

Faculté de médecine.

Département de pharmacie.

5^{ème} année de pharmacie

Service de médecine nucléaire – C.H.U.TLEMEN

Dr. MEGHELLI Sid. Med.
Maître Assis.
Biophysique
C.H.U. TLEMEN

Mémoire

Dosage du cortisol sérique, plasmatique, urinaire et salivaire

Collaborateurs :

- **BENHAZIL Mohammed Amin**
- **BERROUBA TANI Aïssa Nassim**
- **CHEMMOURI Hafid**
- **TALEB BENDIAB Mohammed Amine**

ENCADREURS:

- **DR. MEGHELLI**
- **DR. CHAKOURI**

BUT DU TRAVAIL:

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro du cortisol dans les échantillons de sérum, de plasma, d'urine et de salive humains. La détermination du cortisol s'utilise dans le diagnostic et le traitement des dysfonctionnements des glandes sur rénales.

Année universitaire 2009-2010

2017/04/21/013.4-10+/01

P L A N D E T R A V A I L

❖ **CHAPITRE I :**

Présentation & généralités

- I. Introduction
- II. Rappel anatomique : Glandes surrénales
- III. Stéréochimie & relation structure-activité
- IV. Cortisol : Rôle et importance
- V. Cortisol : Action physiologique
- VI. Cortisol : Différentes formes

❖ **CHAPITRE II :**

Méthodes de dosage du cortisol

- I. Dosage radio-immunologique
- II. Radio-immunodosage par compétition :
 - 1. Définition
 - 2. Principe
 - 3. Principaux éléments du dosage
- III. Radio-immunodosage par excès d'anticorps :
 - 1. Principe
 - 2. Applications
 - 3. Sources d'erreurs lors d'un RIA
 - 4. Réalisation d'une gamme étalon pour RIA
- IV. Dosage proprement dit du cortisol

❖ **CHAPITRE III :**

Indications du dosage

- I. Cortisol et pathologies
 - 1. Syndrome de Cushing
 - a. Diagnostic
 - b. Clinique
 - c. Paraclinique
 - d. Physiopathologie
 - e. Traitement
 - f. Épidémiologie
 - 2. Maladie d'Addison
 - a. Synonymes
 - b. Historique
 - c. Épidémiologie
 - d. Causes
 - e. Description clinique
 - f. Diagnostic
 - g. Traitement
 - h. complication
 - 3. Adénome hypophysaire
 - a. Rappel anatomique
 - b. Pathologie : - Mécanismes
- Signes
 - c. Traitement
- II. Cortisol Avec stimulation : Test de stimulation à l'ACTH
- III. Cortisol avec freination :
 - > Principe
 - > Contre indications
 - > Protocoles

❖ **CONCLUSION**

❖ **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

CHAPITRE 1:

PRESENTATION, GENERALITES :

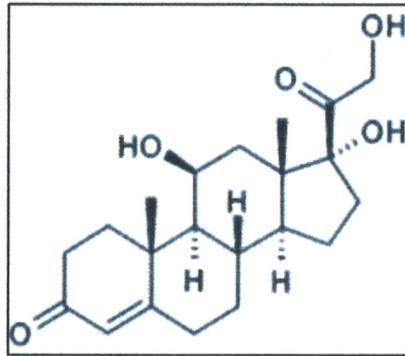
I- INTRODUCTION:

La corticosurrénale est indispensable à la vie. Elle est divisée en 3 zones histologiquement et fonctionnellement distinctes auxquelles correspondent 3 catégories d'hormones stéroïdes : les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les stéroïdes sexuels. La régulation globale de la sécrétion des stéroïdes dépend de leur concentration plasmatique et de l'intégrité de l'axe de stimulation qui, du système nerveux central par l'hypothalamus et le lobe antérieur de l'hypophyse, atteint le cortex surrénalien. Les hormones stéroïdes d'origine surrénalienne exerçant l'action périphérique principale sont au nombre de 4 : l'aldostérone, le cortisol, le déhydroépiandrostérone et la corticostérone, mais ces stéroïdes ont près de 50 précurseurs et autant de métabolites inactifs ou dotés d'une activité inférieure à celles des hormones principales.

Le précurseur commun des stéroïdes est le cholestérol fourni par la circulation sanguine et également synthétisé dans les cellules corticales par l'acétate. Du cholestérol aux hormones actives la biosynthèse procède par l'intermédiaire de nombreuses activités enzymatiques. La première étape transforme le cholestérol en Δ^5 prégnénolone, détermine la vitesse globale de la biosynthèse, est faite de plusieurs réactions enzymatiques.

Le cortisol (hydrocortisone, composé F de Richter) est la principale et la plus abondante hormone glucocorticoïde. Il est sécrété par les cellules des zones fasciculée et réticulée des glandes corticosurrénales. Il est synthétisé à partir du cholestérol, comme l'ensemble des autres hormones stéroïdiennes, et sa sécrétion est directement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysosurrénalien.

La corticotrophine (ACTH) est le peptide hypophysaire responsable de la synthèse et de la sécrétion du cortisol. Le rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol sur l'hypophyse et sur l'hypothalamus (site de sécrétion de la CRH : corticotropin releasing hormone) contribue au maintien de l'homéostasie des produits de sécrétion de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.



Structure du cortisol

Le cheminement cinétique des Les 17 hydroxystéroïdes (cortisol) s'effectue comme suit :

a) Production :

Sa synthèse requiert la 17α hydroxylase présente seulement dans la zone fasciculaire.

b) Concentration et transport plasmatiques :

5% du cortisol circule sous forme libre. Sinon il est lié à la transcortine (90%) ou à l'albumine. La demi-vie est de 60 à 70 minutes. Le taux de sécrétion est de 15 à 20 mg/jour. Il y a des variations nyctémérales de la cortisolémie en relation avec l'ACTH.

Les taux sont élevés le matin et bas la nuit. Le taux est de 15 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ de plasma à 8h le matin

c) Destruction et élimination :

Dans le foie, le cortisol est transformé par une 11β déshydrogénase en cortisone d'activité biologique pratiquement égale à celle du cortisol et cette réaction est

réversible. Les 2 hormones, cortisol et cortisone subissent ensuite les mêmes transformations métaboliques dont les 4 principales étapes sont les suivantes :

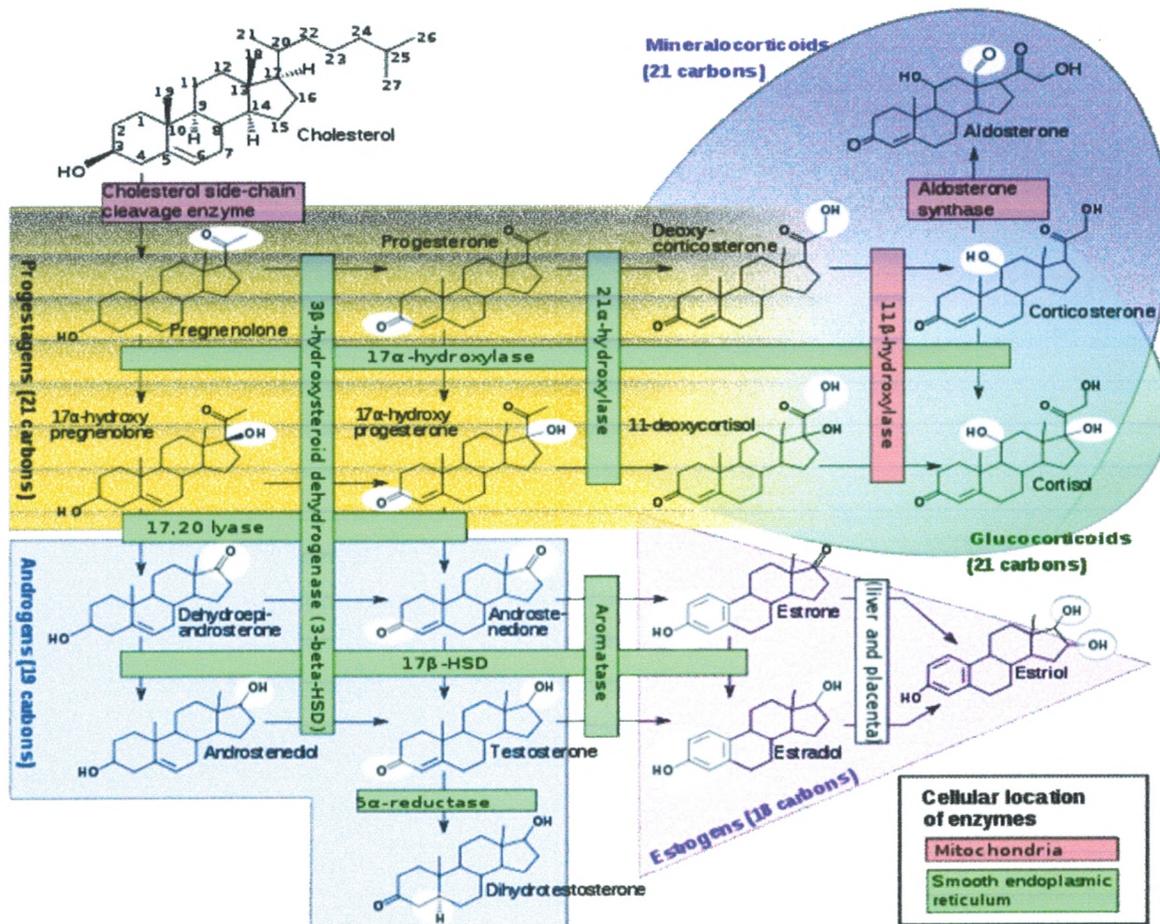
-la suppression de la double liaison entre C4 et C5 menant au dihydrocortisol
 -la réduction du groupe 3-céto en 3-dihydro avec formation de tétrahydrocortisol et de tétrahydrocortisone.

-la réduction du groupe C20 donnant le cortol à partir du cortisol et le cortolone à partir de la cortisone.

-la séparation de la chaîne latérale en 17 créant ainsi des 17 céstéroïdes.

Quantitativement, 1% de la cortisone et du cortisol est excrétée sous forme intacte dite libre. La majeure partie de tous les métabolites est excrétée sous forme de glycuronoconjugués hydrosolubles (60 à 70%).

*** Schéma de synthèse :**



II. RAPPEL ANATOMIQUE : GLANDES SURRENALES :

Chez les mammifères et les oiseaux, les glandes surrénales ou plus simplement les surrénales sont deux glandes endocrines triangulaires situées au-dessus des reins. Elles sont principalement responsables de la gestion des situations de stress (via la synthèse de corticostéroïdes et de catécholamines) et de l'homéostasie hydro-sodée (via la synthèse de l'aldostérone).

D'un point de vue anatomique, la surrénale est située en position antérosupérieure par rapport au rein et est irriguée par les artères surrénales.

Elle est divisée en deux structures distinctes :

- la medulla ou médullosurrénale, d'origine ectoblastique;
- le cortex ou corticosurrénale, d'origine mésoblastique.

Ces structures sont toutes deux connectées en permanence au système nerveux. Comme leur nom l'indiquent, la corticosurrénale (qui entoure la médullosurrénale) est plutôt contrôlée par le cortex (elle est stimulée par l'ACTH (Adreno Cortico Tropic Hormon) qui est sécrétée par l'adéno hypophyse qui fait partie du système nerveux central) alors que la médullosurrénale est plutôt contrôlée par la moelle épinière (medulla) et/ou par le système nerveux autonome.

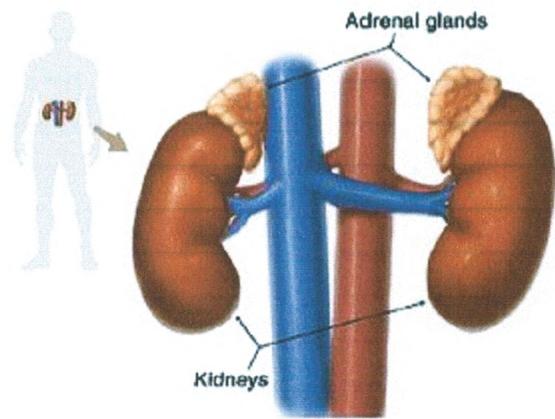
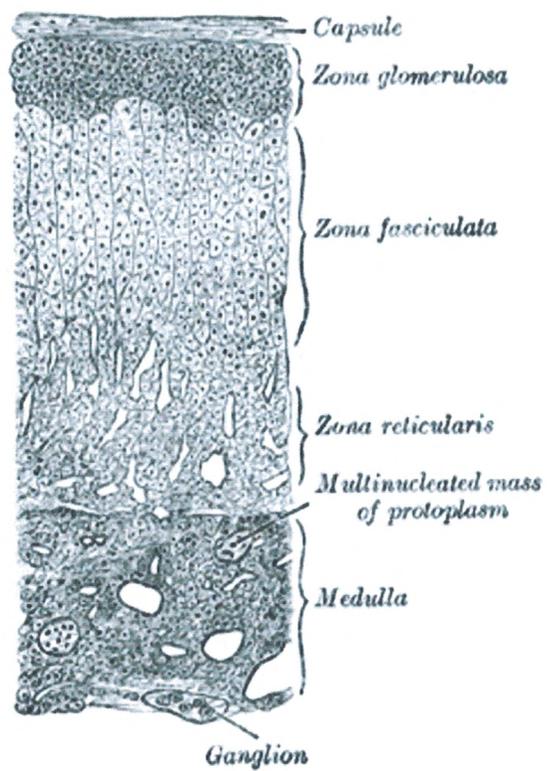
*** La médullosurrénale :** La médullosurrénale est la principale source corporelle d'hormones du groupe des catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Les cellules possèdent habituellement des noyaux volumineux, pâles, et un cytoplasme finement granuleux ; elles sont disposées en amas, cordons ou colonnes, entourés d'un riche réseau capillaire. Partie interne de la glande surrénale qui secrète l'adrénaline. Un des rôles de l'adrénaline est d'entraîner une tachycardie. Les hormones sécrétées par la médullosurrénale sont des amines

biogènes, qui apparaissent sous forme de vésicules à cœur dense au microscope électronique. Ces hormones sont dites hydrosolubles, et possèdent ainsi un récepteur membranaire.

