stocker et elle sécrète de la mucine (protectrice des parois) et des ions H^+ (acidification de la bile).

La vidange de la vésicule biliaire peut se faire soit de façon quasiment totale au cours d'un repas (chasse biliaire) ou périodiquement mais de façon partielle en phase interprandiale (chez le sujet à jeun).

Au cours d'un repas (homme, carnivores), la vésicule biliaire se vide presque complètement (80%) et exponentiellement en 15-45 minutes grâce aux contractions des fibres lisses de la paroi vésiculaire et une ouverture du sphincter d'Oddi.

Un repas gras avec la présence de lipides dans le duodénum favorise la vidange biliaire via une sécrétion accrue de CCK (une hormone qui stimule également la production d'un suc pancréatique riche en enzymes digestives).

Après un repas, la vésicule reste vide, la totalité de la bile produite par le foie en période post-prandiale étant directement dirigée vers l'intestin. Ce n'est qu'avec la période de jeûne (environ 6-8h après un repas chez l'homme) que la vésicule va à nouveau se remplir car le sphincter d'Oddi est fermé.

Chez le sujet à jeun, la vésicule biliaire à nouveau remplie va se vider partiellement (20%) et périodiquement (environ toutes les 90 minutes) en synchronisation avec les phases du complexe moteur migrant de l'intestin.

la bile hépatique ce qui prévient la formation de microcalculs.

Le sphincter d'Oddi régule les flux biliaires soit vers le duodénum (lorsqu'il est ouvert) soit vers le canal cystique et la vésicule lorsqu'il est fermé.

Acides biliaires :

Les acides biliaires (également connus sous le nom de sels biliaires) sont des stéroïdes acides se trouvant principalement dans la bile de mammifères.

Chez l'homme, l'acide taurocholique et l'acide glycocholique (dérivés de l'acide cholique) représentent environ 80% de tous les acides biliaires.

Les deux principaux acides biliaires sont l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique.

Leur glycine et leur taurine, ainsi que leur dérivés de 7-alpha-déshydroxylé (acide désoxycholique et acide lithocholique) se trouvent dans la bile intestinale humaine.

Une augmentation de l'écoulement de la bile est corrélée à une augmentation de la sécrétion d'acides biliaires.

Les acides biliaires ont comme fonction principale de faciliter la formation de micelles, ce qui favorise la transformation des graisses alimentaires.

✓ *Production et diffusion :*

Les acides biliaires sont produits dans le foie par l'oxydation du cholestérol, ils sont conjugués avec la taurine ou de l'acide aminé glycine, ou encore avec un sulfate ou un glucuronide, et sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire.

Lors d'un repas contenant des matières grasses, le contenu de la vésicule biliaire est sécrété dans l'intestin.

Chez l'homme, l'étape limitant le taux est l'ajout d'un groupe hydroxyle sur la position 7 du noyau stéroïde par l'enzyme de cholestérol 7-alpha hydroxylase.

Les acides biliaires servent de multiples fonctions, notamment : l'élimination du cholestérol de l'organisme ; faire que le flux de bile va éliminer des catabolites du foie, des lipides émulsifiants et des vitamines liposolubles dans l'intestin ; aider à la réduction de la flore de bactéries trouvée dans l'intestin grêle et les voies biliaires.

Le terme *acide biliaire* se réfère à la forme conjuguée.

Dans le milieu alcalin du duodénum, les acides biliaires peuvent devenir des sels biliaires à la suite de la baisse de pH et du pKa des acides.

Sels biliaires se réfère à la forme ionique de la sécrétion d'acides biliaires.

Le corps produit environ 800 mg de cholestérol par jour et près de la moitié est utilisé pour la synthèse des acides biliaires.

Au total, environ 20-30 grammes d'acides biliaires sont sécrétés dans l'intestin par jour ; environ 90% de l'excrétion d'acides biliaires sont réabsorbés (par transport actif dans l'iléon) et recyclés.

La bile est également utilisée pour briser la graisse dans de minuscules gouttelettes.

✓ *Types :*

Les sels biliaires constituent une grande famille de molécules, composée d'une structure stéroïde à quatre cycles, de cinq ou huit carbones et d'un acide carboxylique qui met fin à la chaîne, et de la présence de groupes hydroxyle d'orientation différente.

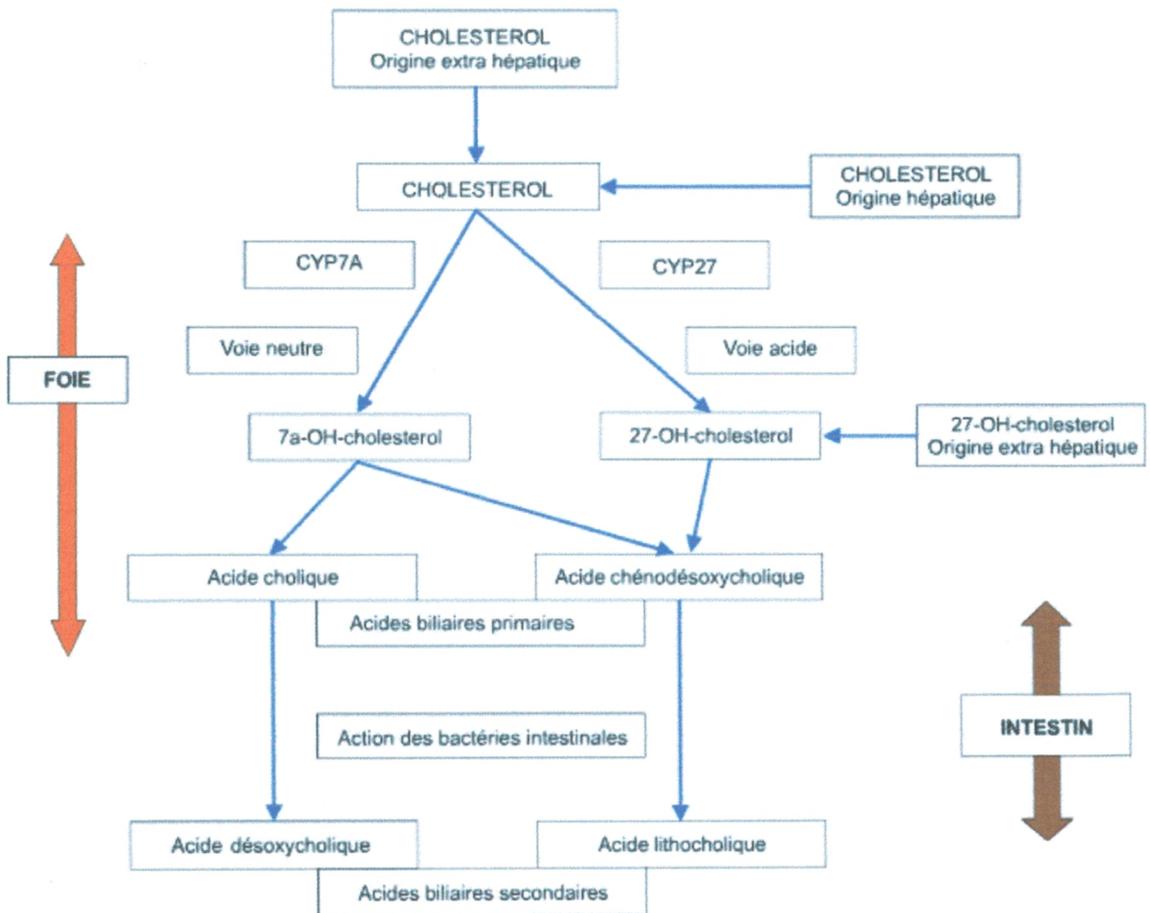
Les quatre anneaux sont marqués de gauche à droite: A, B, C et D, le D-anneau est plus petit d'un carbone que les trois autres. Les groupes hydroxyle ont le choix d'être en 2 positions, l'une (ou les) appelée bêta, ou vers le bas, appelée alpha. Tous les acides biliaires ont un groupe hydroxyle sur la position 3, qui a été dérivée de la molécule mère, le cholestérol. Dans le cholestérol, les 4 anneaux de stéroïdes sont plats et la position de la 3-hydroxy est bêta.

Dans de nombreuses espèces, la première étape dans la formation d'un acide biliaire est l'ajout d'un groupe 7- α -hydroxy. La suite, dans la transformation à partir du cholestérol d'un acide biliaire, est la jonction entre les deux premiers anneaux stéroïdes (A et B), qui est modifiée, ce qui rend la molécule courbée, et dans ce processus, le 3-hydroxy est converti à l'orientation α . Ainsi, la valeur par défaut la plus simple des acides biliaires (de 24 atomes de carbone) présente deux groupes hydroxyles dans les positions 3- α et 7- α . Le nom chimique de ce composé est de 3- α - α , acide 7-dihydroxy-5- β -cholane-24-OCI, ou comme il est connu sous le nom d'acide chénodésoxycholique.

Un autre des acides biliaires, l'acide cholique (avec 3 groupes hydroxyles) a déjà été décrit, de sorte que la découverte de l'acide chénodésoxycholique (avec 2 groupes hydroxyle) fait du nouvel acide biliaire un "acide désoxycholique" car il avait un groupe hydroxyle de moins que l'acide cholique. La partie 5- β du nom indique l'orientation de la jonction entre les anneaux A et B du noyau stéroïde (dans ce cas, ils sont courbés). Le terme "cholane" désigne une structure stéroïde de 24 atomes de carbone, et le "24-OCI acide" indique que l'acide carboxylique est trouvé à la position 24, qui se trouve être à la fin de la chaîne latérale. L'acide chénodésoxycholique est produit par de nombreuses espèces, et est une forme tout à fait fonctionnelle d'acides biliaires. Son principal inconvénient réside dans la capacité des bactéries intestinales à supprimer le groupe hydroxyle 7- α , un processus appelé déshydroxylation. L'acide biliaire ne disposant que d'un 3- α et d'un groupe hydroxyle est appelé acide lithocholique (à cause de la pierre lithographique). Il est peu soluble dans l'eau et non toxique pour les cellules. Les acides biliaires formés par synthèse dans le foie sont qualifiés de "primaires", et de ceux formés par les bactéries sont qualifiés de "secondaire". En conséquence, l'acide chénodésoxycholique est un acide biliaire primaire, et l'acide lithocholique est un acide biliaire secondaire.

✓ *Régulation :*

Comme les agents de surface ou les détergents, les acides biliaires sont potentiellement toxiques pour les cellules et leur niveau est étroitement réglementé. Elles fonctionnent directement en tant que molécules de signalisation dans le foie et l'intestin par l'activation d'un récepteur nucléaire de l'hormone connu sous le nom de FXR également connu sous le nom de gènes NR1H4. Il en résulte l'inhibition de la synthèse des acides biliaires dans le foie lorsque les niveaux d'acides biliaires sont trop élevés.



Origine des acides biliaires

Bilirubine :

La bilirubine est un pigment jaune, dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère qui peut relever de causes très diverses. La bilirubine intègre le bol alimentaire au niveau de l'intestin grêle, avec les autres pigments biliaires. Elle est par la suite dégradée en stercobiline, pigment brun donnant sa couleur aux matières fécales.

✓ Production :

50 mmol de bilirubine sont produites chaque jour chez l'adulte sain dont :

- . 90 % proviennent de la dégradation des G.R. sénescents par les macrophages du système réticuloendothélial (surtout la rate, foie et moelle osseuse)
- . 10 % proviennent de la dégradation des autres hémoprotéines (protéines héminiques) situées principalement dans la moelle osseuse et le foie.

La fraction hème de l'Hb est dégradée en fer et en un produit intermédiaire, la biliverdine, par une enzyme, l'hème oxygénase. Une autre enzyme, la biliverdine réductase, convertit la biliverdine en bilirubine. Ces étapes prennent place essentiellement dans les cellules du système réticulo-endothélial (monocytes/macrophages). L'accentuation de l'hémolyse des GR est la cause la plus importante d'augmentation de la synthèse de la bilirubine. Une production accrue de bilirubine précocement marquée survient dans certains troubles hématologiques avec érythropoïèse inefficace, mais elle ne se traduit habituellement par aucun signe clinique.

