

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur et de la  
Recherche Scientifique

Université de Mouloud Mammeri  
Faculté de médecine  
Tizi Ouzou



وزارة  
التعليم العالي  
والبحث العلمي

جامعة مولود معمري  
كلية الطب  
تيزي وزو

Département de Pharmacie

## PROJET DE FIN D'ETUDES

N° D'ORDRE :

Présenté et soutenu publiquement

Le 14 juillet 2019

En vue de l'obtention du diplôme : Docteur en Pharmacie

## Thème

**Activité cholinestérasique : validation des intervalles  
de référence sur COBAS integra 400<sup>plus</sup>**

Réalisé par :

-M<sup>elle</sup> AYADI Sabrina

-M<sup>elle</sup> BERRAH Sabrina

-M<sup>elle</sup> CHAOUICHE Sabrina

Encadrées par :

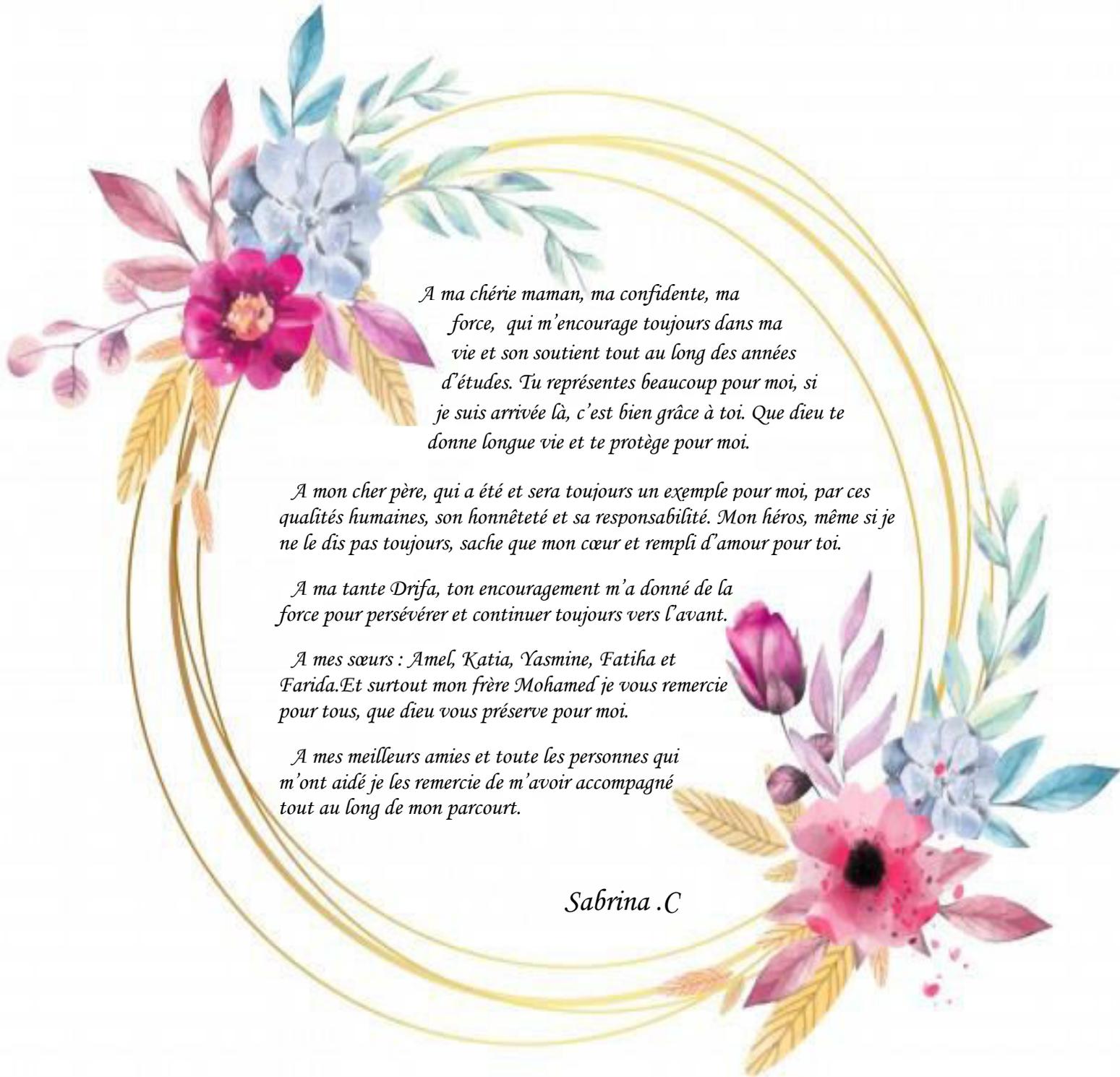
- Promotrice : **Dr. KACI Lylia**
- Co-promotrice : **Dr .SADOU Salima**

Composition du jury :