*** La corticosurrénale :** En contraste avec la médullosurrénale, certaines cellules de la corticosurrénale appartiennent à l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, et sont une source de synthèse du cortisol. D'autres cellules corticales produisent des androgènes tels la testostérone, alors que certaines contrôlent les concentrations d'eau et d'électrolytes en sécrétant de l'aldostérone. La partie corticale sécrète des minéralocorticoïde, qui contribue à la formation d'aldostéron et de rénine Les cellules de la corticosurrénale contiennent un réticulum endoplasmique lisse développé, de nombreuses mitochondries, des vacuoles lipidiques et parfois de la lipofuchsine, un marqueur de dégénérescence. De l'extérieur vers l'intérieur on distingue :

- **Zona glomerulosa (Zone glomérulée)** : La zone glomérulée synthétise principalement des minéralocorticoïdes, à savoir l'aldostérone. Elle représente 15% de la corticosurrénale. Ces cordons s'organisent en réseaux arrondis, en glomérules. Son organisation structurale est cependant bien spécifique de l'espèce animale, et les spécialistes peuvent facilement savoir s'il s'agit d'une zone glomérulée d'homme, de chat ou de lapin.

- **Zona fasciculata (Zone fasciculée)** : La zone fasciculée (ou foliculée) synthétise des glucocorticoïdes, à savoir le cortisol. Elle représente 65% de la corticosurrénale. Ces cordons s'organisent en réseaux parallèles, radiaires, d'une à deux couches de cellules, et séparés par des capillaires.- **Zona reticularis (Zone réticulée)** : La zone réticulée synthétise des gonadocorticoïdes, DHEA et androstenedione. Elle représente 10% de la corticosurrénale. Ces cordons s'organisent en réseaux anastomosés (branchés).

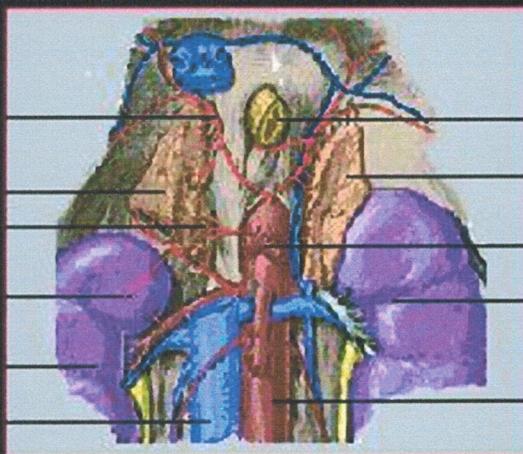


Glandes surrénales : situation

Coupe transversale de la corticosurrénale

LES SURRENALES : FACE ANTERIEURE

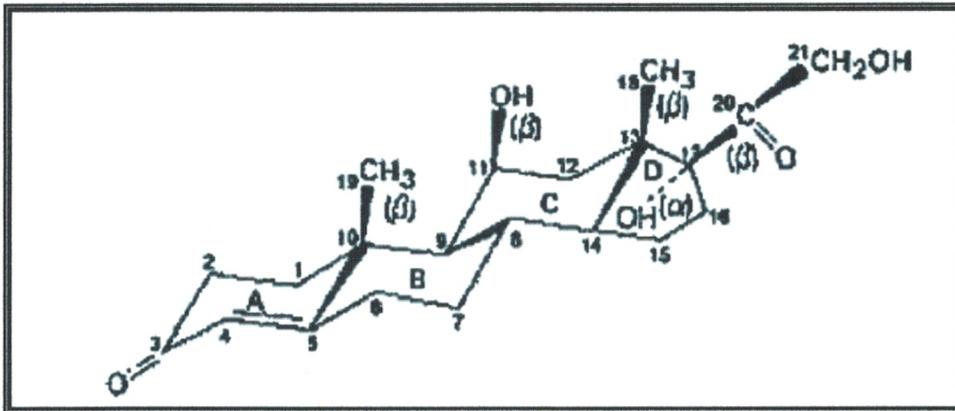
Artère surrénalienne
 supérieure droite
 Surrénale droite
 Artère surrénalienne
 moyenne droite
 Artère surrénalienne
 inférieure droite
 Rein droit
 Veine cave inférieure



Oesophage
 Surrénale gauche
 Tronc coeliaque
 Rein gauche
 Aorte

III. STEREOCHIMIE DU CORTISOL ET RELATION STRUCTURE-

ACTIVITE :



Structure stéréochimique du cortisol

- Le squelette de carbone commun aux corticoïdes participe à leur affinité pour les protéines, en particulier pour les récepteurs des cellules cibles et les protéines porteuses associées aux Stéroïdes.

- Cette affinité sera ensuite plus ou moins importante et spécifique selon les substitutions présentes sur le noyau commun.

La structure chimique et la configuration stérique jouent un rôle important dans l'activité.

- Certains composés doivent ainsi subir des transformations pour devenir actifs (cf. infra).

Certaines particularités structurales sont considérées comme essentielles à l'activité anti- inflammatoire des glucocorticoïdes alors que d'autres permettent juste de l'augmenter ou de minimiser les propriétés minéralocorticoïdes.

♦ La double liaison entre les carbones C4 et C5 est indispensable à l'activité anti- inflammatoire.

♦ La fonction cétone en C3 est également indispensable à l'activité anti- inflammatoire.

(En effet, s'il existe des glucocorticoïdes avec une fonction hydroxyle en C3 ayant une certaine activité, il semble que leur excrétion soit si rapide qu'ils n'ont pas le temps d'être efficaces).

◆ L'halogénéation en C6 et C9 comme dans la dexaméthasone, la betaméthasone ou la fluméthasone, élève l'activité anti-inflammatoire.

◆ La double liaison entre C1 et C2.

Elle augmente l'activité glucotrope et baisse l'activité minéralotrope

IV. CORTISOL : ROLE ET IMPORTANCE :

Véritable « starter » métabolique, cette hormone de la cortico-surrénale stimule l'augmentation du glucose sanguin ; elle permet donc de libérer de l'énergie à partir des réserves de l'organisme.

Le cortisol gère, entre autres, le stress mais son horloge est très différente de celle de l'adrénaline. La sécrétion de cortisol suit une boucle de régulation complexe, appelée axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. L'hypothalamus produit une hormone, la CRH, qui est véhiculée jusqu'à l'hypophyse (via le système porte hypophysaire) où elle stimule la sécrétion d'ACTH. L'ACTH, sécrétée et véhiculée dans la circulation sanguine générale, stimule la zone corticale des glandes surrénales qui produit le cortisol. La sécrétion de CRH, d'ACTH et de cortisol suit un rythme circadien très remarquable.

- Responsable en partie de la force musculaire, il n'est presque plus sécrété en milieu de nuit et remonte pour atteindre un pic d'acrophase entre 6h00 et 8h00. C'est la raison pour laquelle le dosage du cortisol plasmatique se réalise le matin vers 8h00 – du moins sur ce point précis, le principe de l'homéostasie a-t-il été à peu près abandonné. Les variations de sécrétion du cortisol dans le temps sont importantes et complexes. La néoglucogénèse qu'il produit est de nature à nourrir le cerveau au début du jour, que ce soit chez l'humain ou chez l'animal,

et cela, même si l'apport récent de nourriture n'a pas été suffisant. Encore une fois, le principe de l'homéostasie se trouve pris en défaut.

- Le taux de cortisol baisse en début d'après-midi, et cela peut entraîner fatigue, irritabilité, hypoglycémie, trouble de la vigilance (lors de cette tranche horaire, on serait idéalement plus enclin à faire la sieste qu'à travailler d'arrache-pied). Le rythme circadien de sécrétion du cortisol est indépendant des horaires du sommeil. Enfin, une variation de la courbe du cortisol a pu être observée dans le cadre circannuel : acrophase en été, batyphase en hiver.

- Dans le sang, le cortisol est en grande partie (environ 90 %) lié aux protéines (essentiellement à la CBG = Cortisol Binding Globulin ou transcortine), mais seules les molécules non liées ont une action sur l'organisme. Ces deux formes sont en équilibre.

- Le cortisol et les autres hormones glucocorticoïdes ont un rôle très important dans la régulation des grandes fonctions de l'organisme.

V. CORTISOL : ACTION PHYSIOLOGIQUE :

>Effet sur le métabolisme glucido-protéique :

- Il stimule la dégradation protéique et graisseuse dans la plupart des tissus (excepté au niveau du système nerveux).
- Le cortisol agit sur le métabolisme glucidique, en augmentant la synthèse de glucose par le foie. Il augmente aussi la dégradation des lipides.
- Au niveau de l'eau et des électrolytes, il a un effet minéralocorticoïde modéré (hypokaliémiant et hypernatrémiant) et permet l'augmentation de la filtration glomérulaire (action diurétique).

- Une action minéralocorticoïde forte avec rétention d'eau apparaît à des doses thérapeutiques (corticoïdes médicamenteux) bien supérieures aux normes physiologiques.

>Effet sur le squelette :

- Effet catabolisant à dose pharmacologique
- Diminution de l'absorption intestinale de calcium

---> Conséquences :

- Chez l'enfant, ralentissement de la croissance des cartilages et de la formation de l'os.
- chez l'adulte, ostéoporose.

>Effets cardio-vasculaires :

Le cortisol augmente la sensibilité des fibres musculaires lisses vasculaires aux agents hypertenseurs : catécholamines et angiotensine II. Il stimule la synthèse des catécholamines et inhibe leur dégradation par l'enzyme COMT. Le cortisol diminue l'efficacité des agents vasodilatateurs (tel que le NO) sur l'endothélium.

>Effets hématologiques :

Il entraîne la diminution des lymphocytes circulants, la stimulation de l'érythropoïèse, et l'augmentation des neutrophiles et des plaquettes. Cette diminution fut d'abord attribuée à une suppression immunitaire, mais il a été prouvé que cette diminution est plutôt liée à une redistribution des leucocytes vers la périphérie : les nodules lymphatiques, la peau et la moelle épinière.

>Effets cutanés :

Le cortisol entraîne un retard de cicatrisation des plaies. Par la stimulation de synthèse des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéinases et l'inhibition des gènes codants pour les collagènes, l'hypercortisolisme chronique a également un effet de dégradation du derme, caractérisé par une diminution des propriétés mécaniques de la peau (diminution de l'épaisseur du tissu conjonctif sous-jacent).

>Effets sur le rein :

Le cortisol a une action minéralocorticoïde par fixation sur le récepteur de l'aldostérone. Cette action est empêchée par l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déhydrogénase de type II (11 β HSD2) rénale qui établit le cortisol en cortisone inactive. Dans le cas où la cortisolémie est élevée, l'action minéralocorticoïde s'exprime avec des états hypertensionnels et hypokaliémiques.

>Effets anti-inflammatoires :

Son action anti-inflammatoire et immunosuppressive est à la base de son emploi thérapeutique : le cortisol naturel a donné naissance à une classe de médicaments connue sous l'appellation de corticostéroïdes ou corticoïdes de synthèse. Il agit au niveau sanguin en favorisant le retour des lymphocytes et des polynucléaires éosinophiles dans les organes immunitaires (rate, moëlle osseuse, ganglions lymphatiques) et en accroissant le nombre de polynucléaires neutrophiles circulants (démargination). Au niveau cellulaire, il agit au niveau des lymphocytes T et B en favorisant leur apoptose et en diminuant leur sécrétion de cytokines et d'interleukines (inhibition du facteur NF-kappaB). Il diminue la production de facteurs chimiques de l'inflammation : prostaglandines et leucotriènes (en inhibant la phospholipase A2 (PLA2) par le biais d'une

augmentation de la lipocortine), sérotonine, histamine et enzymes lysosomiales. Les états de stress chronique accompagnés d'une sécrétion élevée et continue de cortisol peuvent faire apparaître des immunodéficiences avec infections.

VI. CORTISOL : DIFFERENTES FORMES:

> *Cortisol sérique :*

Il est dosé par immunodosage et correspond à la détermination du cortisol total circulant (libre et lié). Les valeurs usuelles du cortisol sérique, pour un adulte, sont données ci-dessous à titre indicatif :

- de 8 heures à 10 heures : 250 à 700 nmol/l, soit 100 à 250 ng/ml ;
- de 16 heures à 24 heures : 50 à 350 nmol/l, soit 20 à 120 ng/ml.

Pour un même patient, les taux de cortisol du matin sont environ le double de ceux du soir. Il est important de laisser le patient se reposer avant le prélèvement, le stress induit entraînant des poussées de sécrétion de l'ACTH, et donc du cortisol. Pour une personne travaillant de nuit, le cycle nyctéméral est inversé, aussi le taux maximal sera à son réveil. Chez l'enfant, le rythme circadien apparaît entre 6 et 10 ans et les taux circulants rejoignent ceux de l'adulte après l'adrénarchie. La détermination de la concentration sanguine en cortisol est utile au dépistage ou au diagnostic des états d'hypo- ou d'hypercorticisme. C'est d'ailleurs davantage au cours d'épreuves de stimulation ou de freination que le dosage sanguin du cortisol fournit une aide au diagnostic. En effet, la détermination d'un dosage unique de cortisol a parfois peu de valeur, car de nombreux facteurs influent sur son taux de sécrétion. Une hypercortisolémie ou une hypocortisolémie ne sont pas toujours synonymes d'hyper- ou d'hypofonctionnement surrénalien. En premier lieu, la concentration en transcortine (CBG), dont la synthèse hépatique augmente avec la grossesse ou les traitements par dose forte d'estrogènes, génère une hypercortisolémie sans

variation de la fraction libre. Un taux élevé de cortisol circulant masque les variations dues au seul rythme nyctéméral. La conservation du cycle nyctéméral a une valeur diagnostique. Le cortisol sanguin est également augmenté au cours de l'anorexie mentale, de l'éthylisme aigu, dans les états de choc hémorragiques ou septiques, au cours des cirrhoses et des dépressions endogènes. Enfin, chez l'obèse, une situation d'hypercortisolisme fonctionnel (ou d'entraînement) nécessite la plupart du temps un recours aux épreuves fonctionnelles pour écarter un diagnostic de syndrome de Cushing. Une augmentation de la production de cortisol par les glandes surrénales est observée dans les syndromes de Cushing : maladie de Cushing, syndromes de Cushing paranéoplasiques, tumeurs surrénaliennes. Une diminution de la production du cortisol est observée au cours des insuffisances surrénales : maladie d'Addison, hyperplasies surrénales congénitales par déficit enzymatique, insuffisance antéhypophysaire, corticothérapie au long cours. Le diagnostic positif et la recherche étiologique de - - Ces états font appel aux dosages :

- d'ACTH plasmatique et éventuellement d'autres peptides hypophysaires ;
- du cortisol réalisé au cours d'un cycle nyctéméral : par exemple, prélèvements sanguins réalisés à 8 heures, 12 heures, 16 heures, 20 heures. En effet, la disparition du cycle nyctéméral constitue l'un des premiers signes d'un hyperfonctionnement surrénalien ;
- du cortisol libre urinaire ;
- du cortisol salivaire.