✓ Transport plasmatique :

La bilirubine ainsi formée, du fait de sa quasi insolubilité dans l'eau (présence de ponts hydrogènes intra-moléculaires), est transportée dans le plasma liée à l'albumine : c'est la bilirubine libre, non conjuguée (ou « indirecte ») qui est toxique et peut être nocive.

✓ Métabolisme hépatique :

Au niveau du foie, la bilirubine libre est captée par les hépatocytes, conjuguée par l'UDP-glucuronyl-transférase avec formation de bilirubine glycuconjuguée (ou "directe") hydrosoluble et donc non toxique.

Le mécanisme de captation de la bilirubine par le foie et le rôle des protéines de liaison intracellulaire ne sont pas clairs. La captation de la bilirubine est rapide et fait probablement appel à un mécanisme de transport actif, mais ne comprend pas la captation de l'albumine liée.

Après conjugaison, sécrétée au pôle biliaire dans la bile.

La bilirubine est donc dite libre jusqu'à la conjugaison hépatique, puis conjuguée ensuite. La bilirubine conjuguée est soluble, elle peut donc être filtrée par le rein.

✓ Devenir intestinal et urinaire de la bilirubine dans le tube digestif :

La bilirubine conjuguée est sécrétée dans le canalicule biliaire avec d'autres constituants de la bile. D'autres anions organiques et certains médicaments peuvent affecter ce mécanisme complexe. Dans l'intestin, le pigment est déconjugué et réduit par la flore bactérienne pour

former divers composés appelés stercobilinogènes. La plupart d'entre eux sont éliminés dans les selles et sont responsables de leur coloration brunâtre ; des quantités importantes sont absorbées et excrétées de nouveau dans la bile, et de petites quantités sont éliminées dans les urines sous forme d'urobilinogène. Le rein peut excréter le diglucuronide de bilirubine, mais pas la bilirubine non conjuguée. Cela explique la coloration foncée des urines, typique de l'ictère par insuffisance hépato-cellulaire ou par cholestase, tandis que l'ictère hémolytique ne s'accompagne pas d'élimination urinaire de bilirubine.

Schemas illustratifs :

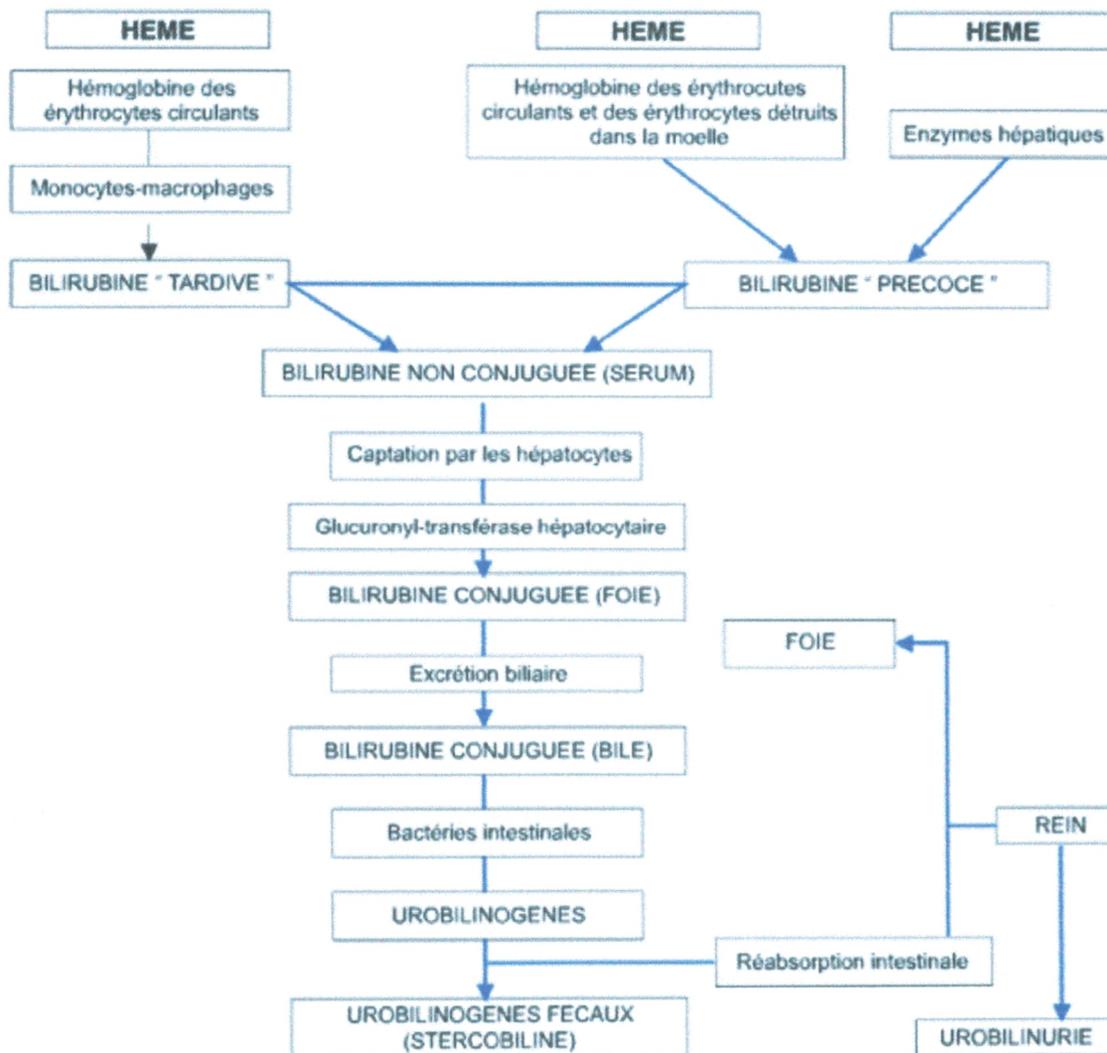


Figure-1-

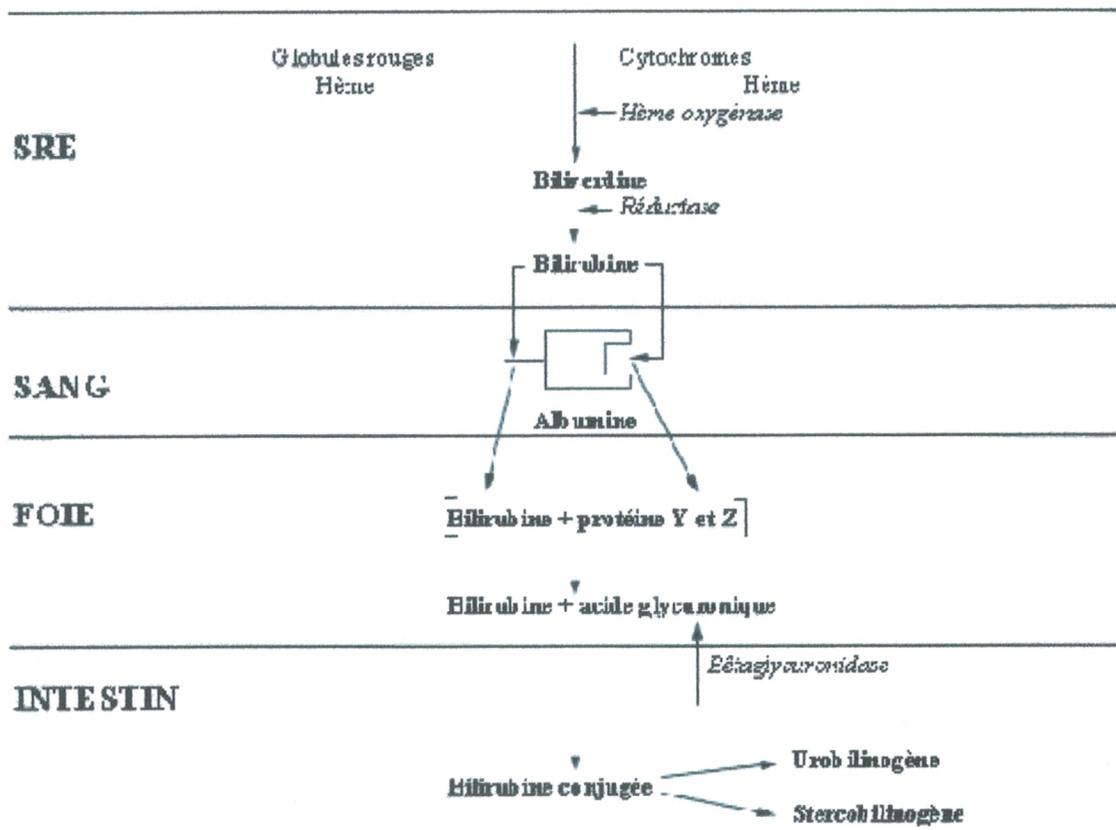


Figure-2-

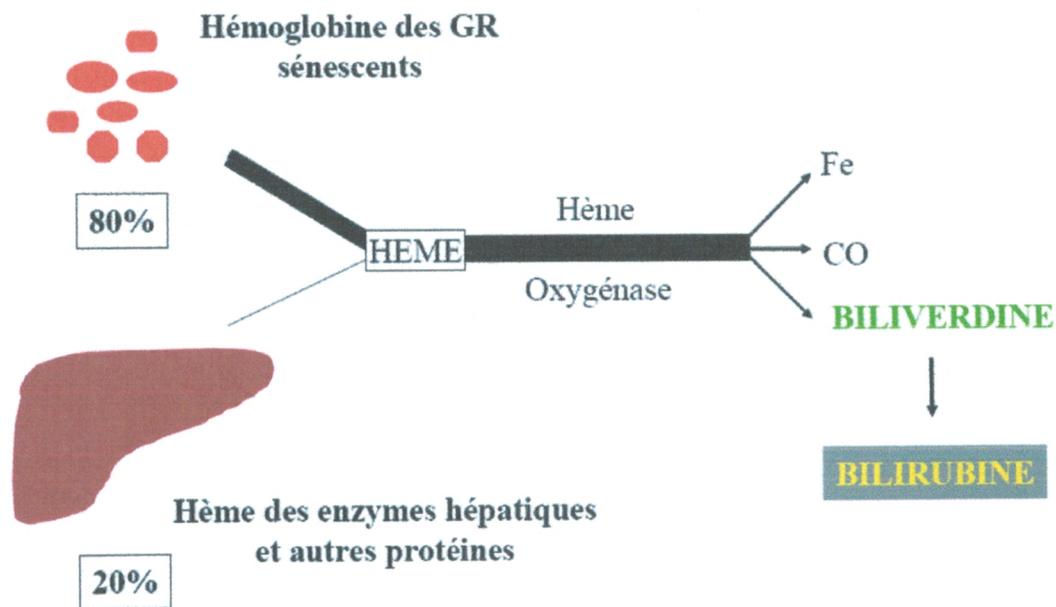


Figure-3-

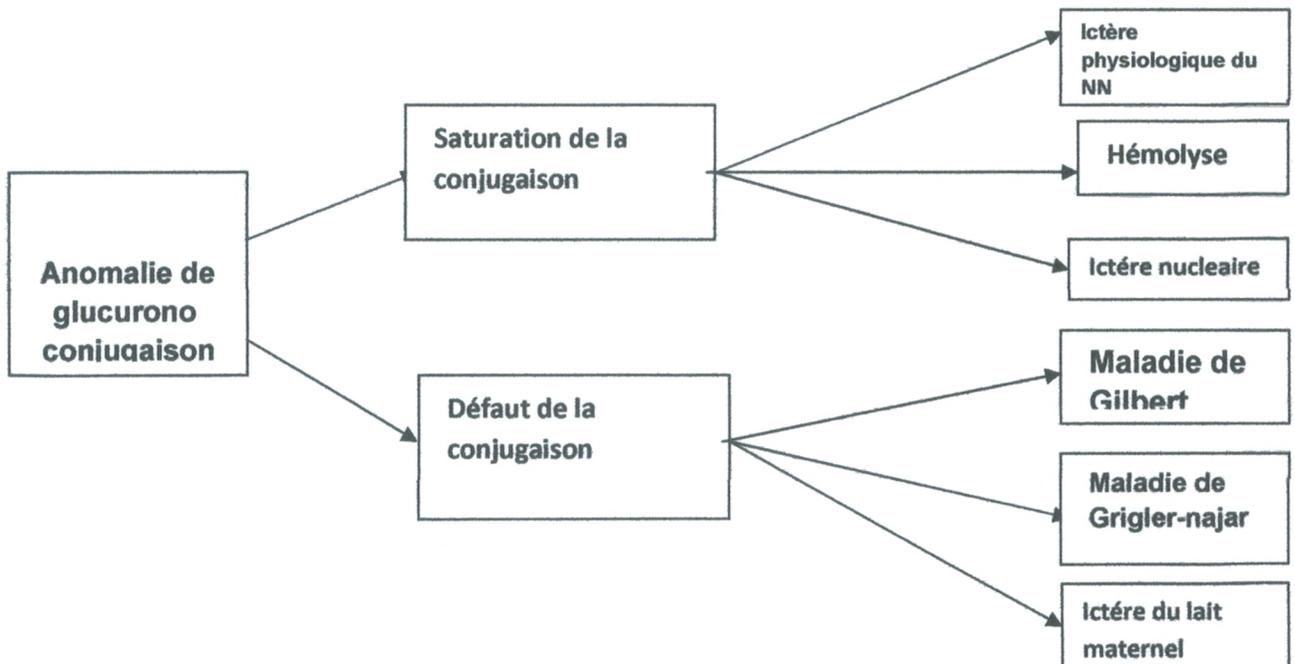
ETHIOLOGIES DES ICTERES:

➤ Ictères à BR non conjuguée :

Ils représentent, de très loin, le plus gros chapitre du diagnostic étiologique des ictères de la période néonatale.

Un ictère à bilirubine non conjuguée survient fréquemment chez le nouveau né en raison à la fois d'une hémolyse physiologique et d'une certaine immaturité de l'enzyme glucuronyl transférase (ictère physiologique du nouveau né).

En dehors de cet ictère il existe d'autres types dits ictères pathologiques qui peuvent avoir plusieurs étiologies qui sont liés le plus souvent à une anomalie de glucurono-conjugaison :



I - Saturation de conjugaison :

I-I / L'ictère physiologique du nouveau-né :

1 - Physiopathologie :

Tous les nouveau-nés présentent un ictère dit physiologique maximum au cinquième jour de vie.

La surveillance de cet ictère en maternité s'effectuera par la mesure du taux de bilirubine accumulé au niveau des sites cutanés (bilirubinomètre) et s'il y a doute, on pratiquera un dosage sanguin.

On dit qu'il y a hyperbilirubinémie non conjuguée pathologique lorsque le taux de bilirubine est :

- Supérieur à 10 % du poids du corps pour un enfant de poids de naissance < 2 kg500 (exemple : 150 mmol/l pour un enfant de 1500 gr).
- Supérieur à 250 mmol/l pour un enfant de poids de naissance > 2 kg 500

2 - Diagnostic :

C'est un diagnostic d'élimination : test de Coombs direct négatif, absence d'incompatibilité dans le système AB0

3- Etiologies:

Ce type d'ictère est le résultat de nombreux processus :

- L'insuffisance de la liaison bilirubine-albumine, l'éventualité d'accouchements dystociques avec hématomes et attrition musculaire,
- Dans la cellule hépatique, l'enzyme glycuronyl transférase n'est synthétisée que progressivement ; l'acide glucuronique, qui se lie à la bilirubine, est un intermédiaire du cycle de Krebs lui-même dépendant des apports énergétiques, faibles dans les premières heures de vie.
- L'hème oxygénase secrété sous l'influence de l'adrénaline et du glucagon est très actif.
- L'immaturité du foie à la naissance; Le nouveau-né possède un très grand nombre de globules rouges contenant de l'hémoglobine F (fœtale), globules qui doivent être remplacés par des globules chargés d'hémoglobine A (adulte). Cela provoque une hémolyse (destruction de globules rouges) importante en très peu de temps. Le foie n'a parfois pas encore bien développé son équipement enzymatique pour transformer toute la bilirubine libre, qui va alors s'accumuler et provoquer un ictère.

Au total : excès de production de bilirubine et défaut de captation hépatique et de conjugaison de cette bilirubine. Toutes ces situations contribuent à l'accumulation de la bilirubine libre, pigment d'autant plus toxique que le nouveau-né est pré terme, malade et/ou soumis à un jeûne prolongé.

4 -Mécanismes :

Les globules rouges sont fabriqués en permanence dans la moelle osseuse. Ils passent ensuite dans le sang et, après une vie de 120 jours, vont mourir dans la rate. Cette destruction normale

donne lieu à la libération de bilirubine libre. Cette bilirubine libre est toxique à partir d'un certain taux pour le cerveau.

La bilirubine libre sanguine arrive dans le foie où des processus biochimiques vont la transformer en bilirubine conjuguée qui, elle, n'est pas toxique et qui est un des composants de la bile. Ce pigment est à l'origine de la coloration des selles et des urines.

Chez le nouveau-né, le nombre de globules rouges est plus élevé que chez l'adulte et il existe une hyper destruction de ces cellules. Ce nombre de globules rouges détruits peut dépasser les possibilités enzymatiques d'un foie immature. Il en résulte un excès de bilirubine qui se traduit par un ictère simple physiologique. C'est le cas de loin le plus fréquent.

5-Signes cliniques:

L'enfant est jaune mais il ne présente aucun autre signe anormal. La taille du foie à la palpation est normale. La rate n'est pas augmentée de volume. Selles et urines sont normalement colorées. Certaines circonstances l'intensifient : l'anoxie, l'acidose, la résorption d'hématomes, l'hypoglycémie, l'administration de certains médicaments.

I-II ictère hémolytique :

L'ictère hémolytique du nouveau-né l'hémolyse pouvant être soit de nature immunologique soit de nature constitutionnelle.

C est un ictère précoce qui survient au cours des 24 premières heures de la vie. Ce type d'ictère devient rapidement important et s'associe à une destruction par éclatement des hématies entraînant une anémie.

C'est le cas notamment des incompatibilités sanguines foetomaternelles (systèmes Rhésus ou ABO). Les globules rouges sont détruits en grand nombre ; le foie est débordé et ne peut métaboliser toute cette bilirubine libre qui lui arrive et dont le taux sanguin augmente. Les maladies hémolytiques familiales (thalassémie, drépanocytose, maladie de Minkowski-Chauffard, déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase) peuvent se révéler dès la naissance par un ictère intense.

Dans d'autres cas, c'est le foie qui est malade. Il ne peut pas transformer la bilirubine soit parce qu'il est infecté (hépatites) soit parce que les enzymes sont déficients ou inhibés (allaitement maternel, médicaments etc.).

Enfin, l'hémolyse peut être normale, le foie peut fonctionner correctement mais un obstacle à l'écoulement de la bile provoque une rétention de bilirubine conjuguée. Celle-ci passe dans le sang et son taux élevé détermine un ictère cholestatique . Dans ce cas là, les selles sont décolorées.

1) Incompatibilités sanguines :

i. Les allo-iso-immunisations : incompatibilité rhésus entre la mère et l'enfant cas le plus à risque d'ictère intense. La mère est Rh -, l'enfant Rh+, avec présence d'anticorps antiD chez la mère. L'enfant développe une hémolyse à la suite du contact avec le sang maternel

lors de l'accouchement. L'ictère par incompatibilité Rhésus.

Le facteur Rhésus est un antigène présent à la surface des globules rouges chez 85% des individus. 15% des personnes n'en possèdent donc pas : elles sont Rhésus négatif par rapport à la majorité Rhésus positif.

Définition :

Un antigène est une substance qui, introduite dans l'organisme, provoque chez ce dernier la fabrication d'anticorps spécifiques destinés à détruire la substance antigénique spécifique introduite.

Un individu Rhésus positif ne possède pas d'anticorps anti-Rhésus puisque cet antigène lui appartient et ne lui est donc pas étranger.

Un individu Rhésus négatif ne possède pas non plus d'anticorps anti-Rhésus au départ. Mais si on le transfuse avec du sang, dans le même groupe ABO, mais Rhésus positif, il va percevoir comme étranger cet antigène Rhésus et fabriquer des anticorps dont le rôle sera de détruire les globules rouges Rhésus positifs étrangers qui ont osé l'envahir... Ces anticorps vont persister dans la mémoire immunologique de l'individu toute sa vie.

Explication du mécanisme

Lorsqu'une femme Rhésus négatif est enceinte et que le procréateur est Rhésus positif, l'enfant peut être Rhésus positif ou négatif selon les lois de la génétique. S'il est Rhésus négatif, il n'y a aucun problème. S'il est Rhésus positif, ses globules rouges sont considérés comme étrangers par sa mère.

Heureusement, les circulations sanguines de la mère et du fœtus étant distinctes, les globules rouges du fœtus ne passent généralement pas dans le sang de la mère qui n'a donc pas l'occasion de s'immuniser.

Par contre, lors de l'accouchement, il y a toujours au niveau des saignements habituels un mélange des sangs. Quelques globules rouges de l'enfant passent dans la circulation de la mère. Ils provoquent en quelques jours la fabrication maternelle d'anticorps destinés à les détruire. Ces anticorps (agglutinines irrégulières) vont persister durant toute la vie de la mère.

Lors d'une grossesse ultérieure, si le fœtus est Rhésus positif, les anticorps fabriqués quelques années auparavant vont traverser le placenta et attaquer les globules rouges du fœtus, provoquant une anémie hémolytique. Cette agression est d'importance variable. Au pire, elle entraîne la mort du fœtus in utero et l'avortement. Parfois, le tableau est un peu moins grave : le bébé naît bouffi, empli d'œdèmes avec un gros foie et une grosse rate. Seule une réanimation massive peut parfois le sauver mais la mortalité reste élevée.

A un degré moindre, c'est l'hémolyse et l'ictère néonatal précoce qui apparaissent au cours des 24 premières heures de vie. Le nouveau-né est pâle et jaune tout à la fois. Rate et foie sont augmentés de volume. Le taux de bilirubine augmente rapidement et doit être surveillé en fonction de l'âge en heures de l'enfant. Le test de Coombs direct établit le diagnostic. Lorsque le taux est dans une zone dangereuse, l'exsanguino-transfusion est décidée.

ii. Incompatibilité ABO

L'incompatibilité dans le système ABO : ce diagnostic est évoqué de principe lorsque la mère est de groupe O+, que l'enfant est de groupe A ou B. L'hémolyse est moins sévère que dans les ictères par allo-iso-immunisation.

Toute femme du groupe 0 (donneur universel) possède des anticorps anti-A et anti-B (agglutinines régulières) qui peuvent traverser le placenta et provoquer une hémolyse chez le fœtus. L'ictère est précoce : il apparaît avant 24-48 heures. Il est souvent modéré.

Le test de Coombs direct est positif chez l'enfant. Toutefois, les risques d'ictère nucléaire sont identiques et une exsanguino-transfusion avec du sang 0 peut s'avérer nécessaire.

2) Quelques maladies hémolytiques :

a- Maladie de Minkowski Chauffard :

La maladie de Minkowski Chauffard est une maladie génétique, caractérisée par une anomalie des protéines constituant la membrane des globules rouges qui deviennent sphériques et fragiles, entraînant une anémie hémolytique chronique, un subictère et une splénomégalie.

Etiologie :

Il s'agit d'une maladie héréditaire, et les deux sexes sont également affectés. La transmission est de type autosomale dominante par atteinte d'un gène réglant la synthèse d'une protéine de la membrane des globules rouges (ankyrine). Si le gène de la spectrine est muté, la maladie est autosomique récessive. La mutation d'un allèle ne suffit pas à provoquer l'apparition des symptômes associés à la maladie

Pathogénie :

Le défaut essentiel réside dans la forme anormale des globules rouge qui sont des microsphérocytes. D'un diamètre globulaire trop petit, mais aussi d'une épaisseur trop grande, ces cellules ont une surface trop petite pour leur volume et sont dès lors très vulnérables à l'hémolyse osmotique : le moindre abaissement de la pression osmotique du milieu extérieur les fait éclater. La maladie de Minkovski-Chauffard pourrait être liée à une spectrine (protéine membranaire du globule rouge) anormale. Cette dernière assure la déformabilité du globule rouge, lui conférant sa capacité de se faufiler dans des capillaires dont le diamètre est inférieur au volume globulaire. Une spectrine anormale est incapable de se fixer à l'ankyrine, provoquant l'apparition de cette maladie.

Symptômes cliniques :

L'ictère est le symptôme dominant : le malade est plus jaune qu'anémique. Son intensité varie d'un jour à l'autre, et il peut manquer par moment, ou pendant de longues périodes chez les sujets dont le foie épure très bien la bilirubine.

La splénomégalie est évidente. D'habitude modérée, elle augmente pendant les poussées d'hémolyse ; dans ce cas la rate peut être douloureuse spontanément et à la pression.

Le foie est parfois augmenté de volume et la région vésiculaire peut être le siège de douleurs spontanées ou provoquées.

L'anémie est minime dans la majorité des cas et ne compromet généralement pas l'activité professionnelle du sujet. L'anémie est toutefois sujette à des poussées d'aggravation (voir complications).

Examens de laboratoire :

Examen hématologique

- Mesures courantes

Le nombre de globules rouges est à peine réduit, sauf en période de poussée. Le taux d'hémoglobine indique que l'anémie est normochrome. Le volume globulaire moyen est soit normal, soit légèrement diminué (77 - 87 microns³).

- Examen du frottis sanguin

La microsphérocytose frappe immédiatement : beaucoup de globules rouges ont un diamètre globulaire très petit (6,0 - 7,2 microns au lieu de 7,5) et sont intensément colorés, sans présenter l'éclaircissement central habituel (à cause de la perte de la forme biconcave)

- Résistance globulaire osmotique

La résistance osmotique est extrêmement abaissée. La courbe d'hémolyse se déroule pour une concentration en sodium comprise entre 0,50 et 0,70 % de (normalement entre 0,40 et 0,45 % de NaCl). C'est là le trait le plus caractéristique de l'affection et il a une grande valeur diagnostique mais sa sensibilité n'est pas optimale, surtout dans les formes symptomatiques. L'autohémolyse à 37°C est accrue.

- Réaction de Coombs

La réaction de Coombs directe (RCD), appelée également test direct à l'antiglobuline (TDA), à la recherche d'auto anticorps, est négative.

- Globules blancs

Les globules blancs (ou leucocytes) sont en nombre normal ou légèrement augmenté.

- Examen de la moelle osseuse

Elle est fortement érythroblastique comme dans toutes les anémies hémolytiques. Cet examen est inutile pour le diagnostic de la maladie.

Données métaboliques

L'hyper bilirubinémie et l'urobilinurie sont celles de tout ictère hémolytique. L'haptoglobine sérique est d'habitude absente ou très abaissée. L'hyper hémolyse n'est généralement pas assez aiguë pour donner lieu à une hémoglobinurie.

b- Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase:

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase bloque la première réaction d'oxydation de la voie des pentoses phosphates. Ainsi, la sous-production de NADPH qui en résulte, réduit fortement les capacités cellulaires à lutter contre le stress oxydant.

Les hématies utilisent la voie des pentoses phosphates pour créer du NADPH nécessaire à la formation du glutathion, l'autre voie classique, utilisant les mitochondries n'existant pas dans les

globules rouges. Ce dernier est impliqué dans la diminution du stress oxydatif du globule rouge. L'hématie, sa membrane cellulaire ainsi fragilisée, sera détruite ce qui provoquera une anémie par hémolyse et un ictère.

Clinique :

Avoir un déficit en G6PD ne signifie pas forcément être malade. En effet sans accident particulier, la personne est bien portante, ne se plaignant de rien et avec une espérance de vie normale. Elle devra, durant toute sa vie, connaître et respecter certaines consignes pour éviter les complications auxquelles le prédispose ce déficit. Sa gravité et les circonstances déclenchantes varient d'un individu à l'autre, en raison des nombreuses mutations possibles du gène responsable avec des conséquences variables sur l'activité de la G6PD.

L'hémoglobine est transformée en méthémoglobine et des corps de Heinz apparaissent dans les hématies et permettent le diagnostic. Typique il s'agit d'une anémie aigue, avec un taux de réticulocytes élevés (régénérative) avec augmentation de la bilirubine non conjuguée pouvant aller jusqu'à l'apparition d'une jaunisse (ictère). La crise peut être causée également par des infections (en particulier, hépatites virales).

Diagnostic :

Il est fait par la quantification de l'activité enzymatique de la G6PD par analyse du taux de production de la NADPH. Il existe toutefois des méthodes de dépistage plus rapide par recherche d'une fluorescence des hématies aux ultraviolets, mais qui nécessite une confirmation par un test plus précis.

I-III L'ictère nucléaire :

Cette grave affection neurologique ne devrait plus se voir grâce à la surveillance et la thérapeutique des ictères néonataux.

A partir d'un certain taux (180 à 200 mg/l ou 340 μ mol/l), la bilirubine sanguine libre, non hydrosoluble, peut se fixer sur les noyaux gris centraux du cerveau et entraîner une grave encéphalopathie. Des dosages modernes plus précis (bilirubine intra-érythrocytaire) permettent d'apprécier plus exactement les taux dangereux.

La bilirubine libre liposoluble toxique est fixée sur l'albumine. Tant qu'elle reste fixée, elle ne peut diffuser dans les structures cérébrales et il n'y a pas de danger.

Le risque d'apparition d'un ictère nucléaire est donc plus grand chez les nouveau-nés qui ont une concentration basse d'albumine ou des substances qui dans leur sérum entrent en compétition avec les sites de liaison de la bilirubine sur l'albumine, y compris les acides gras Libres, l'ion hydrogène et certains médicaments tels que le sulfisoxazole, la ceftriaxone et l'aspirine.

La concentration d'albumine sérique est plus faible chez le prématuré, augmentant donc le risque. Les molécules pouvant entrer en compétition (p. ex. acides gras libres et ions hydrogènes) sont augmentées chez un nouveau-né qui jeûne, qui est infecté, ou qui a une acidose respiratoire ou métabolique. Ces situations cliniques constituent donc un risque supplémentaire quelle que soit la concentration sérique en bilirubine.

Mais cette liaison chimique est fragile : l'hypoxie, l'acidose, l'hypothermie détachent la bilirubine toxique qui se trouve libre alors de se fixer sur les structures cérébrales. De même, un faible taux d'albumine dans le sang augmente le risque cérébral.

Symptômes cliniques :

Le nouveau-né atteint, de couleur jaune vif, a un cri lent, aigu, monocorde. Il présente des troubles du tonus et se met volontiers en opisthotonos : le corps et la tête se renversent en arrière tandis que les membres s'étirent en extension. Ses yeux sont animés de mouvements anormaux. Des troubles neurovégétatifs sont constants. L'ictère nucléaire peut provoquer, plus tard dans l'enfance, un retard mental, une choréoathétose, une surdité de perception et une paralysie de la verticalité du regard. On ne sait pas si des lésions neurologiques moins sévères (p. ex. handicaps sensorimoteurs et troubles de l'apprentissage) peuvent témoigner d'une forme mineure d'encéphalopathie hyperbilirubinémique.

Pronostic :

Le pronostic est mauvais car si l'enfant ne meurt pas, il risque fort de garder des séquelles neurologiques majeures (surdité profonde, mouvements anormaux, troubles du tonus etc.).

Plusieurs cas d'hypoacusies isolées ont été notés après des ictères intenses et la surveillance de l'audition doit être pratiquée après une jaunisse importante.

C'est dire tout l'intérêt de la surveillance des nouveau-nés ictériques, surveillance cliniquement difficile lorsqu'il existe par exemple une pigmentation raciale de la peau. Au moindre doute, un contrôle sanguin de bilirubine doit être demandé au laboratoire, car il n'y a pas de parallélisme absolu entre l'intensité de la jaunisse et le taux sanguin.

II- anomalies de la conjugaison :

II-I maladie de Crigler-Najjar :

Définition :

La maladie de Crigler-Najjar est une maladie mono génique se manifeste dès les premières heures de vie. Elle est causée par la déficience d'une enzyme du foie qui empêche l'élimination de la bilirubine, substance toxique pour l'organisme. Il s'agit en fait d'une jaunisse congénitale qui se prolonge toute la vie.

Le processus de glucurono-conjugaison, accomplie par les UGT, est un mécanisme majeur du métabolisme de phase II. Il permet l'ajout d'acide glucuronique à des composés liposolubles. Cela permet d'augmenter leur solubilité et leur poids moléculaire, ce qui empêche leur réabsorption dans les tissus et donc favorise l'élimination de ces composés dans la bile ou l'urine. Les UGTs sont situées dans la membrane cellulaire au niveau du réticulum endoplasmique. Ces protéines sont exprimées dans à peu près tous les tissus, mais le sont majoritairement dans le système hépatique, rénal, gastro-intestinal et cérébral.

Chaque UGT a une affinité différente pour les différents substrats qui entre dans l'organisme comme les hormones thyroïdiennes et les estradiols.

Structure :

Dans la structure des UGTs, le domaine de liaison au substrat se trouve du côté amino-terminal alors que du côté carboxy-terminal se trouve le domaine de liaison au cofacteur, l'acide glucuronique (UDPGA). Les UGTs se divisent en deux familles. Premièrement, il y a les UGT1 qui elle-même est divisée en UGT 1A1 et UGT2, chaque protéine a un gène différent.

Pathologies :

La maladie de Crigler-Najjar est une maladie rare à transmission autosomique récessive. Les effets de cette maladie sont perceptibles dès la naissance. La conséquence majeure est un taux de bilirubine élevé qui varie selon le type (I ou II). Un taux de bilirubine est considéré comme clinique lorsqu'il atteint 40 à 80 $\mu\text{mol/L}$.

Le type I de la maladie est causé par un déficit total en UGT1A1. le traitement au phénobarbital est inefficace. Le nouveau-né doit recevoir quotidiennement 10 à 12 heures de photothérapie et donc la transplantation hépatique est nécessaire étant donné que cette enzyme est produite dans le foie. Pour ce qui est de la maladie de Crigler-Najjar de type II, elle est moins sévère. Elle provoque une hyperbilirubinémie allant de 150 à 300 $\mu\text{mol/L}$ et il est possible de traiter la personne atteinte avec du phénobarbital. Dans ce cas, le déficit en UGT1A1 n'est que partiel.

II-II Syndrome de Gilbert :

La seule anomalie importante est l'hyperbilirubinémie non conjuguée modérée, dont l'importance clinique est due uniquement au fait qu'elle est souvent confondue avec une hépatite chronique. Ce trouble, probablement chronique, peut atteindre presque 3 à 5 % de la population et est bien souvent détecté fortuitement chez de jeunes adultes ayant une symptomatologie vague et non spécifique. Il peut y avoir des cas familiaux, mais il est souvent difficile d'établir explicitement une transmission génétique.

Sa physiopathologie est mal connue. Il semble qu'il y ait une perturbation complexe de la captation hépatique de la bilirubine, dont les concentrations plasmatiques varient habituellement entre 2 et 5 mg/100 ml (34 et 86 $\mu\text{mol/l}$) et tendent à augmenter au cours du jeûne ou d'autres situations de stress. De plus, l'activité de la glucuronyltransférase est abaissée ; cette anomalie se rapproche donc du syndrome de Crigler-Najjar type II. La durée de vie des GR est souvent légèrement raccourcie, mais pas suffisamment pour expliquer l'hyperbilirubinémie.