Ces dosages peuvent être réalisés sur des taux de base et au cours des épreuves dynamiques de stimulation (Synacthène®) ou de freination (dexaméthasone). Ces examens sont à compléter par une exploration surrénalienne et/ou hypophysaire par imagerie. Lors de l'exploration de la sécrétion endogène de cortisol pendant ou après sevrage d'un traitement par les corticoïdes, les substances exogènes doivent être arrêtées après avis médical, certains métabolites thérapeutiques pouvant interférer dans les dosages. Le plus souvent,

les traitements corticoïdes utilisés au long cours entraînent une inertie de l'axe hypothalamohypophysio-surrénalien avec une diminution de la fonction corticotrope spontanée en réponse aux stimulations, ainsi qu'une diminution du taux basal de cortisol et l'installation d'une atrophie surrénalienne. À l'arrêt de ces traitements, le délai de récupération de la fonction corticotrope est variable en temps et en intensité en fonction des patients, et le patient devient un insuffisant surrénalien potentiel. Aussi, lors de la décision d'arrêt d'un traitement corticoïde utilisé au long cours, le corticoïde à action prolongée est remplacé par un corticoïde à durée d'action courte (type hydrocortisone), de manière à stimuler la réactivité de la corticosurrénale : la posologie sera progressivement réduite à la dose minimale substitutive. L'évaluation de la fonction corticotrope comprendra dans un premier temps un dosage de cortisol sérique le matin à 8 heures, sans prise médicamenteuse avant la prise de sang. Un résultat supérieur à 250 nmol/l (100 ng/ml) est souvent considéré comme normal, mais ne préjuge pas de la réactivité de la corticosurrénale qu'il faudra ensuite évaluer. Le patient devra être informé correctement de la période transitoire qu'il traversera pendant ce sevrage et des mesures à prendre en cas de stress.

> ***Cortisol libre urinaire (CLU-FLU) :***

La fraction libre du cortisol (environ 10 %) constitue la fraction physiologiquement active, mais aussi la fraction rapidement métabolisée par le foie ou éliminée par les urines. Environ 1 % de la production journalière de cortisol se retrouve inchangé, non métabolisé, dans les urines. Malgré la disponibilité de dosages sanguins fiables et rapides du cortisol et de l'ACTH, le dosage du cortisol libre urinaire sur une diurèse de 24 heures demeure un des éléments essentiels du diagnostic positif de syndrome de Cushing, à condition de disposer d'une technique avec une phase pré-analytique permettant d'éliminer la

plupart des substances pouvant interférer. Le dépistage d'un syndrome de Cushing doit être simple et sensible afin de ne pas ignorer un hypercorticisme. Le dosage du cortisol sanguin le matin à 8 heures et/ou le soir à 18 heures, pour vérifier la persistance ou l'abolition du cycle circadien nyctéméral, est un test de dépistage peu sensible (hypercortisolémies fonctionnelles, grossesse, obésité, augmentation du taux de CBG, etc.). Le freinage minute (ou freinage nocturne) à la dexaméthasone, facile à pratiquer en ambulatoire, possède une spécificité médiocre, car il donne 10 à 20 % de faux positifs (sujets ne freinant pas). La détermination cortisol libre urinaire de même que l'épreuve de freination standard à la dexaméthasone constituent les deux examens les plus performants pour le diagnostic positif d'un syndrome de Cushing. Néanmoins en raison du nombre important de métabolites stéroïdiens contenus dans l'urine et de l'importance du diagnostic de syndrome de Cushing, une étape de purification est indispensable, les méthodes de dosage direct surestimant les valeurs et générant des explorations cliniques inappropriées. La phase pré-analytique doit comporter à minima une phase de purification par extraction par le dichlorométhane. Au laboratoire Pasteur Cerba, l'extraction par le dichlorométhane est suivie d'une étape séparative par chromatographie sur des colonnes de type DIOL, puis d'un dosage radio-immunologique. Pour toutes les valeurs élevées, une méthode de référence par la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse est réalisée. Cette méthode permet une quantification précise du cortisol libre urinaire sans surestimation par des pics interférentiels. Les valeurs usuelles sont dépendantes du sexe, de l'âge et de la technique. Elles sont pour un adulte de 30 à 200 nmol/24 h, soit de 11 à 73 µg/24 h. Le dosage de la créatininurie doit être réalisé en parallèle pour fiabiliser la qualité du recueil urinaire. Rarement augmenté chez les obèses, contrairement au cortisol sérique, le cortisol libre urinaire est parfois augmenté en dehors d'un hypercorticisme au cours des dépressions endogènes, au cours de pancréatites et consécutivement à certaines interventions

chirurgicales. Le dosage du cortisol libre urinaire est également utile au cours des épreuves dynamiques de freination mises en oeuvre dans la recherche étiologique du syndrome de Cushing.

> *Cortisol salivaire :*

Le dosage salivaire du cortisol permet une mesure indirecte du cortisol libre plasmatique, qui n'est pas un dosage pratiqué en routine à ce jour. Les résultats dans la salive ne sont pas influencés par les variations physiologiques ou pathologiques de la sécrétion de la protéine porteuse du cortisol, la CBG.

Ce mode de recueil permet des prélèvements multiples, en ambulatoire, particulièrement lors de l'exploration du cycle nyctéméral du cortisol, les prélèvements à minuit pouvant être réalisés aisément par les patients et conservés à +4 °C en attendant d'être transmis au laboratoire. Le protocole de recueil est le suivant : recueillir 1 ml de salive (au minimum) en demandant au patient de saliver directement dans un pot stérile. Le biologiste transvasera ensuite l'échantillon salivaire dans un tube bouchant hermétiquement. Il existe différents systèmes de recueil salivaire mais, trop souvent, ils sont mal compris ou mal utilisés et la quantité de salive n'est pas exploitable : les taux étant faibles dans la salive puisque seule la fraction libre y diffuse, il faut disposer de 1 ml de salive au minimum pour pouvoir techniquer l'échantillon dans de bonnes conditions. Les valeurs usuelles pour un adulte sont données à titre indicatif au tableau 28.

**Valeurs usuelles salivaires du cortisol
pour un adulte**

	nmol/l	µg/100
À 8 h	10,5 à 27	0,38 à 0,98
À 12 h	6,6 à 13	0,24 à 0,48
À 16 h	5,2 à 9,2	0,18 à 0,33
À 20 h	1,2 à 6	0,04 à 0,21

CHAPITRE II :

METHODES DE DOSAGE DU CORTISOL

I. DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE :

La méthode Radio-Immuno-Aissey (RIA) a été mise au point dans les années 1950 par les américains *Solomon Aaron Berson* et *Rosalyn Sussman Yalow*. C'est une technique très précise de dosage des substances biologiques telles que les enzymes, les hormones, les stéroïdes..., dans le sang, l'urine, la salive, ou tout autre liquide corporel dont lequel la formation du complexe antigène anticorps est détectée grâce à la désintégration d'un atome radioactif (iode 125). Ce dosage repose sur l'inhibition compétitive par la substance (froide).

C'est outil d'analyse exceptionnel par:

- Sa sensibilité: marquage par des isotopes radioactifs.
- Sa spécificité: réaction antigène anticorps

La présence et la concentration d'un Ag spécifique ou d'un Ac spécifique à un antigène dans la solution peuvent être déterminées par les radio-immunodosages (radio-immuno-assays : RIA), ou par le dosage ELISA. L'antigène attaché à une surface solide capture l'anticorps avec lequel il réagit, il est dosé en utilisant un second anticorps marqué réactif au premier. Ces dosages permettent de mesurer une grande variété d'antigènes ainsi que la concentration et l'isotype des Ac spécifiques à un Ag donné.

II. RADIO-IMMUNODOSAGE PAR COMPETITION :

II.1- Définition :

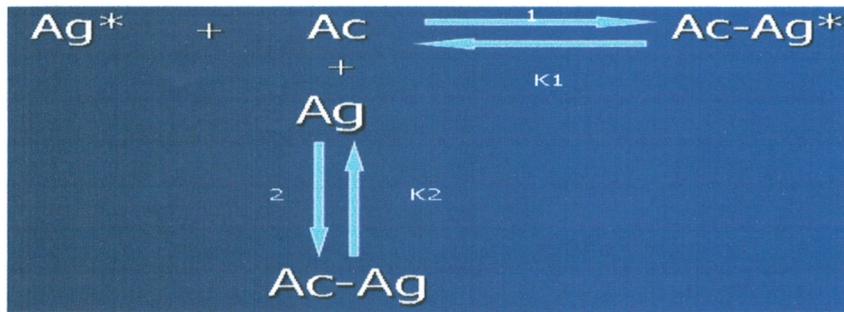
Technique de DRI dans laquelle des molécules marquées (Ag^*) et non marquées (Ag) d'une même espèce entrent en compétition vis-à-vis d'un nombre limité de sites de liaison appartenant à un réactif spécifique (Ac). Une fois l'équilibre atteint, le pourcentage des formes liées (Ag^*-Ac) est inversement proportionnel à la concentration de la substance que l'on veut doser (Ag).

II.2- Principe :

On a besoin:

- > D'une substance marquée par un isotope radioactif (Ag^*) et de même nature que celle que l'on veut doser (Ag).
- > D'une technique permettant de séparer les formes libres et liées.
- > D'échantillons de substance Ag de concentrations connues (ETALONS).

Si on met en présence, en phase liquide, Ag , Ag^* et Ac ; les deux équilibres suivants entrent en compétition:



Si on ajoute au milieu d'incubation des quantités croissantes de Ag (Ag* et Ac étant fixes), la réaction 2 se déplace dans le sens de formation de Ac-Ag et la réaction 1 se déplace à gauche. De ce fait, la concentration de Ag*-Ac diminue. La concentration de la substance à doser [Ag] est inversement proportionnelle à la concentration du complexe Ag*-Ac (radioactif).

Pour l'équilibre 1 :

$$K_1 = \frac{[\text{Ag}^*-\text{Ac}]}{[\text{Ag}^*] \cdot [\text{Ac}]}$$

Pour l'équilibre 2 :

$$K_2 = \frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ac}]}$$

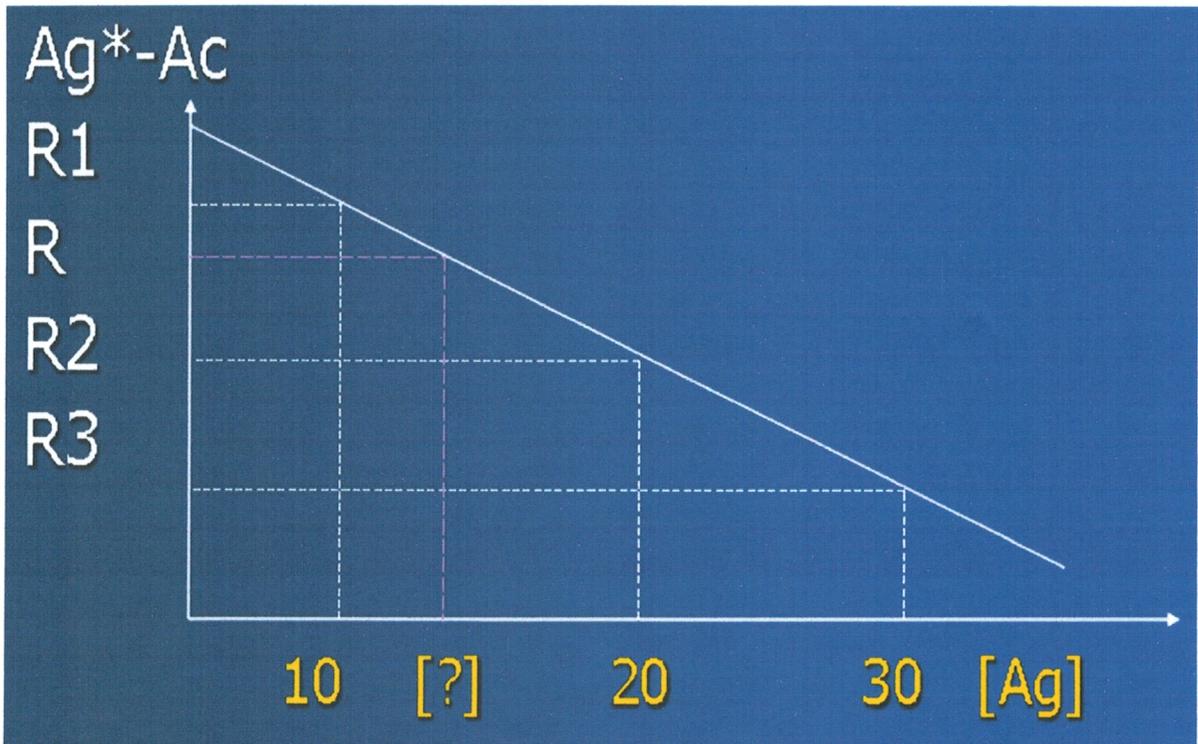
$$[Ac] = \frac{[Ag-Ac]}{[Ag] \cdot K_2} \quad [Ac] = \frac{[Ag^*-Ac]}{[Ag^*] \cdot K_1}$$

$$\frac{[Ag-Ac]}{[Ag] \cdot K_2} = \frac{[Ag^*-Ac]}{[Ag^*] \cdot K_1}$$

$$[Ag] = \frac{[Ag-Ac] \cdot [Ag^*] \cdot K_1}{[Ag^*-Ac] \cdot K_2}$$

Sur le plan pratique, la réalisation d'un tel dosage nécessite le recours à des solutions étalon (de concentration en Ag connue et croissante)

La détermination de la [c] de la même substance dans un milieu biologique se fait graphiquement par interpolation:



II.3 Principaux éléments du dosage :

- Préparation des substances marquées :

Le marquage ne doit pas modifier l'affinité. Le traceur le plus utilisé est l'iode 125: facilité de marquage, faible irradiation.

- Le récepteur spécifique :

Trois types de molécules: Anticorps, Molécules de transport et Récepteurs cellulaires

- Séparation des formes libres et liées :

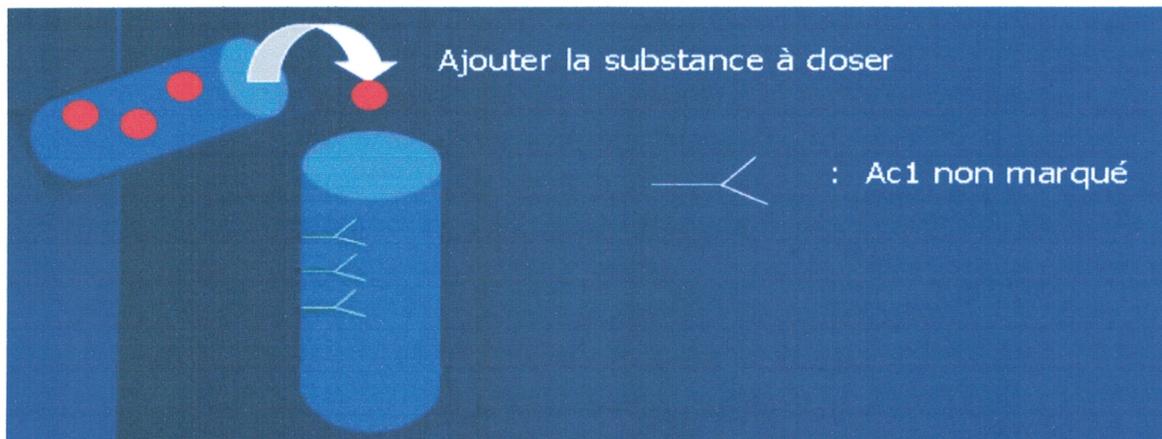
- Immunoprécipitation par un autre Ac dirigé contre le complexe Ag^*-Ac .
- Adsorption de la forme libre sur un matériau (CHARBON).
- Fixation sur un support solide (tube couvert d'Ac).

III. RADIO-IMMUNODOSAGE PAR EXCES D'ANTICORPS :

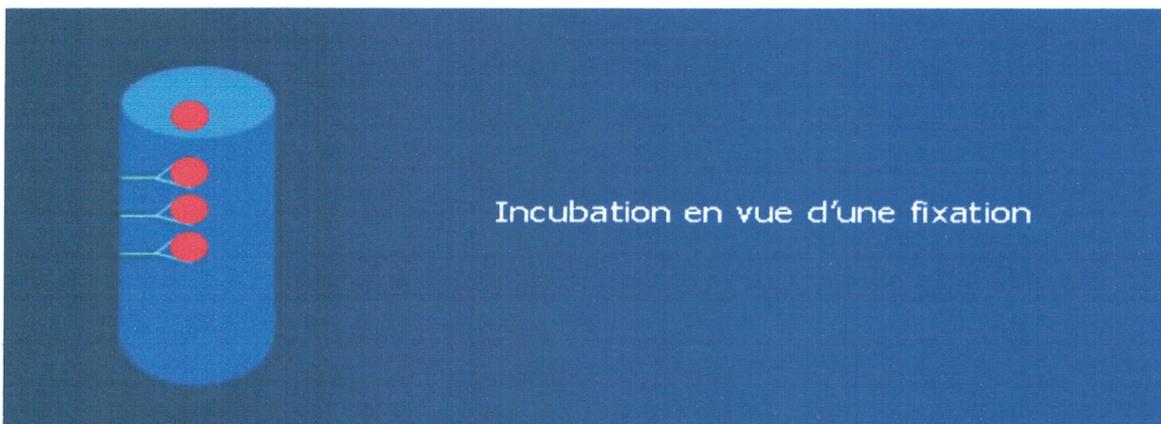
III.1- Principe :

Extraire les molécules à doser grâce à des anticorps en excès fixés sur un support solide puis les révéler à l'aide d'Anticorps marqués par un isotope radioactif.

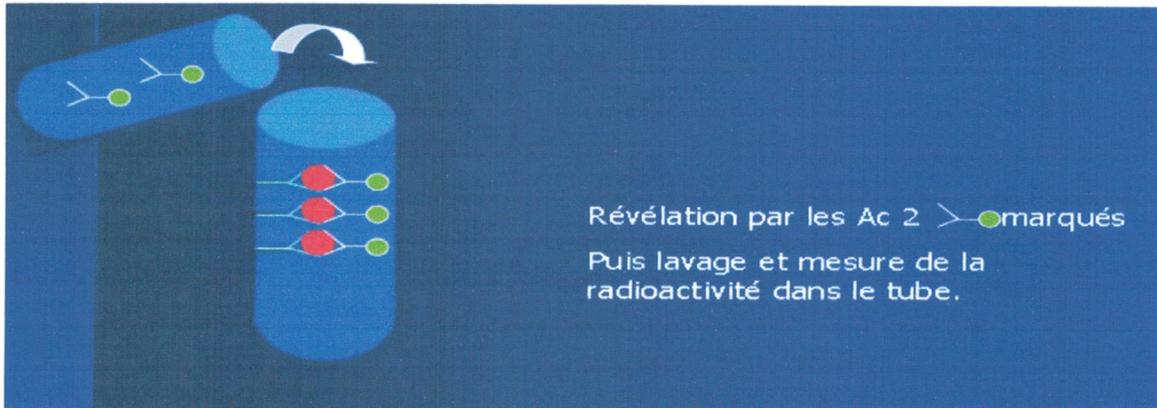
>Étape 1 :



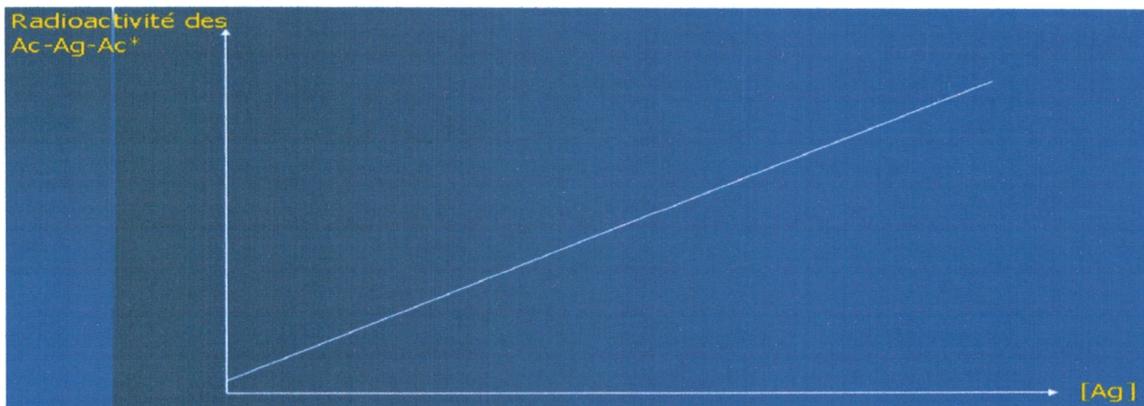
>Étape 2 :



>Étape 3 :



Dans ces conditions, plus la concentration de la substance à doser augmente, plus la radioactivité des complexes Ac-Ag-Ac* augmente :



III.2- Applications :

- **Endocrinologie:** dosages hormonaux
- **Obstétrique:** bêta HCG
- **Hématologie:** facteurs de croissance
- **Cancérologie:** marqueurs tumoraux

III.3- Les sources d'erreur lors d'un RIA :

- Les erreurs aléatoires :

Existent toujours liées au caractère aléatoire du phénomène de radioactivité et de l'interaction des RI avec la matière.

- Les erreurs systématiques :

Peuvent être évitées si elles sont connues

Principalement liées à :

- L'étalon
- La destruction enzymatique de l'antigène au cours de l'incubation
- Destruction de la substance à doser au cours des étapes précédant le dosage.
- Modification de pH ou présence de composés susceptibles de modifier la réaction Ag-Ac.

III.4- Réalisation d'une gamme étalon pour la RIA :

Au laboratoire, nous allons utiliser de la mélatonine non radioactive purifiée (achetée dans le commerce par exemple) de concentration connue et nous allons faire une gamme étalon comprise (par exemple) entre 0 et 1000pg/mL. Tous ces tubes sont passés en RIA. La gamme étalon peut être représentée de différentes manières.

Inconvénients :

- Absence d'Ag froid grande quantité de traceur (nombreux complexes Ag* - Ac)
- L'immunisation est plus difficile à obtenir pour des substances de faible poids moléculaire
- Plus il y a d'Ag dans l'échantillon, moins les Ag* peuvent lier l'Ac.
- La plage de mesure est restreinte
- La réalisation du blanc est parfois difficile

IV. DOSAGE DU CORTISOL PROPREMENT DIT:

- Conditions de prélèvement :

>Prélèvement de sang veineux (en général au pli du coude). Le prélèvement doit être rapidement traité et congelé avant le dosage. Le tube de prélèvement peut contenir un anticoagulant.

>Le dosage sera effectué de préférence le matin (la sécrétion est maximale entre 7 et 9 h le matin), chez un patient reposé, avec un minimum de stress et d'effort physique. L'heure du prélèvement devra impérativement être indiquée.

- Valeurs normales :

Cortisol plasmatique total (libre + lié)

Heure de prélèvement	Valeur en nmol / l	Valeur en µg / l
8 h	275 - 685	100 - 250
12 h	190 - 465	70 - 170
16 h	165 - 300	60 - 110
20 h	110 - 250	40 - 90
24 h	55 - 190	20 - 70

- Variations pathologiques :

- **Diminution :**

Insuffisance cortico-surrénalienne :

- > Maladie d'Addison
- > Hyperplasie congénitale des surrénales
- > Insuffisance de fonctionnement de l'hypophyse ou de l'hypothalamus
- > Corticothérapie prolongée

- **Augmentation :**

Hypercorticisme

- > Maladie de Cushing (adénome hypophysaire)
- > Adénome surrénalien
- > Tumeur corticosurrénale bénigne ou maligne
- > Tumeur sécrétant de l'ACTH
- > Anorexie mentale
- > Ethylisme, cirrhose
- > Certaines maladies neuro-psychiatriques
- > Etat de choc, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral

- Médicaments pouvant interférer dans le dosage :

- Corticoïdes, oestrogènes, amphétamines
- Avec certaines méthodes de dosage : benzodiazépines, tétracyclines, spironolactones.

(suite voir annexe) .

Cortisol

Cortisol

cobas®

REF 11875116 122

100 tests

• Réactifs utilisables sur les analyseurs suivants :

Elecsys 1010	Elecsys 2010	MODULAR ANALYTICS E170	cobas e 411	cobas e 601
•	•	•	•	•

Français

Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative *in vitro* du cortisol dans les échantillons de sérum, de plasma, d'urine et de salive humains. La détermination du cortisol s'utilise dans le diagnostic et le traitement des dysfonctionnements des glandes surrénales.

Ce test par électrochimiluminescence « ECLIA » s'utilise sur les analyseurs Elecsys et cobas e.

Caractéristiques

Le cortisol (ou hydrocortisone) est le principal glucocorticoïde. Il joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux métabolismes. Comme les autres glucocorticoïdes, le cortisol est sécrété par la zone fasciculée du cortex surrénal à partir du cholestérol. Le transport du cortisol dans le sang se fait pour 90 % sous forme liée à la transcortine et à l'albumine. Seule une très faible quantité de cortisol circule dans le sang sous forme libre et peut agir avec les récepteurs qui lui sont spécifiques.¹

Les principaux effets physiologiques du cortisol sont, d'une part, l'augmentation de la concentration du glucose sanguin (augmentation de la néoglucogénèse, action catabolique), d'autre part, une action anti-inflammatoire et immuno-dépressive.¹

La synthèse et la sécrétion du cortisol par les surrénales sont réglées par une rétroaction négative au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire-cortico-surrénalien. Si le taux de cortisol dans le sang est bas, l'hypothalamus sécrète l'hormone de libération de la corticotrophine (CRH) qui stimule la libération de l'adrénocorticotrophine (ACTH) par l'hypophyse. Celle-ci induit à son tour la synthèse et la sécrétion corticosurrénalienne du cortisol. Le cortisol, en réponse, agit par rétroaction négative sur l'hypophyse et l'hypothalamus. Par ailleurs, le stress entraîne une augmentation de la production de cortisol.¹

Le taux sérique normal varie selon le nyctémère.¹ Les concentrations maximales (700 nmol/L ou 25,4 µg/dL) sont habituellement atteintes le matin et baisse au cours de la journée pour atteindre le soir un niveau correspondant à environ la moitié du taux mesuré le matin.

Pour l'interprétation des résultats de dosage de cortisol, il est donc impératif de connaître l'heure du prélèvement sanguin.

Les taux de cortisol mettent en évidence la capacité fonctionnelle des glandes surrénales, de l'hypophyse et de l'hypothalamus.^{2,3} La cortisolémie permet de reconnaître une hypersécrétion pathologique de cortisol (syndrome de Cushing, par ex.)^{4,5} ou un hypocortisolisme (maladie d'Addison, par ex.). Elle permet également de surveiller les effets de nombreuses approches diagnostiques ou de mesures thérapeutiques (test à la dexaméthasone lors de syndrome de Cushing, hormonothérapie substitutive lors de maladie d'Addison, par ex.).