Le syndrome de Gilbert peut être facilement distingué de l'hépatite par la normalité de l'exploration fonctionnelle hépatique, l'absence de bilirubine dans l'urine, et le caractère essentiellement non conjugué de l'hyperbilirubinémie. L'hémolyse est éliminée sur l'absence d'anémie et d'augmentation des réticulocytes. L'histologie hépatique est normale, mais la biopsie n'est pas nécessaire au diagnostic. Les patients doivent être rassurés sur l'absence de maladie hépatique.

II-III Ictère au lait maternel

Est le deuxième type d'ictère à bilirubine libre. Celui-ci est le résultat de la présence, dans le lait de la maman, d'une substance qui inhiberait le métabolisme en empêchant la conjugaison de la bilirubine.

Cette variété d'ictère apparaît au cinquième jour après la naissance de l'enfant puis diminue quand la mère n'allait plus au moins pendant 3 jours. Ce type d'ictère disparaît également quand le lait de la maman est chauffé à 60° centigrades. Il s'agit d'un ictère bénin.

C'est un ictère peu intense observé chez un enfant nourri au sein, et qui se prolonge toute la durée de l'allaitement maternel. On peut en faire le diagnostic en chauffant le lait maternel à 60 °C avant de le donner à l'enfant : l'ictère disparaît. Ces nouveau-nés sont jaunes tant que dure l'allaitement maternel. Ce type d'ictère ne présente aucun risque et ne doit faire en aucun cas d'arrêter l'allaitement maternel.

Chez le nouveau-né, en plus de cette destruction normale, il existe des maladies qui provoquent une destruction prématurée des globules rouges. Dont la signification clinique reste le plus difficile à appréhender.

➤ Ictères héréditaires à bilirubine conjuguée :

I. Ictères cholestatiques :

Les conséquences histologiques principales sont une accumulation visible de pigments biliaires dans les hépatocytes et les canalicules biliaires, et des lésions hépatocytaires, principalement périportales, attribuées à la toxicité des acides biliaires.

Clinique :

L'ictère est très sombre, parfois « vert bouteille », les urines sont très foncées, presque noires, les selles sont blanchâtres, graisseuses, mastic.

Il y a une bradycardie et surtout un prurit, parfois féroce, avec lésions cutanées de grattage, dû à l'élévation concomitante des sels biliaires dans le sang. Il y a un gros foie de cholestase.

Biologie:

L'hyperbilirubinémie porte presque exclusivement sur la fraction conjuguée ou directe qui peut atteindre des valeurs supérieures à 500 Les enzymes de cholestase, 7-GT, phosphatases alcalines, 5'nucléotidase, sont bien évidemment très augmentées. Il n'y a pas au début de réaction parenchymateuse d'insuffisance hépatique ni de cytolyse mais rapidement, du fait de la cholestase, les transaminases vont s'élever discrètement.

Ethiologies :

Sont dominées par deux causes :

- la lithiase biliaire (ictère douloureux, fébrile, variable) ;

- le cancer de la tête du pancréas ou des voies biliaires (ictère classiquement indolore, apyrétique, constamment progressif) ;
 - les hépatites et les cirrhoses ont aussi dans leur tableau biologique une élévation de la bilirubine conjuguée, liée à la cholestase intrahépatique, au niveau des canalicules biliaires, par l'oedème et l'inflammation. Cependant, il y a aussi parallèlement une élévation de la bilirubine libre.
- Les causes de la cholestase sont multiples et on distingue habituellement les cholestases intrahépatiques et les cholestases extrahépatiques.

a-Cholestases intrahépatiques :

- Cholestase hépatocellulaire (canaliculaire)
- hépatites virales aiguës ictériques,
- hépatites alcooliques
- hépatites et des cholestases médicamenteuses
- cirrhoses communes
- cholestase gravidique
- cholestase récurrente bénigne (ou syndrome de Summerskill),
- cholestases postopératoires
- cholestases observées au cours des infections bactériennes sévères,
- cholestases de la nutrition parentérale.

Cholestase par obstruction des voies biliaires intrahépatiques :

- Tumeurs du foie (primitives ou secondaires)
- Granulomatoses hépatiques
- Localisations hépatiques des hémopathies malignes (notamment la maladie de Hodgkin et les autres lymphomes)
- Amylose.

Deux cas particuliers

- Cirrhose biliaire primitive est liée à une destruction des petits canaux biliaires interlobulaires par une infiltration inflammatoire auto-immune. Elle survient chez la femme dans 90 % des cas. Il existe presque toujours dans le sérum des anticorps anti-mitochondries de type M2 (ces anticorps sont dirigés contre le composant E2 de la pyruvate déshydrogénase mitochondriale). Deux autres maladies peuvent donner des lésions assez proches : la maladie du greffon contre l'hôte et le rejet après transplantation hépatique.
- Cholangite sclérosante primitive est une atteinte plus diffuse des voies biliaires caractérisée par une sclérose inflammatoire irrégulièrement répartie pouvant intéresser les voies biliaires intrahépatiques et extrahépatiques. Sa cause est inconnue. Elle atteint un peu plus souvent l'homme que la femme. Elle est associée dans environ 70 % des cas à une colite ulcéreuse. Elle peut se compliquer d'un cholangiocarcinome.
- Des lésions voisines, de cholangite sclérosante secondaire, peuvent être observées après injection intrabiliaire de formol ou de sérum salé hypertonique pour traiter un kyste hydatique du foie (cholangites caustiques), après chimiothérapie intra-artérielle hépatique de cancers secondaires par le 5-FUDR, au cours des métastases hépatiques

diffuses, en cas de thrombose de l'artère hépatique après transplantation de foie (cholangite ischémique), et au cours de l'histiocytose X.

b-Cholestase extrahépatique :

Elle est due à une obstruction des voies biliaires situées à l'extérieur du foie, de la terminaison des canaux hépatiques et de la convergence, jusqu'à la papille

- Lithiase du cholédoque
- Tumeurs des voies biliaires sont situées au niveau de la convergence (cancer du " hile " ou tumeur de Klatskin), du canal hépatique commun, du canal cholédoque, ou de l'ampoule de Vater (ampullome vatérien). Il s'agit de cholangiocarcinomes.
- Les tumeurs du pancréas sont le plus souvent des adénocarcinomes.
- Les signes principaux sont l'ictère, le prurit, l'angiocholite, l'amaigrissement (en cas de cancer), la dilatation des voies biliaires à l'échographie, la prolifération de néo-canaux biliaires à l'examen histologique.

➤ Ictères à bilirubine mixte :

Par leur fréquence, les hépatites aiguës, quelle que soit leur étiologie, et les cirrhoses d'origine éthylique, post-hépatitique, hémochromatosique ou biliaire primitive, constituent un groupe important où les deux fractions de la bilirubine sérique sont élevées.

I. Syndrome de Dubin-Johnson :

Le syndrome de Dubin-Johnson, décrit en 1954, est caractérisé par une hyperbilirubinémie principalement conjuguée, souvent découverte vers la puberté ou chez l'adulte jeune. Sa prévalence est faible, de l'ordre de 0,1 par million. Il semble y avoir une prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,5 à 3 hommes pour 1 femme.

La transmission se fait probablement sur le mode autosomique récessif de faible pénétrance. L'examen clinique est normal. L'hyperbilirubinémie est de l'ordre de 30 à 70 mmol/L, avec environ 70 % de bilirubine conjuguée.

La bilirubine peut augmenter jusqu'à 100 ou 200 mmol/L en cas de fièvre élevée, de traitement par les ostéogènes, la rifampicine, ou en cas de grossesse. Les transaminases, les phosphatases alcalines, la g-GT sont normales. Les acides biliaires sériques sont normaux.

Le trouble fondamental est un défaut d'excrétion de divers anions organiques parmi lesquels la bilirubine, tandis que l'excrétion des sels biliaires est normale. Contrairement au syndrome de Gilbert, l'hyperbilirubinémie est conjuguée et la bilirubine est éliminée dans l'urine. Le foie est fortement pigmenté par une substance intracellulaire voisine de la mélanine, mais il est par ailleurs histologiquement normal. L'étiologie de cette accumulation pigmentaire est inconnue. Les taux d'aminotransférases (transaminases) et de phosphatases alcalines sont habituellement normaux. Pour des raisons inconnues, ce syndrome s'accompagne d'un trouble typique de

l'excrétion urinaire des coproporphyrines, qui comporte l'inversion du rapport normal entre les isomères I et III.

II. Syndrome de Rotor :

Syndrome de Rotor, décrit en 1948, a des caractéristiques cliniques **très proches** de celles du syndrome de Dubin-Johnson.

Prévalence : encore plus faible.

Manifestation: une hyperbilirubinémie principalement conjuguée découverte vers la puberté ou chez l'adulte jeune. Il est transmis comme **un caractère récessif**. Il se traduit par un ictère à bilirubine **conjuguée (50%)** et **non conjuguée (50%)**.

Les tests hépatiques sont normaux et l'examen histologique du foie ne montre pas de pigment dans les hépatocytes. Cette maladie rare est proche du syndrome de Dubin Johnson, mais le foie **n'est pas pigmenté** et il existe d'autres différences métaboliques portant sur l'élimination de la BSP et l'histologie hépatique.

Les principales différences avec le syndrome de Dubin-Johnson Dans le syndrome de Rotor :

La clairance de la BSP après une injection unique est fortement diminuée et il n'y a pas de réascension du colorant après 45 min. Le même trouble est observé avec les autres colorants.

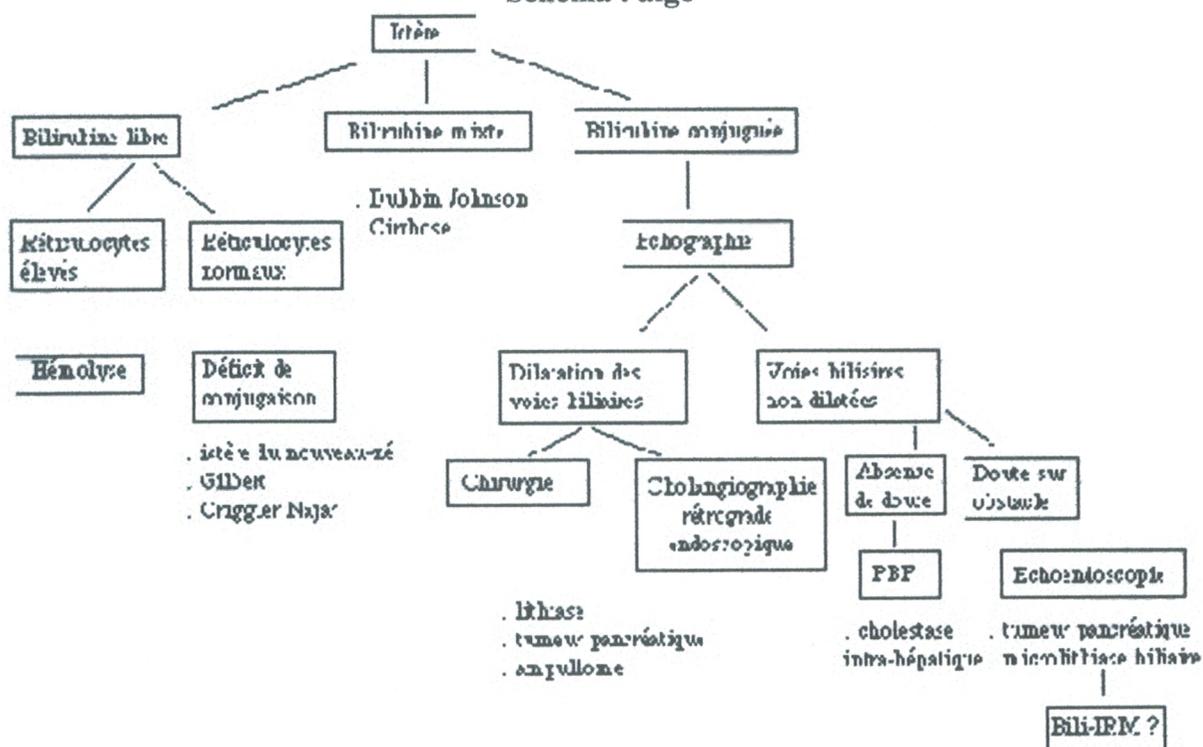
La capacité de stockage de la BSP par le foie est fortement diminuée, tandis que le transport maximal dans la bile est normal ou peu diminué.