Le cortisol excrété dans l'urine n'étant pas soumis au cycle diurne de la sécrétion de cortisol, la détermination du cortisol dans les urines de 24 h est la méthode la mieux appropriée pour détecter le syndrome de Cushing.⁶ Celle-ci permet de différencier avec plus d'exactitude les sujets sains de ceux présentant un syndrome de Cushing. Le cortisol excrété dans l'urine sans altération est nommé cortisol libre urinaire (CLU). Il y a généralement une relation directe entre la proportion de cortisol libre urinaire et celle de cortisol non conjugué, biologiquement actif dans le sang.¹

Des études récentes ont montré que le dosage nocturne répété du cortisol salivaire est une méthode mieux appropriée à la détection du syndrome de Cushing que la détermination du cortisol libre urinaire.^{7,8,9,10}

Le dosage du cortisol salivaire nocturne est particulièrement utile chez les enfants, les patients psychiatriques et les sujets chez lesquels divers facteurs de stress peuvent perturber le cortex surrénal et entraîner des taux élevés d'hormones stéroïdes adrénales.¹¹

Le test Elecsys Cortisol fait appel au principe de compétition. Il utilise un anticorps polyclonal spécifique dirigé contre le cortisol. Le cortisol endogène, libéré des protéines de liaison sous l'action du danazol, entre en compétition avec le cortisol exogène (dérivé de cortisol marqué au ruthénium^a par les sites de liaison de l'anticorps marqué à la biotine.

Les urines peuvent être utilisées pour l'analyse après extraction des substances interférentes par le dichlorométhane.

La salive s'utilise sans prétraitement directement après centrifugation.

a) Ru(bpy)₃²⁺ : Tris(2,2'-bipyridyl)-ruthénium(II)

Principe

Principe de compétition. Durée totale du cycle analytique : 18 minutes

- 1^{ère} incubation : une prise d'essai de 20 µL est incubée avec un anticorps anti-cortisol spécifique biotinylé et un dérivé de cortisol marqué au ruthénium. Les sites de liaison encore disponibles de l'anticorps biotinylé sont occupés en partie par le cortisol endogène et en partie par l'haptène. Il se forme des immunocomplexes anti-cortisol en relation avec la concentration en cortisol contenue dans l'échantillon.
- 2^e incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

Réactifs - composition et concentrations

- M Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon contenant 6,5 mL (bouchon transparent) : microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL, conservateur
- R1 Ac anti-cortisol-biotine, 1 flacon contenant 9 mL (bouchon gris) : anticorps (polyclonaux de mouton) anti-cortisol biotinylés 90 ng/mL ; tampon MES^b 100 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur
- R2 Peptide cortisol-Ru(bpy)₃²⁺, 1 flacon contenant 9 mL (bouchon noir) : dérivé de cortisol (synthétique) marqué au ruthénium 25 ng/mL ; danazol 20 µg/mL ; tampon MES 100 mmol/L, pH 6,0 ; conservateur

b) MES = acide morpholino-2 éthanesulfonique

Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic *in vitro*

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire.

L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

Éviter la formation de mousse dans les réactifs et les échantillons de tous types (échantillons de patients, calibrateurs et contrôles).

Préparation des réactifs

Les réactifs contenus dans le coffret sont prêts à l'emploi et ne peuvent être utilisés séparément.

Toutes les informations nécessaires au déroulement du test sont mémorisées sur le code-barres des flacons de réactifs et doivent être saisies.

Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ranger le coffret Elecsys Cortisol en position verticale, de manière à ce que toutes les microparticules soient rassemblées pour l'homogénéisation qui précède l'analyse.



Stabilité :

Avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
Après ouverture, entre 2 et 8 °C	12 semaines
Sur MODULAR ANALYTICS E170 et cobas e 601	8 semaines
Sur Elecsys 2010 et cobas e 411	8 semaines
Sur Elecsys 1010	2 semaines (conservation alternée au réfrigérateur et dans l'appareil entre 20 et 25 °C, flacons ouverts au maximum 20 heures).

Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons suivants ont été testés :

Sérum et plasma :

Sérum recueilli sur tubes de prélèvement standard ou contenant un gel séparateur.

Plasma recueilli sur héparinate de lithium, de sodium, d'ammonium, EDTA dipotassique, tripotassique, disodique et citrate de sodium. En cas d'utilisation de citrate de sodium, les résultats obtenus doivent être corrigés de + 10 %. Critère d'acceptabilité : recouvrement entre 90 et 110 % de la valeur du sérum ou pente entre 0,9 et 1,1 + ordonnée à l'origine < ± 2 x limite de détection + coefficient de corrélation > 0,95.

Les échantillons recueillis sur fluorure de sodium/oxalate de potassium donnent des résultats d'env. 27 % inférieurs à ceux obtenus dans le sérum.

Remarque : en raison du rythme circadien du cortisol, l'heure du prélèvement du sang doit être notée.

Stabilité : 5 jours entre 2 et 8 °C, 3 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.

Salive :

Recueillir un échantillon de salive avec le dispositif Salivette.

Ne pas utiliser de tubes contenant de l'acide citrique.

Retirer le tampon du récipient suspendu et mastiquer le tampon avec soin pendant environ 2 minutes jusqu'à ce que le tampon soit complètement imbibé de salive. Remettre le tampon dans le récipient suspendu et refermer le tube. Centrifuger la Salivette pendant 2 minutes à 1000 g pour que la salive passe dans le tube extérieur. Utiliser le surageant limpide pour le test Elecsys Cortisol. Les échantillons de salive doivent être traités de la même manière que les échantillons de sérum ou de plasma.

Stabilité de l'échantillon de salive après centrifugation : 5 jours entre 2 et 8 °C, 3 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.¹²

Urine :

Recueillir les urines de 24 h dans des récipients propres exempts de conservateur et calculer leur volume (L/24 h). Si nécessaire, centrifuger les précipités avant extraction. Pour l'analyse, utiliser les extraits d'urine de la même manière que les échantillons de sérum ou de plasma.

Stabilité des échantillons d'urine : 7 jours entre 2 et 8 °C, 3 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.

Stabilité de l'extrait reconstitué : 7 jours entre 2 et 8 °C, 4 semaines à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.

Les différents types d'échantillons (sérum et plasma) indiqués ci-dessus ont été testés à l'aide d'une sélection de tubes de prélèvement disponibles dans le commerce au moment du test : les tubes de prélèvement des différents fabricants n'ont pas tous été testés. Les systèmes de prélèvement du sang de divers fabricants peuvent contenir différents matériaux pouvant, dans certains cas, influencer le résultat du test. En cas d'utilisation de tubes primaires (systèmes de prélèvement du sang), suivre les instructions données par le fabricant.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur. Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés. S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

En raison des risques d'évaporation, il est recommandé de doser les échantillons, les contrôles et les calibrateurs dans les 2 heures qui suivent leur mise en place sur les analyseurs.

Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactif - composition et concentrations ».

Matériel auxiliaire nécessaire

- [REF] 11875124122, Cortisol CalSet, pour 4 x 1 mL
- [REF] 11731416122, PreciControl Universal : PreciControl Universal 1 pour 2 x 3 mL et PreciControl Universal 2 pour 2 x 3 mL ou [REF] 11731416190, PreciControl Universal : PreciControl Universal 1 pour 2 x 3 mL et PreciControl Universal 2 pour 2 x 3 mL
- [REF] 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL diluant pour échantillon ou [REF] 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL diluant pour échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- Analyseur Elecsys 1010/2010, MODULAR ANALYTICS E170 ou **cobas e**

Matériel auxiliaire pour la détermination du cortisol dans l'urine :

- Dichlorométhane (chlorure de méthylène)
- Tubes en verre appropriés, pipettes, agitateur rotatif (vortex), azote, hotte aspirante

Matériel auxiliaire pour la détermination du cortisol dans la salive :

- Salivette®, tube pour le recueil de la salive (tube avec tampon d'ouate, prêt à l'emploi), Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne, [REF] 51.1534

Matériel auxiliaire pour les analyseurs Elecsys 1010/2010 et **cobas e 411 :**

- [REF] 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL, tampon système
- [REF] 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL, additif à la solution de lavage
- [REF] 11933159001, Adaptateur pour SysClean
- [REF] 11706829001, Elecsys 1010 AssayCup, 12 x 32 cuvettes réactionnelles ou [REF] 11706802001, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
- [REF] 11706799001, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 embouts de pipette

Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170 et **cobas e 601 :**

- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L tampon système
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
- [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
- [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
- [REF] 03023150001, WasteLiner (sacs pour déchets)
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean

Pour tous les analyseurs :

- [REF] 11298500316, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL solution de lavage du système

Réalisation du test

Extraction et reconstitution des échantillons d'urine

1. Bien mélanger 600 µL d'urine + 3,0 mL de dichlorométhane dans un tube en verre pendant 7 minutes.
2. Centrifuger 5 minutes à 2500 g pour séparer les phases.
3. Extraire et jeter la phase aqueuse ainsi que les résidus de l'interphase.
4. Transférer 1,5 mL de la phase dichlorométhane dans un tube en verre propre et laisser sécher par évaporation sous une hotte aspirante en exposant à un léger flux d'azote.
5. Reconstituer le résidu sec obtenu à l'aide de 300 µL de diluant (Elecsys Diluent Universal) et incubé 30 minutes entre 15 et 25 °C en mélangeant 4 fois 1 minute sur un agitateur rotatif.
6. Analyser l'échantillon reconstitué comme un échantillon de sérum ou de plasma.

Pour garantir le bon fonctionnement du test, se conformer aux instructions relatives à l'analyseur utilisé indiquées dans la présente notice. Pour les instructions spécifiques de l'analyseur, se référer au manuel d'utilisation approprié.



Cortisol

Cortisol



L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées dans le code-barres doivent être saisies. Si, exceptionnellement, le code-barres ne peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette.

Analysesurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et **cobas e** : Amener les réactifs réfrigérés à env. 20 °C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Eviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

Analyseur Elecsys 1010 : amener les réactifs réfrigérés à env. 20-25 °C et les placer dans le plateau réactifs/échantillons de l'analyseur (thermostaté entre 20 et 25 °C). Eviter la formation de mousse. **Ouvrir** les flacons avant la mise en route de l'analyseur, puis les **refermer**. Les replacer au réfrigérateur entre 2 et 8 °C après usage.

Calibration

Traçabilité : la méthode a été standardisée par rapport au test Enzymun-Test Cortisol. lui-même standardisé par dilution isotopique-spectrométrie de masse (DI/SM).¹³

Le panel de référence IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgique)/IFCC-451 (ID/GC/MS)^{13,14}, constitué de 34 échantillons à des concentrations comprises entre 83 et 764 nmol/L, a donné, avec le test Elecsys Cortisol, des taux de récupération situés entre 89 et 111 %.

Le code-barres des réactifs Elecsys Cortisol contient toutes les informations nécessaires à la calibration du lot. La courbe de référence est adaptée à l'analyseur à l'aide des calibrateurs Elecsys Cortisol CalSet.

Fréquence des calibrations : effectuer une calibration par lot en utilisant du réactif frais (ayant été enregistré depuis au maximum 24 heures sur l'analyseur). Une nouvelle calibration est recommandée :

Analysesurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et **cobas e** :

- après 1 mois (28 jours) pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même flacon de réactif resté sur l'analyseur

Analyseur Elecsys 1010 :

- à chaque nouveau coffret
- après 7 jours (température ambiante entre 20 et 25 °C)
- après 3 jours (température ambiante entre 25 et 32 °C)

Pour tous les analyseurs :

- quand elle s'avère nécessaire : par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance.

Contrôle de qualité

Utiliser Elecsys PreciControl Universal.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Les contrôles urinaires doivent être soumis à l'extraction et utilisés de la même manière que les échantillons de patients.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et lors d'une calibration. La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies.

Chaque laboratoire devra établir les mesures correctives à suivre si les résultats se situent en dehors de ces limites.

Se conformer à la réglementation gouvernementale et aux directives locales en vigueur relatives au contrôle de qualité.

Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en nmol/L, µg/dL ou µg/L.

Facteurs de conversion :

$$\begin{aligned} \text{nmol/L} \times 0,03625 &= \mu\text{g/dL} \\ \text{nmol/L} \times 0,3625 &= \mu\text{g/L} \\ \mu\text{g/dL} \times 27,586 &= \text{nmol/L} \\ \mu\text{g/L} \times 2,7586 &= \text{nmol/L} \end{aligned}$$

Calcul de la concentration en cortisol libre urinaire (taux de cortisol/24 h) :

Multiplier les résultats obtenus par l'analyseur par le volume des urines de 24 h (en L/24 h). Si les résultats sont exprimés en µg/dL, multiplier à nouveau par 10 (= µg/24 h). Le rendement moyen de l'extraction (n = 25) est de 94 %.

Limites d'utilisation - interférences

Le dosage dans le sérum et le plasma n'est pas influencé par l'ictère (bilirubine < 1026 µmol/L ou < 60 mg/dL), l'hémolyse (Hb < 1,2 mmol/L ou < 1,9 g/dL), la lipémie (Intralipid < 2700 mg/dL) et la biotine (< 123 nmol/L ou < 30 ng/mL).

Critère d'acceptabilité : recouvrement ± 10 % par rapport à la valeur initiale

Le dosage dans l'urine n'est pas influencé par les protéines jusqu'à 60 mg/dL, le NaCl jusqu'à 750 mmol/L, l'urée jusqu'à 350 mmol/L, la créatinine jusqu'à 5 mmol/L et le glucose jusqu'à 2 mmol/L.

Critère d'acceptabilité : recouvrement ± 15 % par rapport à la valeur initiale

Chez les patients traités par de fortes doses de biotine (> 5 mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.

Le résultat n'est pas influencé par le facteur rhumatoïde jusqu'à 1100 UI/mL.

L'influence de 17 médicaments fréquemment administrés a été recherchée *in vitro* : aucune interférence n'a été observée.

Dans de rares cas, des titres très élevés d'anticorps dirigés contre des anticorps spécifiques de l'analyte, des anticorps anti-streptavidine ou anti-ruthénium peuvent conduire à des interférences. Ces effets sont minimisés dans le test par un procédé approprié.

La grossesse, les contraceptifs oraux et les traitements aux estrogènes conduisent à l'obtention de taux de cortisol par excès.

Les sérums de patients traités à la prednisolone, méthylprednisolone ou prednisone peuvent donner des résultats faussement élevés.

Le 11-désoxycortisol est élevé lors du test à la Métopirone. Selon la réaction croisée (cf. paragraphe « Specificité analytique »), les résultats peuvent être faussement élevés.

Les patients présentant un déficit en 21-hydroxylase ont un taux de 21-désoxycortisol augmenté : ceci peut également conduire à des résultats faussement élevés.

En raison du rythme circadien, l'heure du prélèvement du sang doit être prise en considération pour interpréter les résultats. Tenir compte également du fait que le taux de cortisol peut augmenter en situation de stress.

Pour le diagnostic, les résultats doivent toujours être confrontés aux données de l'anamnèse du patient, au tableau clinique et aux résultats d'autres examens.

Limites et intervalles de mesure

Domaine de mesure

0,5-1750 nmol/L ou 0,018-63,4 µg/dL (défini par la limite de détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la limite de détection sont exprimés de la manière suivante : < 0,5 nmol/L (< 0,018 µg/dL), et les taux situés au-dessus du domaine de mesure de la manière suivante : > 1750 nmol/L (> 63,4 µg/dL) ou jusqu'à 17500 nmol/L (634 µg/dL) pour les échantillons dilués au 1/10^e.

Limites inférieures de mesure

Limite inférieure de détection

Limite inférieure de détection : 0,500 nmol/L (0,018 µg/dL)

La limite de détection correspond au plus faible taux d'analyte mesurable pouvant être distingué de zéro. Elle est obtenue par le calcul et représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2 écarts-type (calibrateur de référence, standard 1 + 2SD, répétabilité, n = 21).

Dilution des échantillons

Les échantillons de sérum et de plasma présentant une concentration en cortisol située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués à l'aide du diluant Elecsys Diluent Universal. Rapport de dilution recommandé : 1/10^e (dilution manuelle ou automatique sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 1010/2010 et **cobas e**). La concentration de l'échantillon dilué doit être > 50 nmol/L ou > 1,8 µg/dL.

Si la dilution est effectuée manuellement, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution. Si la dilution est effectuée par l'analyseur, les logiciels des analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 1010/2010 et **cobas e** tiennent compte de la dilution lors du calcul du résultat.

Les échantillons d'urine présentant des concentrations situées au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avant l'extraction à l'aide d'urines à faible concentration en analyte. Cette dilution doit être prise en compte lors du calcul de la concentration en cortisol dans l'urine.



Valeurs de référence

Cortisol dans le sérum et le plasma

Des études réalisées avec Elecsys Cortisol sur des échantillons de sujets sains ont permis d'établir les valeurs suivantes (5^e-95^e percentile) :

Matin (7-10 h) : 171-536 nmol/L (6,2-19,4 µg/dL) (n = 144)

Soir (16-20 h) : 64-327 nmol/L (2,3-11,9 µg/dL) (n = 135)

Cortisol libre urinaire

Des études réalisées avec Elecsys Cortisol sur les échantillons d'urine de 88 sujets sains ont permis d'établir les valeurs suivantes (5^e-95^e percentile) :

100-379 nmol/24 h (36-137 µg/24 h)

Cortisol salivaire

Des études réalisées avec Elecsys Cortisol sur les échantillons de salive de 154 sujets sains ont permis d'établir les valeurs suivantes (95^e percentile) :

Matin (8-10 h) : < 19,1 nmol/L (< 0,69 µg/dL)

Après-midi (14h30- 15h30) : < 11,9 nmol/L (< 0,43 µg/dL)

Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs et établir au besoin ses propres domaines de référence selon la population examinée.

Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives.

Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

Précision

La précision a été déterminée à l'aide de réactifs Elecsys, de pools de sérum humain et de contrôles, conformément un protocole (EP5-A) du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Chaque échantillon a été analysé 6 fois par jour pendant 10 jours (n = 60) ; répétabilité sur l'analyseur MODULAR ANALYTICS E170, n = 21. Les résultats suivants ont été obtenus :

Analyseurs Elecsys 2010 et **cobas e 411**

Echantillon	Moyenne		SD		CV	Précision intermédiaire		CV
	nmol/L	µg/dL	nmol/L	µg/dL		SD	CV	
SH ^d 1	208	7,53	2,76	0,10	1,3	3,29	0,12	1,6
SH 2	561	20,3	7,40	0,23	1,3	8,36	0,30	1,5
SH 3	1268	46,0	14,0	0,52	1,1	19,9	0,72	1,6
PC U ^e 1	363	13,2	5,08	0,18	1,4	5,67	0,21	1,6
PC U2	865	31,4	8,54	0,31	1,0	12,5	0,45	1,4

c) Répétabilité = précision intra-série

d) SH = Sérum humain

e) PC U = PreciControl Universal

Echantillon	Moyenne		SD		CV	Précision intermédiaire		CV
	nmol/L	µg/dL	nmol/L	µg/dL		SD	CV	
SH 1	202	7,31	6,43	0,23	3,2	8,40	0,30	4,2
SH 2	377	13,7	11,7	0,42	3,1	18,7	0,68	5,0
SH 3	546	19,8	12,3	0,45	2,2	20,7	0,75	3,8
PC U1	386	14,0	9,97	0,36	2,6	21,5	0,78	5,6
PC U2	921	33,4	19,0	0,69	2,1	49,6	1,80	5,4

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170 et **cobas e 601**

Echant.	Moyenne		SD		CV	Précision intermédiaire		CV		
	nmol/L	µg/dL	nmol/L	µg/dL		SD	CV			
SH 1	129	4,69	2,25	0,08	1,7	124	4,51	2,79	0,10	2,2
SH 2	352	12,8	5,19	0,19	1,5	341	12,4	9,72	0,35	2,8
SH 3	717	26,0	12,5	0,45	1,7	691	25,1	12,4	0,45	1,8
PC U1	418	15,1	4,59	0,17	1,1	410	14,8	6,76	0,25	1,7
PC U2	866	31,4	8,90	0,32	1,0	846	30,7	11,5	0,42	1,4

Pour montrer les effets de l'extraction et de la reconstitution sur la précision, les résultats indiqués dans le tableau suivant peuvent être comparés à ceux obtenus pour le sérum dans le premier tableau.

La précision du dosage du cortisol dans l'urine a été déterminée à l'aide des réactifs Elecsys, d'échantillons d'urine et de contrôles urinaires en utilisant 25 fois un extrait urinaire dans une série (répétabilité, n = 25) et en analysant 10 fois 10 extraits urinaires en simple détermination (précision intermédiaire, n = 10).

Analyseurs Elecsys 2010 et **cobas e 411**

Echant.	Répétabilité incl. extract.			Précision intermédiaire incl. extract.						
	Moyenne	SD	CV	Moyenne	SD	CV				
Urine 1	617	22,3	13,3	0,48	2,2	639	23,2	15,9	0,58	2,5
Urine 2	917	33,2	21,2	0,77	2,3	922	33,4	29,4	1,07	3,2
Urine 3	1156	41,9	33,2	1,20	2,9	1162	42,1	28,7	1,04	2,5
Urine 4	1683	61,0	39,1	1,42	2,3	1625	58,9	30,0	1,09	1,8
Contrôle urinaire 1	-	-	-	-	-	77,8	2,82	3,66	0,13	4,7

La précision du dosage du cortisol dans la salive a été déterminée à l'aide des réactifs Elecsys et d'échantillons de salive native et de salive surchargée dans une série (répétabilité, n = 21) et dans une simple détermination de 10 séries (précision intermédiaire, n = 10). La répétabilité et la précision intermédiaire ont été réalisées avec différents échantillons de salive :

Analyseurs Elecsys 2010 et **cobas e 411**

Echant.	Répétabilité			Précision intermédiaire						
	Moyenne	SD	CV	Moyenne	SD	CV				
Salive 1	4,68	0,170	0,287	0,010	6,1	2,08	0,075	0,696	0,025	33,4
Salive 2	11,5	0,417	0,309	0,011	2,7	8,05	0,292	0,924	0,033	11,5
Salive 3	15,1	0,547	0,611	0,022	4,0	13,1	0,475	0,938	0,034	7,1
Salive 4	15,9	0,576	0,245	0,009	1,5	34,6	1,25	1,69	0,061	4,9
Salive 5	19,8	0,718	0,611	0,022	2,8	42,5	1,54	1,76	0,064	4,1

Comparaison de méthodes

Sérum :

Une comparaison du test Elecsys Cortisol (y) avec le test Enzymun-Test Cortisol (x), effectuée à partir de 95 échantillons de patients hospitalisés, a permis d'établir les corrélations suivantes (en nmol/L) :

Passing/Bablok¹⁵

y = 1,11x - 25,3

τ = 0,885

Régression linéaire

y = 1,08x - 22,2

r = 0,985

Les concentrations des échantillons étaient situées entre env. 100 et 1240 nmol/L (env. 3,6 et 45 µg/dL).

Urine :

Une comparaison du test Elecsys Cortisol (y) avec un test Cortisol du commerce (x), effectuée sur 127 extraits d'urine, a permis d'obtenir les corrélations suivantes (en nmol/L) :

Passing/Bablok¹⁵

Pente : 1,32 (intervalle de confiance 95 % : 1,26-1,44)

Ordonnée à l'origine : 2,32 (intervalle de confiance 95 % : -7,82-7,18)

τ = 0,787

Régression linéaire

Pente : 1,23 (intervalle de confiance 95 % : 1,20-1,26)

Ordonnée à l'origine : 15,3 (intervalle de confiance 95 % : 9,89-20,70)

r = 0,990

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 5,52 et 1402 nmol/L ou 0,20 et 50,82 µg/dL pour le test de comparaison du commerce.



Cortisol

Cortisol

Salive :

Une comparaison entre le test Elecsys Cortisol (y) et un test du commerce spécifiquement développé pour le dosage du cortisol dans la salive (x), effectuée sur 326 échantillons de salive, a permis d'obtenir les corrélations suivantes (en nmol/L) :

Passing/Bablok¹⁵

Pente : 1,12 (intervalle de confiance 95 % : 1,03-1,22)

Ordonnée à l'origine : 0,52 (intervalle de confiance 95 % : -0,06-0,83)

$r = 0,531$

Régression linéaire

Pente : 0,90 (intervalle de confiance 95 % : 0,87-0,94)

Ordonnée à l'origine : 1,71 (intervalle de confiance 95 % : 1,47-1,96)

$r = 0,942$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 1,29 et 50,4 nmol/L ou 0,05 et 1,83 µg/dL pour le test de comparaison du commerce.

Spécificité analytique

Le dérivé d'anticorps utilisé dans le test présente les réactions croisées suivantes (%) :

a) Substance rajoutée à raison de 10 µg/mL :

Corticostérone	5,8
Sulfate de 21-cortisol	0,04
Cortisone	0,30
11-Désoxycorticostérone	0,69
11-Désoxycortisol	4,1
Dexaméthasone	0,08
17-α-Hydroxyprogesterone	1,50
Prednisone	0,28
Progesterone	0,35

b) Substance rajoutée à raison de 1 µg/mL :

21-Désoxycortisol	45,4
6-β-Hydroxycortisol	158

c) Substance rajoutée à raison de 0,1 µg/mL :

Allotétrahydrocortisol	165
Prednisolone	171
6-α-Méthylprednisolone	389

Sensibilité fonctionnelle

< 8,5 nmol/L (< 0,308 µg/dL)

La sensibilité fonctionnelle est définie comme étant la concentration en analyte la plus basse donnant un CV de 20 % pour la précision intermédiaire. Elle a été déterminée à l'aide d'échantillons de salive de faible concentration.

Références

1. Aron DC, Tyrell JB. Glucocorticoids & Adrenal Androgens. Dans: Greensoan FS, Baxter JD (éditeurs), Basic & Clinical Endocrinology, 4^e édition, Appleton & Lange, USA 1994;307-346.
2. Hasinski S. Assessment of adrenal glucocorticoid function. Postgrad Med 1998;104(1):61-64.
3. Rosalki SB. Biochemical Testing of adrenocortical function. Int J Clin Pract 1998;52(3):189-191.
4. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome and Pseudo-Cushing's States. Endocr Rev. 1998;19(5):647-672.
5. Ross RJM, Trainer PJ. Endocrine investigation: Cushing's syndrome. Clin Endocrinol 1998;49:153-155.
6. Miyachi Y. Pathophysiology and diagnosis of Cushing's syndrome. Biomed Pharmacother 2000;54:113-117.
7. van Aken, Romijn JA, Miltenburg JA, Lentjes GWM. Automated Measurement of Salivary Cortisol. Clin Chem 2003;49(8):1408-1409.
8. Raff H, Findling JW. A Physiologic Approach to Diagnosis of the Cushing Syndrome. Ann Intern Med 2003;138(12):980-991.
9. Raff H, Homar PJ, Skoner DP. New Enzyme Immunoassay for Salivary Cortisol. Clin Chem 2003;49(1):203-204.

10. Gröschl M, Rauh M, Dörr HG. Circadian Rhythm of Salivary Cortisol, 17α-Hydroxyprogesterone, and Progesterone in Healthy Children. Clin Chem 2003;49(10):1688-1691.
11. Chiu SK, Collier CP, Clark AF, Wynn-Edwards KE. Salivary cortisol on Roche Elecsys immunoassay system: pilot biological variations studies. Clin Biochem 2003; 36:211-214.
12. Aardal E, Holm AC. Cortisol in Saliva - Reference Ranges and Relation to Cortisol in Serum. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:927-932.
13. Siekmann L, Breuer H. Determination of Cortisol in Human Plasma by Isotope Dilution Mass Spectrometry. J Clin Chem Clin Biochem 1982;20:883-892.
14. Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Candidate Reference Method for Determining Serum Cortisol Based on Isotope Dilution-Gas Chromatography/Mass Spectrometry Using Heptafluorobutyrylato as Derivatization Method. Anal Biochem 1996;234:204-209.
15. Passing H, Bablok W, et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

Pour de plus amples informations, se référer au manuel de l'opérateur de l'analyseur utilisé, aux fiches techniques respectives, au dossier « Product Information » et aux notices d'utilisation de tous les réactifs nécessaires.