Ces observations suggèrent que **l'anomalie** moléculaire pourrait porter sur une **protéine de liaison et de stockage intrahépatocytaire** et non pas sur le transporteur canaliculaire.

Les autres tests hépatiques, tels que les transaminases, les phosphatases alcalines, les gamma-glutamyl-transférases, le taux des gammaglobulines sont normaux.

Le diagnostic est confirmé par une clairance évocatrice de la bromosulfonephthaléine, une élévation des coproporphyrines urinaires totales et, surtout, des isomères I.

Schéma : algo



rithme diagnostique de l'ictère
(J.P. Zarski)

DIAGNOSTIQUE BIOLOGIQUE DES ICTERS :

I - INTRODUCTION :

1- INTERET CLINIQUE DU DOSAGE DE LA BILIRUBINE:

La bilirubine est un pigment présent dans la bile et en faible quantité dans le sérum. Lorsque la bile s'accumule (problème d'élimination), cela provoque un ictère.

On distingue la bilirubine dite libre ou indirecte, toxique pour le cerveau. Elle risque de s'accumuler chez le nouveau-né quand le foie n'est pas encore tout à fait mature : c'est l'ictère physiologique du nouveau-né. La bilirubine dite conjuguée ou directe augmente dans les cholestases.

L'ensemble :

Bilirubine libre + bilirubine conjuguée constitue la bilirubine totale.

2- Les conditions du prélèvement :

- C'est un prélèvement de sang veineux (en général au pli du coude), avec le garrot laissé le moins longtemps possible.
- Le tube de prélèvement peut contenir un anticoagulant.
- Il doit être conservé à l'abri de la lumière avant que le dosage ne soit effectué.
- Il n'est pas indispensable d'être à jeun.
- Indiquer d'éventuels traitements en cours car certains médicaments peuvent modifier les résultats.
- Centrifuger à pleine vitesse pendant 5 bonnes minutes.

3- Matériel :

- 6 tubes en verre de 10 ml
- Réactifs
- Photomètre

4- Transport et conservation

Peu de recommandations peuvent être formulées concernant le transport de l'échantillon sanguin. La très grande sensibilité de la bilirubine à l'activité photo oxydante de la lumière paraît limitée d'une part grâce à la liaison du pigment sur les protéines porteuses, et d'autre part grâce aux érythrocytes qui pourraient maintenir un potentiel réducteur efficace.

Le sérum ou plasma obtenu à partir de l'échantillon peut être dosé dans un délai maximum de 5 à 6 heures, quand il est conservé à la température du laboratoire. Si ce délai doit être plus long, il est préférable de conserver l'échantillon décanté à +4°C. Dans tous les cas, il est recommandé de protéger ce dernier de la lumière vive.

II - TECHNIQUES DE DOSAGE:

Il existe actuellement trois grands principes de dosage de la bilirubine :

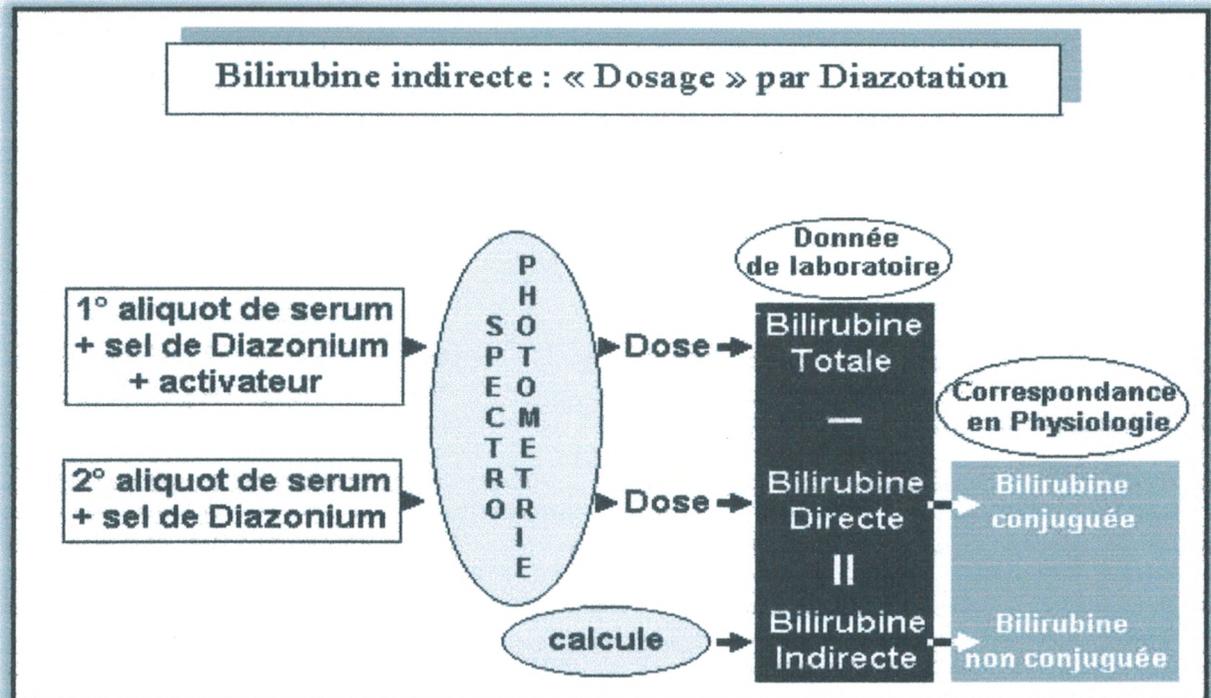
- par diazoration.
- par spectrométrie directe.
- par oxydation.

► 1- Les méthodes par diazoration :

Elles sont les plus employées. La réaction produit les azobilirubines qui sont des dipyrroles diazotés. Une molécule de bilirubine génère deux azobilirubines. Il existe de très nombreuses modifications de la technique initiale de Vanden Bergh (11).

Les variations peuvent concerner :

- l'agent de diazotation
- la nature de l'accélérateur
- le pH de la diazoration
- le pH du milieu de lecture



Texte explicatif :

Cette figure illustre 2 points concernant le dosage de la bilirubine dans le plasma:

D'abord, dans la partie gauche, le principe du dosage par diazotation qui reste la méthode de référence en Néonatalogie. Dans le plasma de tout nouveau-né ictérique, le pigment se trouve sous 2 formes quant à sa capacité à réagir in vitro avec un sel de diazonium: une qui ne le fait qu'indirectement après adjonction dans le milieu d'un activateur, l'autre qui le fait directement. Dans les 2 cas, la concentration en diazo-bilirubine obtenue par cette réaction peut être mesurée "spécifiquement" en spectrophotométrie.

En faisant ce dosage successivement après adjonction de l'activateur, puis sur un 2° aliquote de plasma sans l'activateur, on obtient d'abord un taux correspondant à la somme totale des 2 formes du pigment, et ensuite celui correspondant uniquement à sa forme directe.

Le taux de bilirubine indirecte ne se mesure pas, mais se calcule par soustraction entre les 2 résultats précédents.

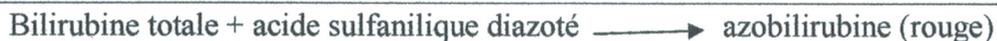
Ensuite, dans la partie droite, la possibilité de transposer ces données réelles de laboratoire en termes de concepts de bilirubine conjuguée et non conjuguée auxquels on fait habituellement référence en physiologie et physiopathologie.

Méthode de Malloy- Evelyn modifiée:

1- Principe :

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine conjuguée.

Accélérateur : le méthanol.



2- Composition des réactifs :

A) bilirubine totale :

- Réactif 2 :
 - Acide sulfanilique 28,9mmol/L.
 - Acide chlorhydrique 165mmol/L
 - Diméthylsulfoxyde 7mol/L
- Réactif 3 :
 - Nitrite de sodium 43mmol/L

B) bilirubine directe :

- Réactif 1 :
 - Acide sulfanilique 28,9mmol/L
 - Acide chlorhydrique 165mmol/L
- Réactif 3 :
 - Nitrite de sodium 43mmol/L

3- Préparation des réactifs :

✓ Solution d'acide sulfanilique :

- Dans un flacon de 500 ml, mélanger 250 ml d'eau distillée, 56 ml d'HCl N et 1.9 g d'acide sulfanilique.
- Une fois que l'acide est dissous, compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.
- La solution se conserve bien.

✓ Solution de nitrite de sodium :

- Dissoudre 0.1 gramme de NaNO₂ dans 25 ml d'eau distillée.
- Se conserve 15 jours au réfrigérateur en flacon brun.

4- Précaution :

- Réserve uniquement à l'usage in vitro.

- Eviter l'exposition à la lumière directe.
- les interférences éventuelles avec des protéines fixées sur les tubulures des automates
- peuvent être évitées par des rinçages de l'appareil avec une solution de soude 0,1N.
- Utiliser une verrerie propre ou à usage unique afin d'éviter toute contamination.

5- Stabilité des réactifs :

Les réactifs se conservent à 2 -8°C et à l'abri de la lumière, sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.

6- Réactifs de travail :

- Réactifs sont prêts à l'emploi.
- Echantillons
- Sérum non hémolysé.
- Plasma recueilli sur tube hépariné.

7- Mode opératoire :

- La méthode ci-dessous est la méthode manuelle pour spectrophotomètre.
- Ces réactifs peuvent être utilisés sur la plupart des automates.
- Les adaptations sont disponibles sur demande.
- Longueur d'onde : 555nm (530 - 580)
- Température : 37°C
- Cuve : trajet optique 1cm

A) bilirubine totale :

	BLANC Echantillon	DOSAGE Echantillon	BLANC Calibrateur	DOSAGE Calibrateur
Réactif 2	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL
Réactif 3	-	50µL	-	50µL
Echantillon	100µL	100µL	-	-
Calibrateur	-	-	100µL	100µL

- ✓ On mélange et on lit la densité optique (DO) après 5 minutes d'incubation.
La coloration finale est stable au moins 1 heure.
- ✓ On va mettre :
 - 1,5mL de Réactif 2 + 100µL Echantillon → témoins.
 - 1,5mL de Réactif 2 + 50µL Réactif 3 + 100µL → Echantillon bilirubine totale.

B) bilirubine directe :

	BLANC Echantillon	DOSAGE Echantillon	BLANC Calibrateur	DOSAGE Calibrateur
Réactif 1	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL
Réactif 3	-	50µL	-	50µL
Echantillon	100µL	100µL	-	-
Calibrateur	-	-	100µL	100µL

- ✓ On mélange et on lit la densité optique (DO) après 5 minutes d'incubation.
La coloration finale est stable au moins 1 heure.
- ✓ On va mettre :

- 1,5mL de Réactif 1 + 100µL Echantillon →Témoins.
- 1,5mL de Réactif 1 + 50µL Réactif 3 + 100µL →Echantillon Bilirubine directe.

Méthode à la caféine benzoate :

- **Principe :**

Utilisée pour mesurer la concentration de la bilirubine totale grâce à une méthode diazo à point final minutée. Au cours de la réaction, la bilirubine réagit avec le diazo en présence de caféine, de benzoate et d'acétate comme accélérateurs pour former l'azobilirubine.

Accélérateur : caféine benzoate.



- **Constituants de réactif :**

Benzoate de sodium	347 mmol/L
Caféine	173,9 mmol/L
Acide sulfanilique	27 mmol/L
HCl	50 mmol/L
Nitrite de sodium	0,36 mmol/L
Acétate de sodium	609 mmol/L

- **Type d'échantillon :**

Les échantillons de liquide biologique doivent être prélevés selon la procédure utilisée pour tout test de laboratoire

Il est préférable d'utiliser des échantillons de sérum ou de plasma fraîchement prélevés.

Il n'est pas recommandé d'utiliser des échantillons de sang total ou d'urine.