Les modifications importantes par rapport à la version précédente sont signalées par une barre verticale dans la marge. Les modifications concernant les données contenues dans le code-barres doivent être saisies manuellement.
© 2009, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



CHAPITRE III :

INDICATIONS DU DOSAGE

I- CORTISOL ET PATHOLOGIES :

I.1. Syndrome de Cushing :

Le **syndrome de Cushing**, ou hypercorticisme chronique, est une pathologie décrite par Harvey Cushing en 1932, qui se manifeste de manière clinique et est causée par un excès de sécrétion d'une hormone corticosurrénale, le cortisol, par les glandes surrénales et ayant des conséquences pathologiques. La manifestation la plus visible est l'apparition d'une obésité chronique de la partie supérieure du corps et un aspect bouffi du visage. Il faut distinguer le syndrome de Cushing de la maladie de Cushing qui en est une sous-catégorie. Le syndrome de Cushing peut également avoir une origine médicamenteuse en raison de prises excessives de glucocorticoïdes.

I.1.a. Diagnostic :

Le diagnostic du syndrome de Cushing est relativement difficile à poser. En effet, les symptômes évocateurs de ce trouble ne sont pas pathognomoniques et peuvent relever de beaucoup d'autres maladies. Le coup d'œil clinique permet toutefois de repérer, si le médecin y songe, la silhouette typiquement « cushingoïde ».

- Le visage est dit « lunaire », gonflé et rouge.
- Des formations lipidiques disgracieuses s'enkystent au niveau du cou, de la nuque - poétiquement désignées sous le terme de bosse de bison. On parlera

d'obésité ou lipodystrophie facio-tronculaire. Contrastant avec cette obésité localisée, on observe une fonte musculaire au niveau des jambes et des bras.

D'autres symptômes cliniques et fonctionnels moins manifestes peuvent également aiguiller le médecin :

- Hypertension artérielle avec valeur diastolique élevée
- Ecchymoses fréquentes et avec ampleur injustifiée
- Affinement et chute des cheveux
- Peau fine fragile présentant des vergetures larges et pourpres (différentes de celles de la grossesse)
- Acné
- Appétit stimulé
- Troubles du sommeil
- Fatigue nerveuse
- Fonte des muscles (signe du tabouret : le patient accroupi se relève difficilement sans appui)
- Troubles du cycle menstruel chez la femme
- Hirsutisme ou croissance pileuse activée
- Certains troubles psychologiques (ex : maniaquerie, dépression, ...)

1.1.b. Clinique :

Sur la base de ces symptômes, des tests biologiques s'avèrent nécessaires et peuvent montrer des taux de cortisol libre urinaire sur 24h anormalement élevés, avec une perturbation de son rythme nyctéméral, et en général un taux d'ACTH très bas. Il s'agit le plus souvent d'adénomes corticosurrénaux mais également moins fréquemment d'incidentalomes ou de phéochromocytomes sécrétant du cortisol. Le diagnostic de syndrome de Cushing sera également posé devant un test de freinage à la dexaméthasone inefficace.

Il existe également des syndromes de Cushing à cortisol élevé et ACTH extrêmement élevé (20 à 30% des cas de syndromes de Cushing), le plus

généralement dus à des adénomes hypophysaires corticotropes (60% des cas de syndrome de Cushing), c'est-à-dire sécrétant de l'ACTH. On parlera alors de maladie de Cushing (et non de syndrome).

Le reste des cas de syndromes de Cushing sont dus à des sécrétions ectopiques (hors du lieu) d'ACTH (20 à 30% des cas) par des tumeurs carcinoïdes bronchiques bénignes (60% des cas ectopiques), des tumeurs bronchiques malignes à petites cellules (10 à 20% des ectopiques), des tumeurs pancréatiques (10% des ectopiques), des phéochromocytomes (3-5% des ectopiques), et autres...

1.1.c. Paraclinique:

Il existe un hypercortisolisme prouvé si les taux sériques de cortisol sont élevés avec une rupture du cycle circadien :

- les taux de cortisol sont normalement entre 50 et 150 µg/l le matin à 8h et baissent progressivement vers 20 µg/l à minuit. Il faut associer à cela une augmentation du cortisol libre urinaire (CLU) sur 24 heures, qui est le meilleur reflet de la sécrétion sur une journée.

Un paramètre important de diagnostic est l'**absence de freinage**, c'est-à-dire de baisse du cortisol sérique et libre urinaire, après une prise test de 1 mg de dexaméthasone , un puissant corticostéroïde de synthèse, à minuit avec mesure de la cortisolémie à 8 h le lendemain. Normalement le cortisol chute après une telle prise, ce qui n'est pas le cas lorsqu'une hypersécrétion existe. Une fois ce bilan de première ligne réalisé, il faut confirmer l'hypersécrétion par un test de freinage standard (2 mg de dex par jour pendant 2 jours) avec mesure du CLU et du cortisol à 8 heures le lendemain de la dernière prise.

1.1.d. Physiopathologie:

La physiopathologie d'un syndrome de Cushing est liée à l'excès de cortisol entraînant :

- une dégradation excessive de certaines protéines
- une néoglucogénèse accrue
- un déséquilibre dans la répartition des graisses
- une résistance au stress notamment au niveau immunitaire avec une augmentation du taux de globules blancs (polynucléaires neutrophiles) dans le sang et des dérèglements de la coagulation.

Si la concentration en cortisol atteint un niveau encore plus élevé, d'autres symptômes peuvent apparaître :

- dans les muscles : diminution du volume musculaire
- dans les vaisseaux : fragilité accrue des parois vasculaires (bleus, ecchymoses fréquents)
- dans les os : ostéoporose
- dans la peau : amincissement et apparition de vergetures et hyperpigmentation.
- apparition de diabète (intolérance au glucose)
- hypertension et diminution du taux de potassium

1.1.e. Traitement:

• Le traitement idéal est la chirurgie, selon la source de dérégulation l'acte pratiqué est :

- l'ablation d'une tumeur hypophysaire par voie nasale en passant par une narine ou par une incision sous la lèvre supérieure. L'opération, sous anesthésie générale, dure environ une heure et ne laissera aucune cicatrice. L'acte chirurgical peut échouer si la tumeur est trop petite pour être trouvée ou trop volumineuse pour être retirée en totalité.

- l'ablation de tumeurs bronchiques. Cette solution n'est pas toujours possible car ces tumeurs sont souvent extrêmement difficiles à diagnostiquer et à repérer en imagerie.
- l'ablation unilatérale de la glande surrénale malade par videochirurgie. L'opération est faite sous anesthésie générale et ne laisse qu'une petite cicatrice. S'en suit un apport de cortisone synthétique provisoire de transition, jusqu'à hypertrophie compensatoire de la surrénale restante. En cas de tumeur cancéreuse, les chances de guérison sont augmentées si elle est petite, sans métastases et diagnostiquée rapidement car ce type de tumeur est très agressif. Si la tumeur est bénigne, la guérison est immédiate et sans risques de récives.
- Si la chirurgie n'est pas possible ou s'il y a risque de récive, on réduit la sécrétion de cortisol par médicament (Ketoconazole et Op'DDD ou Mitotane). Leur effet secondaire peut être une insuffisance surrénale, et certains médicaments peuvent entraîner un diabète en cas de prise de sel et/ou de sucre trop élevée.
- La radiothérapie est utilisée pour les tumeurs hypophysaires quand la chirurgie a été un échec ou impossible. Les séances sont quotidiennes sur une durée de 4 à 6 semaines. Le risque couru est de devenir définitivement insuffisant hypophysaire et donc insuffisant surrénal.
- Si aucun traitement n'a été possible ou efficace, on pratique une ablation bilatérale des glandes surrénales pour stopper la sécrétion de cortisol. Le patient devient définitivement insuffisant surrénal, et il faudra surveiller les éventuels adénomes corticotropes ou ectopiques.
- Femmes enceintes :

Les symptômes du syndrome de Cushing comme l'hypertension ou le diabète doivent être traités, le traitement chirurgical doit être effectué après l'accouchement. Il n'y a pas de conséquences sur le fœtus, sauf dans le rare cas

où le syndrome induit une hypersécrétion d'androgène quand le fœtus est de sexe féminin.

- Les effets du traitement :

Les symptômes du syndrome de Cushing disparaissent en quelques mois après l'arrêt de l'hypersécrétion de cortisol. Il peut subsister des cicatrices dues aux vergetures et des tassements vertébraux dus à l'ostéoporose.

1.1.f. Épidémiologie:

En dehors du syndrome de Cushing iatrogène (c'est-à-dire déclenché par la prise de médicament), le syndrome de Cushing est une maladie rare. Son incidence est de l'ordre de un nouveau cas par million d'habitants et par an.

- Répartition des cas :

On trouve ce syndrome partout dans le monde. Les femmes restent les individus qui sont les plus touchés par la maladie de Cushing. Cette prédominance des femmes sur les hommes disparaît pour les autres causes du syndrome de Cushing.

1.2. Maladie d'Addison :

La **maladie d'Addison**, ou insuffisance surrénalienne chronique primaire, est une maladie endocrinienne rare caractérisée par le défaut de sécrétion des hormones produites par les glandes surrénales : glucocorticoïdes (cortisol) et minéralocorticoïdes (aldostérone). Le terme « primaire » signifie que la maladie est en rapport direct avec une atteinte des glandes surrénales et exclut donc les causes médicamenteuses. C'est une insuffisance surrénalienne lente qui détruit progressivement la corticosurrénale.

1.2.a. Synonymes :

Les synonymes sont nombreux :

- Hypocortisolisme acquis
- Maladie d'Addison primaire
- Maladie d'Addison type classique
- Maladie d'Addison type auto-immune
- Insuffisance surrénalienne chronique acquise
- Insuffisance surrénalienne chronique primaire
- « maladie bronzée » ; en raison d'une fréquente modification de la coloration plus foncée de la peau qui fonce chez les malades)

1.2.b. Historique :

La maladie a été nommée d'après Thomas Addison³, médecin britannique né en octobre 1775 et mort le 29 juin 1860, qui a été le premier à décrire des changements de pigmentation relatifs à la maladie qui portera son nom sur la proposition d'Armand Trousseau.

1.2.c. Épidémiologie :

C'est une maladie rare, avec une incidence annuelle comprise entre 4 et 6 nouveaux cas par million d'habitants, tendant à croître avec le temps

1.2.d. Causes :

La tuberculose était autrefois la première cause d'insuffisance surrénalienne par tuberculose surrénalienne bilatérale. Actuellement la cause principale est la rétraction corticale auto-immune.

Les autres causes rares sont les métastases surrénaliennes, L'hémorragie bilatérale des surrénales et les causes infectieuses.

Par définition, l'insuffisance surrénale iatrogène, suite au sevrage en corticoïdes par exemple, n'est pas une insuffisance surrénale primitive (n'est pas conséquence d'une atteinte primitive de la glande surrénale).

1.2.e. Description clinique:

Elle se traduit notamment par une asthénie (avec courbatures), une hypotension artérielle, un amaigrissement (avec anorexie) et une mélanodermie (hyperpigmentation au niveau des points de frottement et des muqueuses due à l'origine commune des voies de contrôle de la mélanogénèse et de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrenalien d'où le second nom de maladie bronzée donné à la maladie d'Addison.

On observe une hyponatrémie et une hyperkaliémie dues à l'insuffisance d'aldostérone (impliquée dans la réabsorption rénale du sodium et l'excrétion rénale du potassium). On peut également observer une hypoglycémie expliquée par l'insuffisance de cortisol (ayant un rôle hyperglycémiant), et un goût prononcé pour le sel.

Le diagnostic est, en pratique, difficile, plus de la moitié des patients atteints ayant vu plusieurs médecins avant que le diagnostic en soit fait⁶.

La maladie d'Addison peut être associée avec d'autres maladies de mécanisme auto-immune comme par exemple le vitiligo, le diabète de type I et certaines formes d'hypothyroïdie.

1.2.f. Diagnostic:

Le dosage du cortisol sanguin est bas mais la variation spontanée du taux de ce dernier rend son interprétation délicate.

Ce dosage peut être précisé par un test au Synacthène : l'injection de ce produit, équivalant à celle de l'hormone corticotrope, doit faire augmenter rapidement le taux de cortisol dans le sang, sauf en cas d'insuffisance surrénalienne.

Le dosage du taux d'hormones corticotropes dans le sang permet de distinguer les insuffisances surrénales primitives (taux élevés) de celles qui sont secondaires (taux bas).

1.2.g. Traitement :

Un traitement de substitution est entrepris et consiste à apporter des hormones artificielles, l'hydrocortisone et la fludrocortisone, afin de remplacer celles qui ne sont plus produites par les surrénales. Les hormones se présentent sous la forme de comprimés à prendre quotidiennement et à vie par voie orale.

1.2.h. Complication :

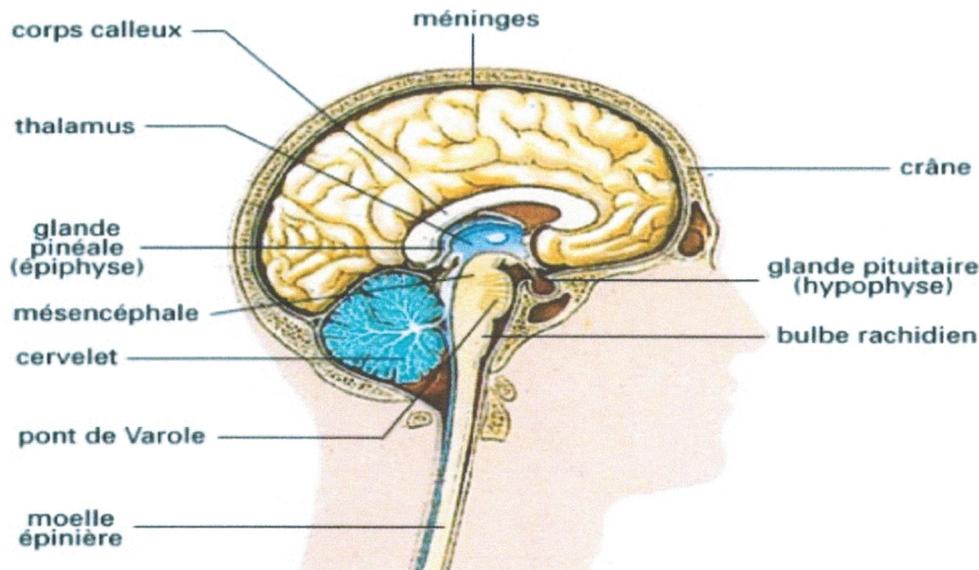
L'insuffisance surrénalienne aiguë en est la complication principale et peut être fatale par collapsus vasculaire sur pertes majeures de sel entraînant une chute des résistances périphériques.

1.3. Adénome hypophysaire :

1.3.a. Rappel anatomo-physiologique :

> L'hypophyse, c'est quoi ?

L'hypophyse est une petite boule d'à peine 1 cm de diamètre, suspendue à l'hypothalamus par une tige qu'on appelle la tige pituitaire et par laquelle passent des hormones et des nerfs. Elle est contenue dans une petite loge osseuse située à la base du crâne : la selle turcique. Devant cette tige passent les voies nerveuses en provenance de l'œil via le cerveau, les chiasmas optiques qui lui transmettent les images perçues par la rétine. L'hypophyse comprend deux compartiments bien distincts : l'antéhypophyse (située en avant), la posthypophyse (située en arrière).



Hypophyse : situation

> Rôle de l'hypophyse :

L'antéhypophyse est responsable de la fabrication de 5 hormones :

- L'ACTH qui va stimuler la **glande surrénale** .
- La TSH (thyroestimuline) qui stimule **la thyroïde** .
- La FSH et la LH (aussi appelées les gonadotrophines) qui stimulent **les ovaires** .
- La STH (hormone somatotrope) qui stimule le **cartilage de conjugaison** responsable de la croissance.
- La prolactine qui stimule la glande mammaire, donc la production de lait chez la femme qui vient d'accoucher.

La post hypophyse est plutôt un lieu de stockage pour deux hormones fabriquées par **l'hypothalamus** :

- L'hormone antidiurétique qui récupère la plupart de l'eau filtrée par le rein à partir du sang.
- L'ocytocine qui stimule l'utérus et lui permet de se contracter durant l'accouchement.

Vision dédoublée (comme lorsqu'on appuie légèrement sur le côté d'un seul œil). D'autres troubles comme vision floue ou disparition d'une partie du champ visuel (vers le nez ou vers les tempes) peuvent aussi exister. Cela signifie également qu'il existe une compression relativement importante vers le bas.

Disparition des règles associées à un écoulement de lait. Ce syndrome dit « d'aménorrhée galactorrhée » est typique d'un adénome à prolactine (l'hormone qui stimule la lactation). Sur le long terme chez l'adulte, des signes d'**acromégalie** peuvent apparaître. Chez l'enfant des signes de **gigantisme** apparaissent si la tumeur touche un enfant qui n'a pas terminé sa croissance.

A l'inverse, une **insuffisance hypophysaire** provoquée par un adénome chromophile, provoquera chez l'enfant un retard de croissance. Des troubles de développement des organes génitaux chez l'enfant apparaîtront également en cas de déficit en hormones sexuelles liées à un adénome chromophile. Les signes sont donc variés, insidieux, progressifs et c'est leur permanence qui finit par inquiéter.

1.3.c. Traitement :

Le traitement par médicaments utilise la bromocriptine qui est un médicament analogue à un médiateur chimique appelé dopamine. Ce traitement est efficace, mais au prix d'effets secondaires passagers : troubles digestifs, maux de tête, nausées, malaises dus à une baisse de tension en position debout, fatigue, douleurs dans le ventre, constipation.

Un autre médicament, l'octréotide est utilisé de façon complémentaire en cas d'**acromégalie** . Il permet également de préparer le terrain en cas de décision de recours à la chirurgie.

La chirurgie consiste à détruire la tumeur sous anesthésie générale, en passant par le nez. Cette intervention n'est décidée généralement que lorsque la bromocriptine a été inefficace durant 3 mois ou lorsque les troubles visuels ne

cèdent pas rapidement. Les résultats de la chirurgie sont généralement excellents sur le plan de la diminution du taux hormonal.

La **radiothérapie** permet de limiter la croissance de la tumeur, mais généralement pas à diminuer les troubles hormonaux.

II. CORTISOL AVEC STIMULATION :

>Test de stimulation à l'ACTH :

Le test de stimulation à l'ACTH (aussi appelé le test au Synacthène) est un test médical utilisé afin d'évaluer le fonctionnement des glandes surrénales. Il est employé spécifiquement pour diagnostiquer ou exclure une insuffisance surrénalienne (la maladie d'Addison et les conditions liées). Il implique une injection d'hormone adreno-cortico-tropique synthétique (Hormone corticotrope ou ACTH) et mesure la quantité de cortisol que les glandes surrénales sécrètent dans la circulation sanguine en réponse. Non seulement il peut déceler l'insuffisance surrénalienne mais il peut également permettre d'en distinguer les causes diverses.

Le test de stimulation à l'ACTH mesure la réponse des glandes surrénales ou le manque de réponse au stress en testant la quantité de cortisol que celles-ci produisent après avoir été stimulées par la forme synthétique de l'ACTH. Une prise de sang est réalisée avant le test pour déterminer le niveau de base de cortisol (en réalité il s'agit de la concentration d'ACTH sérique). Après administration par injection d'ACTH synthétique ou Synacthen (Cortrosyn), le sang est prélevé à 30 minutes, parfois 45 minutes, et à 60 minutes. Le test doit être effectué pendant au moins 60 minutes. Avec une fonction surrénale saine, la concentration de cortisol doit doubler (passant d'environ 25 ug/dl à 50) dans ce même délai. La plupart des patients ne ressentent rien pendant et après le test, mais des rougeurs, de l'anxiété et des nausées sont possibles.

Avec l'insuffisance surrénalienne primaire, le niveau de base de cortisol devrait commencer habituellement un peu plus bas, comme 15 (peut être beaucoup moins). Si l'essai de stimulation d'ACTH élève le niveau de cortisol à 20, cela ne doublerait pas et supporterait le diagnostic de l'insuffisance surrénalienne primaire.

En cas d'insuffisance surrénalienne secondaire, le cortisol de base peut doubler, tripler, quadrupler ou plus depuis une valeur initiale basse. D'autres exemples rapportés incluent une multiplication de valeur par 5 (5 porté à 25 ng/dl, 6 porté à 30), par 6 (4 porté à 24, à 5 porté à 30), par 7 (0.7 porté à 4.9) et décuplé (2 porté à 20, 2.7 porté à 27.6). Récemment une stimulation de 13 fois (1.25 porté à 16 ont monté 12.8 fois) et une de 14 fois (1.7 porté à 24, et a atteint 27.5 après une demie heure) ont été observés. Ces exemples illustrent à quel point le test de stimulation d'ACTH peut être extrême. La plupart des cas d'insuffisance surrénalienne secondaire doublent ou triplent seulement et habituellement débutent avec une valeur de base de cortisol au moins de 10. Le cortisol de base peut être très bas en raison du manque naturel d'ACTH dans le corps.

Certains ont rapporté que leur premier test de stimulation à l'ACTH a doublé ou plus depuis une valeur de cortisol initiale basse, mais un autre test réalisé plus tard a suggéré qu'ils étaient primaires (valeur de cortisol moins que doublée). Beaucoup ont rapporté que leur médecin a changé leur diagnostic de secondaire en insuffisance surrénalienne primaire. Dans l'insuffisance surrénalienne secondaire, si les glandes surrénales manquent d'ACTH pendant assez longtemps, la production surrénale de cortisol peut s'atrophier, et ainsi ne plus monter dans une stimulation d'ACTH avec des ACTH de sérum étant dans la moitié inférieure de la fourchette. Il est normal de continuer le diagnostic secondaire.

Le test à l'ACTH est généralement la dernière indication permettant de conclure à une insuffisance surrénalienne, mais la plupart des médecins envisagent seulement la maladie d'Addison (avec la maladie d'Addison, la stimulation

pourrait commencer à 3, 4 ou 6 et même 8), alors les médecins voient dans la stimulation que les glandes surrénales fonctionnent. Ils ne reconnaissent pas un degré quelconque d'insuffisance surrénalienne entre la maladie d'Addison et le fonctionnement surrénale normal. Beaucoup de patients avec insuffisance surrénale sont écartés car la plupart des docteurs y voient le doublement (ou plus), comme un bon résultat, même depuis une valeur de cortisol de base faible ; ils n'y voient pas l'indication d'une production d'ACTH faible.

Le test de sérum d'ACTH devrait toujours être effectué au même moment que la stimulation à l'ACTH. Ce test mesure la production d'ACTH hypophysaire. Le test de sérum d'ACTH et de stimulation à l'ACTH peuvent donner ensemble une image plus claire, particulièrement si l'on a une insuffisance surrénale secondaire.

Dans l'insuffisance surrénalienne primaire (maladie d'Addison incluse), le sérum d'ACTH sera au maximum de la fourchette ou en dessous. Parfois dans la maladie d'Addison, l'ACTH sera très au-dessus de la fourchette pouvant aller jusqu'à 100 ou même 1000. Dans l'insuffisance surrénalienne secondaire, le sérum d'ACTH sera habituellement dans la moitié inférieure de la fourchette pouvant aller jusqu'au minimum, mais généralement pas au-dessous, cependant les valeurs peuvent atteindre des valeurs basses de 40 (98% des secondaires sont dans la fourchette pour le sérum d'ACTH). Un niveau de sérum normal en ACTH devrait être juste dans le tiers supérieur de la fourchette (une fourchette de 10 - 60 comme elles étaient reconnues jusqu'il y a 3 ans environ).

III. CORTISOL AVEC FREINATION:

> **Principe** : administrer un glucocorticoïde à dose supraphysiologique pour freiner l'axe corticotrope

> **Contre-indications** : grossesse

> **Protocoles**

- **Freinage minute ou fort rapide**

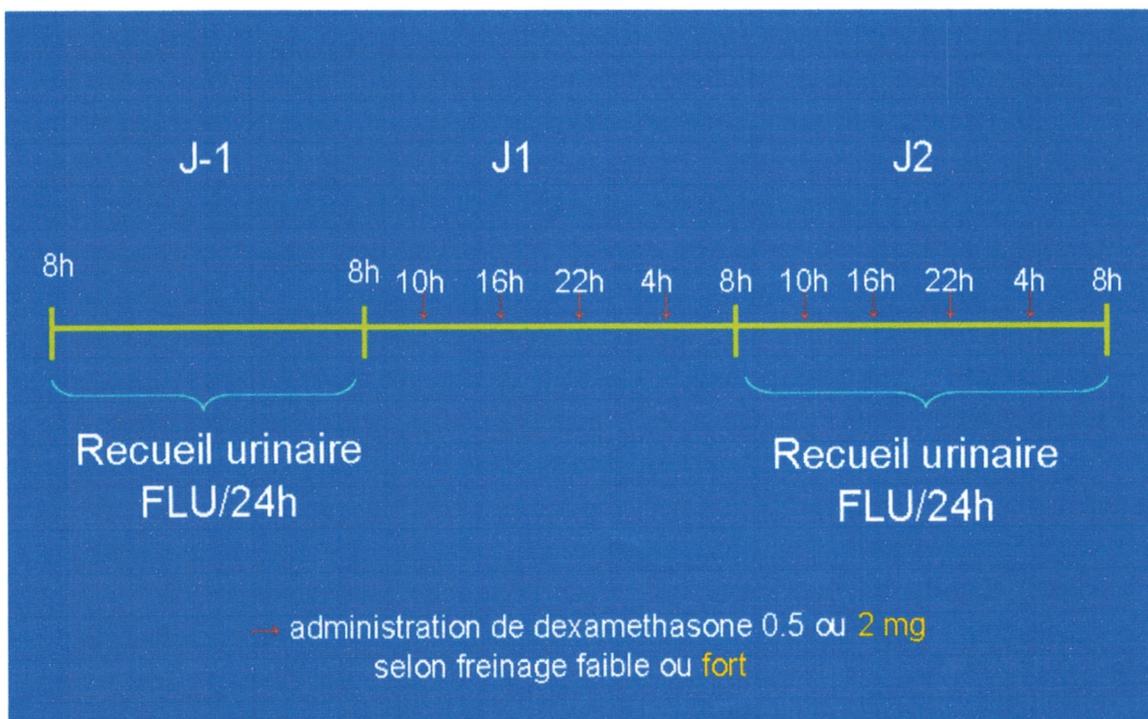
• 1mg ou 8mg de DXM à minuit, dosage cortisol plasmatique à 8h

- **Freinage faible :**

• 0.5 mg de DXM/6h pendant 48h avec recueil du FLU sur le 2^e jour

- **Freinage fort :**

• idem avec 2mg/6h



CONCLUSION :

Le cortisol est la principale hormone glucocorticoïde, elle doit cela à son action anti-inflammatoire, antiallergique et immunosuppressive, sa fonction est plus qu'effective dans la régulation des glucides, lipides, protides, des ions et de l'eau pour limiter toute variation trop brutale de l'équilibre physiologique de l'organisme. Autant son augmentation (hypercorticisme : Maladie de Cushing) que sa diminution (Maladie d'Addison) occasionnent de conséquents dysfonctionnements des glandes surrénales et pouvant par voie de conséquence affecter les autres fonctions métaboliques en corrélation avec la fonction surrénalienne. Son dosage constitue l'examen de base pour l'exploration des dysfonctionnements de la glande corticosurrénale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Livre immunologie de *Jean-François*.
- Microsoft ® Encarta ® 2006. (c) 1993-2005 Microsoft Corporation.
- Livre : Immunologie *P.M Lydyard, A.Whelan & M.W.Ffanger*.
- Livre : Immunologie de *Roitt.Brostoff.Male*
- Publication du Dr. *Marie-Françoise Odou (Forum de la santé, Doctissimo)*

- 50-23-7 « *Hydrocortisone* » sur ChemIDplus, consulté le 8 juillet 2009.
- Masse molaire calculée d'après *Atomic weights of the elements 2007 [archive]* sur www.chem.qmul.ac.uk
- « *Dihydrocortisone [archive]* » dans la base de données de produits chimiques *Reptox de la CSST (organisme québécois responsable de la sécurité et de la santé au travail)*, consulté le 24 avril 2009.