- **Conservation et stabilité des échantillons :**

1. Les tubes de sang doivent toujours être gardés bouchés et à la verticale. Il est recommandé de séparer physiquement le sérum ou le plasma des cellules dans les deux heures qui suivent le moment du prélèvement.

2. Le sérum ou le plasma séparé ne doit pas rester plus de 8 heures à température ambiante. Si les analyses ne sont pas achevées dans les 8 heures, conserver le sérum ou le plasma entre +2°C et +8 °C. Si les analyses ne sont pas effectuées dans les 48 heures ou que l'échantillon séparé doit être conservé au-delà de 48 heures, les échantillons doivent être congelés entre -15 °C et -20 °C. Les échantillons congelés ne doivent être décongelés qu'une fois.

La substance à analyser des échantillons peut se détériorer si les échantillons sont congelés et décongelés de façon répétée.

3. La bilirubine est photosensible. Protéger les échantillons de la lumière.

- **Volume d'échantillon :**

Le volume optimal, si un godet de de 0,5 mL est utilisé, est 0,3 mL d'échantillon.

Remarque :

- ✓ Cette méthode est analogue à la méthode précédente, la seule différence est au niveau du type d'accélérateur et la nature du milieu (la première utilise un milieu neutre et la deuxième un milieu acide ce qui conditionne la nature d'azobilirubine formé.

- ✓ Une nouvelle méthode de dosage de la bilirubine sérique est proposée.

La détermination est réalisée par diazocopulation à l'aide du 2-hydrazinobenzothiazole (HBT) dans un milieu riche en diméthylsulfoxyde (DMSO).

Ce solvant permet la réalisation d'un étalonnage commode. La méthode permet le dosage de la bilirubine totale ainsi que celui des formes conjuguées et non conjuguées après séparation par extraction. La méthode s'applique indifféremment à la détermination des taux faibles ou élevés en bilirubine sérique. Elle est adaptée à la détermination par microméthode.

Méthode de Jendrassik :

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique pour former un Azo dont la teinture est rouge dans les solutions neutres et bleu dans les solutions acides ou alcalines. Tandis que la bilirubine hydrosoluble réagit "directement", la bilirubine "indirect" libre réagit seulement en présence d'un accélérateur.

La bilirubine totale dans le sérum ou le plasma est déterminée en utilisant la méthode de Jendrassik par **couplage** avec l'**acide sulfanilique** après l'addition de **caféine**, benzoate de sodium et acétate de sodium.

L'azobilirubine bleue est formée dans une solution de Fehling alcaline II.

Ce composé bleu peut aussi être déterminé sélectivement (**coloration mélangée verte**) par photométrie à 578 nm.

La bilirubine directe est mesurée comme Azobilirubine rouge à 546 nm en utilisant la méthode de Schellong et Wende sans l'addition d'alcalin.

La bilirubine indirecte est la différence entre la bilirubine totale et la bilirubine directe.

• *Réactifs :*

Réactif1:

Acide sulfanilique	29 mmol/L
HCl	170 mmol/L

Réactif2:

Nitrite de sodium	29 mmol/L
-------------------	-----------

Réactif3:

Caféine	130 mmol/L
Benzoate de sodium	156 mmol/L
Acétate de sodium	460 mmol/L

Réactif4: Solution Fehling II

Tartrate de potassium et sodium	930 mmol/L
Hydroxide de sodium	1.9 mol/L

Avantages et inconvénients :

Depuis l'introduction en 1883, par Ehrlich, de la méthode de dosage de la bilirubine à l'aide d'un composé diazonium, différentes modifications ont été proposées pour améliorer la réaction.

Dans la méthode de Malloy et Evelyn, le méthanol qui sert de catalyseur dans la réaction de copulation azoïque de la bilirubine indirecte, maintient en outre l'azobilirubine en solution. Un **inconvénient majeur** de cette méthode est la précipitation des protéines par le méthanol qui peut conduire à l'obtention de résultats par défaut.

Jendrassik et Grof ont proposé en 1938 un test qui donne des résultats fiables. La méthode est toutefois compliquée et comprend plusieurs étapes de pipetage. La méthode développée par Wahlefeld et coll. utilise un détergent pour accélérer la réaction et éviter la précipitation des protéines. Le réactif diazoïque utilisé est le sel de dichloro-2,5 phényldiazonium tétrafluoroborate (DPD) qui réagit très rapidement pour se coupler à la bilirubine en milieu acide. La méthode est simple et présente une bonne corrélation avec la méthode de Jendrassik et Grof.

► 2- La mesure par spectrométrie directe :

Elle peut être abordée par différentes méthodes.

A. Index ictérique :

Cette méthode exploite les propriétés spectrales des solutions de bilirubine, qui présentent en milieu protéique, un maximum d'absorption voisin de 460 nm.

► Inconvénients :

- 1- Les causes d'interférences sont nombreuses : carotène, opalescence ou lactescence de l'échantillon, présence d'hémoglobine (interférence positive). Pour éliminer ces interactions, une lecture à 2 longueurs d'onde différentes est pratiquée à 469 et 521 nm.
- 2- La spectrophotométrie directe n'est pas valable pour des échantillons contenant de la bilirubine conjuguée ou delta, car leur spectre est différent de celui de la bilirubine non conjuguée.

► Remarque :

L'index ictérique doit donc être réservé aux échantillons de nouveau-né.

B. Mesure par spectrométrie directe en chimie sèche :

Cette méthode permet la détermination simultanée des bilirubines conjuguées et non conjuguées par réflectométrie à deux longueurs d'onde différentes (400 et 460 nm). Pour augmenter la réflectance des molécules, elles sont auparavant liées par interactions spécifiques à un polymère cationique intégré dans la plaque.

► Inconvénients :

Ce système ne mesure pas la bilirubine delta, retenue dans les couches supérieures de la plaque. Il peut être utilisé pour mesurer la bilirubine totale du nouveau-né, chez qui la concentration en bilirubine delta est négligeable.

C. Mesure par spectrométrie directe après séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

Dans une des techniques, les mono et diconjugués sont convertis rapidement et quantitativement en mono- et diméthyl esters par méthanolyse alcaline. Les méthyl esters et la bilirubine non conjuguée, sont extraits par le chloroforme et séparés par CLHP. La bilirubine delta, piégée à l'interface chloroforme-eau, n'est pas détectée.

➤ **Avantage :**

- Le principal avantage de cette méthode est de pouvoir mesurer de faibles quantités de dérivés mono et diconjugués, même à des taux de bilirubine normaux. Une de ses principales applications en biologie clinique est le diagnostic de maladie de Gilbert.
- La technique de Lauff permet la mesure de toutes les formes de bilirubine, après séparation en phase réverse, par ordre de polarité décroissante.

➤ **Inconvénients :**

Cette méthode est difficilement applicable à des sérums dont la concentration en bilirubine est inférieure à 25 micromoles/l, pour des raisons de sensibilité.

► **3- Méthodes par oxydation**

- La bilirubine peut être oxydée par voie chimique.

Les différentes techniques se différencient par leur agent d'oxydation (perchlorure de fer, acide phosphorique ...) et par leur mode de lecture (spectrophotométrie ou fluorimétrie). Ces méthodes sont très peu utilisées.

- En revanche, l'oxydation enzymatique s'est développée grâce à la préparation d'une bilirubine-oxydase (BOX), isolée d'un champignon, *Myrothecium verrucaria*.

Celle-ci catalyse la réaction :



La biliverdine est convertie en dérivés violets ou incolores qui n'interfèrent pas avec le spectre de la bilirubine. La diminution de l'absorbance liée à la disparition de la bilirubine est proportionnelle à la concentration. La réaction a lieu à pH 8,2 en présence de SDS et de cholate de sodium pour dissocier la bilirubine de l'albumine. Ceci accroît la vitesse de la réaction.

Le choix de la longueur d'onde de mesure se situe entre 420 et 470 nm. Le maximum d'absorbance est 445nm pour la bilirubine non conjuguée, 425 nm pour les conjuguées et 440 nm pour la bilirubine delta. C'est pourquoi il est préférable d'effectuer les mesures à la longueur d'onde de 445 nm.

IV- LES CALCULS :

- Bilirubine total (mg/L) = DO total - DO total témoin x 19,1
- Bilirubine directe (mg/L) = DO directe - DO directe témoin x 15,0

$$\text{mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L}$$

$$\text{mg/l} \times 1,71 = \mu\text{mol/l.}$$

$$\mu\text{mol/l} \times 0,585 = \text{mg/l.}$$

1- Les calculs avec le calibrateur :

$\frac{\text{DO DOSAGE \acute{e}chantillon} - \text{DO BLANC \acute{e}chantillon}}{\text{DO DOSAGE calibrateur} - \text{DO BLANC calibrateur}} \times n$

n = concentration du calibrateur

2- Les performances (37°C) :

A) bilirubine totale :

✓ Linéarité :

Le réactif est linéaire jusqu'à 200 mg/L (20 mg/Dl) (340 µmol/L).

✓ Limite de détection :

Déterminée selon le protocole recommande par vassault et coll (1986), la limite de détection est égale à 0,75 mg/L.

✓ Reproductibilité intrasérielle : (n=20)

Sérum normal Sérum pathologique

Ecart type =0,066 Ecart type =1,993

CV = 2,13 % CV = 1,39 %

Des essais complémentaires ont été réalisés sur d'autres sérums de contrôle : Le réactif présente un CV inférieur à 6 %

✓ Reproductibilité intersérielle : (n=20)

Sérum normal Sérum pathologique

Ecart type =0,211 Ecart type =1,925

CV = 7,16 % CV = 1,40 %

Des essais complémentaires ont été réalisés sur d'autres sérums de contrôle : Le réactif présente un CV inférieur à 8 %.

B) Bilirubine directe :

✓ Linéarité :

le réactif est linéaire jusqu'à 180 mg/L (18 mg/Dl) (306 µmol/L).

✓ Limite de détection :

Déterminée selon le protocole recommande par vassault et coll (1986), la limite de détection est égale à 0,58 mg/L.

✓ Reproductibilité intrasérielle : (n=20)

Sérum normal Sérum pathologique

Ecart type =0,054 Ecart type =0,044

CV = 4,38 % CV = 0,81 %

Des essais complémentaires ont été réalisés sur d'autres sérums de contrôle : Le réactif présente un CV inférieur à 5 %

✓ Reproductibilité intersérielle : (n=20)

Sérum normal Sérum pathologique

Ecart type =0,119 Ecart type =0,057

CV = 10 % CV = 1,07 %

Des essais complémentaires ont été réalisés sur d'autres sérums de contrôle : Le réactif présente un CV inférieur à 10 %.

3- Les interférences :

A) bilirubine totale :

Les tests montrent que les triglycérides, le glucose, l'hémoglobine et l'acide ascorbique n'interfèrent pas aux concentrations testées (triglycérides jusqu'à 10g/L, glucose jusqu'à 3g/L, hémoglobine jusqu'à 5g/L, acide ascorbique jusqu'à 400mg/L).

B) bilirubine directe :

Les tests montrent que les triglycérides, le glucose, l'acide ascorbique n'interfèrent pas aux concentrations testées (triglycérides jusqu'à 4g/L, glucose jusqu'à 3g/L, acide ascorbique jusqu'à 400mg/L). L'interférence la plus importante est celle de l'hémoglobine : Une sous-estimation d'environ 10% se produit pour des teneurs supérieures en hémoglobine à 1g/L sur des sérums normaux et 2g/L sur des sérums pathologiques.

V-VALEURS NORMALES :

1- Les taux physiologiques :

- ✓ Bilirubine totale :
 - < 10mg/L
 - < 1.0mg/dL
 - < 17 μ mol/L
- ✓ Bilirubine directe :
 - < 3mg/L
 - < 0.3mg/dL
 - < 5.1 μ mol/L

2- Les variations physiologiques :

- ✓ Bilirubine totale
 - Naissance : 14 - 45 μ mol /l 8 - 25 mg /l
 - 1ère semaine : 45 - 210 μ mol /l 25 - 120 mg /l
 - 2ème semaine : 17 - 190 μ mol /l 10 - 110 mg /l
 - 3ème semaine : 10 - 50 μ mol /l 6 - 30 mg /l
 - 4ème semaine : 5 - 25 μ mol /l 3 - 15 mg /l
 - >1 mois et adulte : 5 - 17 μ mol /l 3 - 10 mg /l
- ✓ Bilirubine libre = indirecte
 - Adulte : 3 - 12 μ mol /l 2 - 7 mg /l
- ✓ Bilirubine conjuguée = directe
 - Adulte : 2 - 5 μ mol /l 1 - 3 mg /l

VI- INTERPRETATION DES RESULTATS :

1- Les variations en fonction de l'âge et du sexe :

Les valeurs de références des bilirubinémies totale et conjuguée varient selon que l'on s'adresse à une population de nouveau-nés, d'enfants et adultes.

- NOUVEAU-NE :

Il est admis que certains nouveau-nés (26 à 55 % selon les auteurs) développent un ictère clinique souvent appelé ictère simple du nouveau-né. Environ 18 % de ces nouveau-nés ont une bilirubinémie supérieure à 220 $\mu\text{mol/l}$, et plus de la moitié d'entre eux n'ont pas de cause pathologique pour expliquer leur ictère.

Deux périodes peuvent être individualisées au cours de l'ictère simple du nouveau-né.

Pour un enfant né à terme, la bilirubinémie augmente jusqu'à J3, puis décroît rapidement jusqu'à J5 où elle se stabilise aux alentours de 35 $\mu\text{mol/l}$. Ce taux reste ensuite stable jusqu'à la fin de la seconde semaine de vie. La durée de ces deux périodes est un peu modifiée chez le prématuré : le pic de bilirubinémie est plus important et atteint son maximum à J5, parfois J7. La bilirubinémie peut rester augmentée pendant 1 mois après la naissance, puis décroît ensuite pour atteindre les valeurs usuelles de l'enfant.

Le seuil couramment admis pour traitement préventif de l'ictère nucléaire chez un nouveau-né à terme présentant une albuminémie normale est de 340 $\mu\text{mol/l}$. En pratique, ce seuil est interprété en fonction de l'état de l'enfant.

Bilirubine totale : < 10mg/L
< 1.0mg/dl
< 17 $\mu\text{mol/L}$

Bilirubine directe : < 3mg/L
< 0.3mg/dl
< 5.1 $\mu\text{mol/L}$

- ENFANTS-ADULTES :

Avant la puberté, les valeurs sont identiques chez le garçon et la fille.

La glucuronosyltransférase étant plus efficace en raison de l'imprégnation hormonale, la valeur de la bilirubine est plus basse chez la femme après la puberté.

Par les méthodes classiques de détermination, une valeur inférieure à 17 $\mu\text{mol/l}$ est admise comme usuelle pour la bilirubine totale, avec absence de bilirubine conjuguée. En réalité, des techniques plus sensibles comme la CLHP, mettent en évidence un taux d'environ 4 % de bilirubine circulant sous forme conjuguée. Par tranche d'âge les valeurs usuelles de bilirubine totale sont les suivantes, en micromole/l :

Age	Homme	Femme
Enfant impubère	6.6	7.3
13 - 19 ans	11.7	10.4
20 - 29 ans	12.2	8.7
30 - 59 ans	10.7	7.9

2- Les valeurs sémiologiques :

Les différentes fractions de bilirubines circulantes n'auront pas la même signification étant donné que leurs accumulations résultent d'altérations des mécanismes de biotransformation et/ou d'élimination.

- BILIRUBINE NON CONJUGUEE :

En période néonatale, toute augmentation importante de bilirubine non conjuguée, en dehors du contexte d'ictère simple, peut résulter d'un désordre hémolytique, d'une polycythémie, d'un hématome, d'un déficit en glucuronosyltransférase.

L'allaitement au sein peut provoquer un ictère du nouveau-né au 5ème jour de vie, disparaissant en 3 jours après le sevrage. Le mécanisme de cette hyperbilirubinémie, encore discuté, s'oriente vers la présence dans le lait maternel d'un inhibiteur de la glucuroconjugaison (isomère du pregnandiol, acides gras non estérifiés en concentration importante liée à une forte activité lipoprotéine lipase présente dans le lait).

La bilirubinémie doit être étroitement surveillée, réalisée parfois toutes les 6 heures. Elle sert alors à guider la thérapeutique (photothérapie, perfusion d'albumine, exsanguino-transfusion). Chez l'enfant et l'adulte, l'augmentation de bilirubine non conjuguée est le plus souvent modérée ($< 40 \mu\text{mol/l}$) et signe :

- Soit une surproduction par hémolyse. Dans ce cas l'augmentation de bilirubine conjuguée est parallèle à celle de la bilirubine non conjuguée, et le rapport conjuguée/totale reste d'environ 4 % comme chez l'adulte en dehors de toute pathologie.

- Soit un déficit partiel en glucuroconjugaison : c'est la maladie de Gilbert.

La bilirubine non conjuguée s'accroît sans augmentation parallèle de la bilirubine conjuguée (le rapport conjuguée/totale est d'environ 1 %). Les monoglucuronides sont produits préférentiellement.

Ces deux critères sont exploités pour le diagnostic de maladie de Gilbert chez un patient après 12 heures de jeûne.

- BILIRUBINE CONJUGUÉE

L'accumulation de bilirubine conjuguée signe un désordre hépatobiliaire : cirrhose, hépatite, cholestase d'origine métabolique, toxique ou mécanique. La bilirubine est conjuguée normalement par l'hépatocyte, mais il y a obstacle à son excrétion biliaire sous forme de glucuronides. Les bilirubines totale et conjuguée augmentent parallèlement. La bilirubine conjuguée peut atteindre jusqu'à 80 % de la bilirubine totale. Lorsque l'ictère est lié à une baisse de la cholérèse, il est associé à la rétention d'acides biliaires (ictère cholestatique). C'est le cas le plus fréquent. Il peut cependant accompagner une pathologie des transporteurs du pôle biliaire de l'hépatocyte, responsable d'une régurgitation de bilirubine conjuguée dans le torrent sanguin (maladie de Dubin Johnson, de Rotor).

La conjugaison de la bilirubine n'a lieu que dans le foie. Aussi, la bilirubine conjuguée est-elle un marqueur hautement spécifique d'une altération hépatobiliaire.

Avec les techniques qui permettent la distinction entre les glucuronides d'une part, et la bilirubine delta d'autre part, la valeur diagnostique et pronostique de ces deux fractions peut être exploitée. Ainsi, le taux de la bilirubine delta varie avec la durée de la cholestase. Après suppression de la cause de cholestase, alors que les glucuronides ont, comme les acides biliaires, une demi-vie de 4 jours, celle de la bilirubine delta peut être assimilée à celle de l'albumine sur laquelle elle est fixée, soit 17 jours. Sa proportion peut alors correspondre à 100 % de la bilirubine conjuguée.

La diminution spécifique de la bilirubine delta semble être un marqueur précoce d'un processus de rejet après une greffe hépatique. De même, l'augmentation de la concentration en glucuronides sans augmentation parallèle de bilirubine delta est, en particulier en pédiatrie, un marqueur de mauvais pronostic lors de l'évolution de certaines hépatopathies.

3. Les médicaments pouvant interférer dans le dosage :

- Augmentation : diurétiques, rifampicine
- Diminution : phénobarbital, fibrates, aspirine

CONCLUSION

Ictère, signe fréquent, doit être reconnu impose un interrogatoire et un examen clinique complet.

Le mécanisme (et la démarche diagnostic) ne peut être expliqué que par le dosage de la bilirubine totale, conjuguée et non conjuguée.

Le catabolisme de l'hème produit les pigments biliaires ; les sources comprennent l'Hb provenant de la destruction des GR sénescents et des érythroblastes dans la moelle osseuse, et les protéines héminiques du foie et d'autres tissus. Il ne semble pas y avoir de synthèse directe de la bilirubine à partir des précurseurs de l'hème. La bilirubine, un anion organique pigmenté étroitement apparenté aux porphyrines et autres tétrapyrroles, est un déchet insoluble. Pour être excrétée, elle doit être convertie en substance hydrosoluble ; cette transformation est le stade essentiel du métabolisme de la bilirubine, qui comprend 5 étapes principales.

- ✓ Formation
- ✓ Transport plasmatique
- ✓ Captation hépatique
- ✓ Conjugaison
- ✓ Excrétion biliaire

Toute perturbation de l'une de ces étapes peut provoquer un ictère. L'augmentation de la synthèse, le défaut de captation hépatique, ou la diminution de la conjugaison peuvent provoquer une hyperbilirubinémie non conjuguée. Un obstacle à l'excrétion biliaire provoque une hyperbilirubinémie conjuguée. En pratique, les maladies hépatiques et l'obstruction biliaire provoquent des troubles multiples, aboutissant à une hyperbilirubinémie mixte. De plus, lorsque la bilirubine conjuguée se déverse dans le plasma, une fraction se fixe fortement de façon covalente à l'albumine sérique. Cette fraction liée à l'albumine (\square -bilirubine) peut échapper aux examens de routine, mais constitue souvent une fraction importante de la bilirubine circulante, en particulier pendant la période de rémission de l'ictère.

Ainsi, dans la plupart des cas de maladie hépatobiliaire manifeste, le dosage des 2 fractions de la bilirubine, non conjuguée et conjuguée, a peu d'intérêt diagnostique. En particulier, il ne différencie pas l'origine hépato-cellulaire ou cholestatique d'un ictère parce que l'hyperbilirubinémie est de type mixte indépendamment de la cause sous-jacente. L'étude des 2 fractions n'est utile que si l'on soupçonne une des maladies décrites ci-dessous ; ces troubles provoquent un ictère en l'absence de maladie du foie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Tietz.N.W(ed) Text book of Clinical Chemistry. W.B.Saunders,(1986),1388.
2. Sherwin J.E., Overnolte R .Bilirubine Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation, Kaplan L.A,pesceA.J.(Eds)C.V.Mosby, (1984),1241.
3. Tiribelli C. and Ostrow D. (1989). New concepts in bilirubin chemistry, transport and metabolism. Hepatology , 11, 2, 303-313.
4. Kuenzle C.C., Maier C. and Ruttner J.R. (1966), Separation and quantitative estimation of four bilirubin fractions from serum and of three bilirubin fractions from bile. J. Lab. Clin. Med. 67,294-306.
5. Odievre M. (1986). Troubles du métabolisme de la bilirubine. Enc. Med. Chir. (Paris France). Foie-Pancréas, 7014, A20, 9 : 4p (b).
6. Hicks B.A., and Altman R.P. (1993). The jaundiced newborn in "Pediatric clinics of North America", New-York, p1161-1175.
7. Cashore W., (1988) Kernicterus and bilirubin encephalopathy. Seminars in liver disease, 8, 2, 163-167.
8. Diagnostic d'un ictère, Hervé Jouanolle. In Hépatologie - Ellipses/Aupelf
9. Ictère à bilirubine conjuguée de l'adulte : orientation diagnostique et conduite à tenir. M. Steinberg, O. Bouché. In Impact Internat 1996; 6 : 117-30.
10. Akre O, Ekblom A, Hsieh CC, Trichopoulos D, Adami HO.(Department of Cancer Epidemiology, University Hospital, Uppsala, Suède) ; "Testicular nonseminoma and seminoma in relation to perinatal characteristics" ; J Natl Cancer Inst. 1996 Jul 3;88(13):883-9
11. Ehrlich P. Charite Ann 1883;8:140.
12. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 1937;119:481-490.
13. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Bilirubins. Biochem Z 1938;297:81-89.
14. Wahlefeld AW, Herz G, Bernt E. Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in sérum. Scand J Clin Lab Invest 1972;29:Suppl 126:Abstract 11.12.
15. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3e édition. Philadelphie, Pa: WB Saunders Co 1995:88.

المركز الاستشفائي الجامعي
التكنولوجيا المتقدمة في تلمسان
المختبر الكيميائي الإحصائية

الحكيم صباري محمد فتح الله
Dr. SARI Med. Fathallah
Maître Assistant
en Biochimie
G.H.U. TLEMSEN