- |                        |              |                     |       |             |
|------------------------|--------------|---------------------|-------|-------------|
| - <b>BELAZOUGUI .O</b> | MAHU         | Faculté de médecine | UMMTO | Présidente  |
| - <b>MEHNI .M.E</b>    | Ancien. MAHU | Faculté de médecine | UMMTO | Examinateur |

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

# Dédicace



*A ma chérie maman, ma confidente, ma force, qui m'encourage toujours dans ma vie et son soutien tout au long des années d'études. Tu représentes beaucoup pour moi, si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.*

*A mon cher père, qui a été et sera toujours un exemple pour moi, par ces qualités humaines, son honnêteté et sa responsabilité. Mon héros, même si je ne le dis pas toujours, sache que mon cœur est rempli d'amour pour toi.*

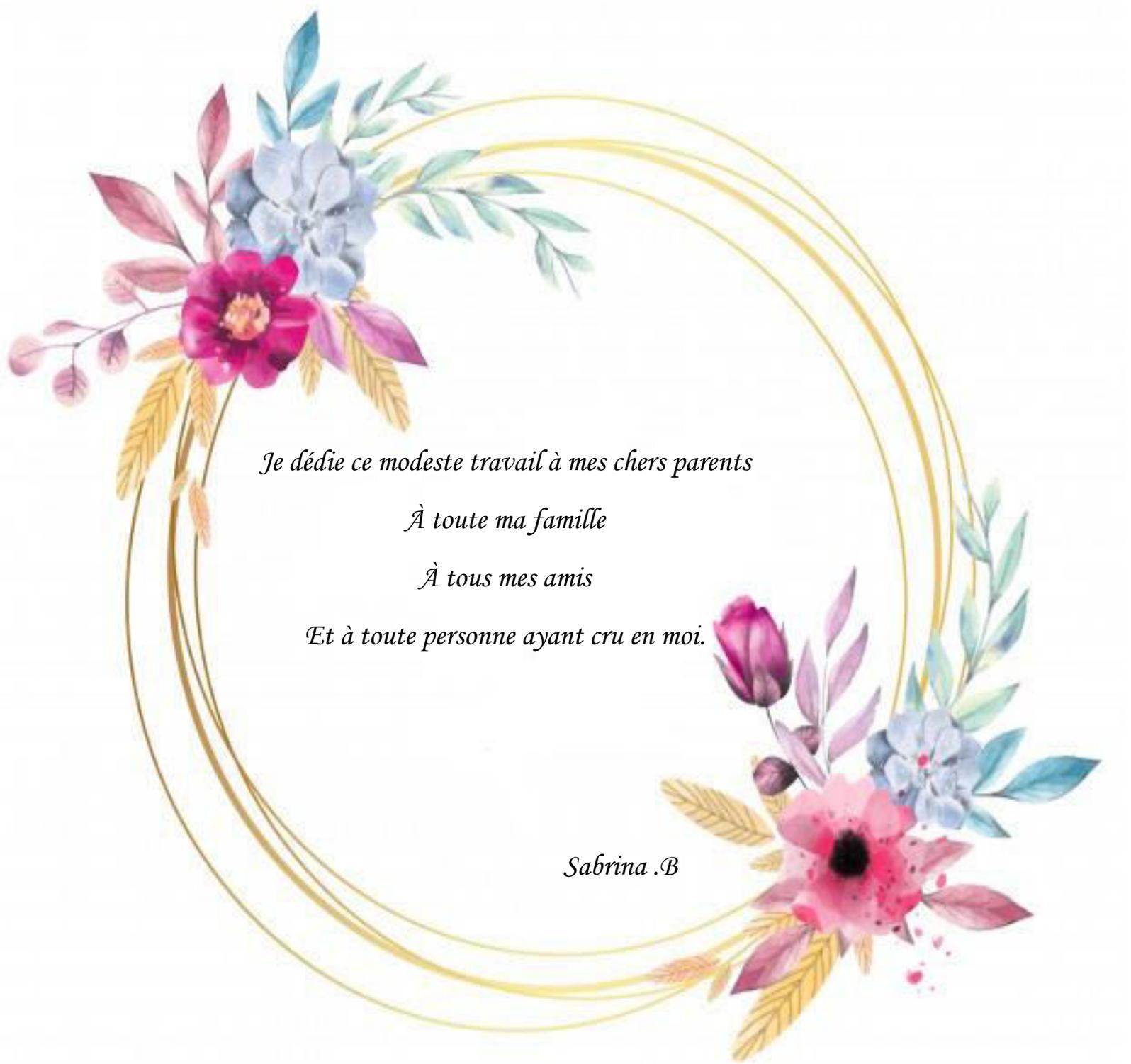
*A ma tante Drifa, ton encouragement m'a donné de la force pour persévérer et continuer toujours vers l'avant.*

*A mes sœurs : Amel, Katia, Yasmine, Fatima et Farida. Et surtout mon frère Mohamed je vous remercie pour tous, que dieu vous préserve pour moi.*

*A mes meilleurs amis et toute les personnes qui m'ont aidé je les remercie de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours.*

*Sabrina .C*

# *Dédicace*



*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents*

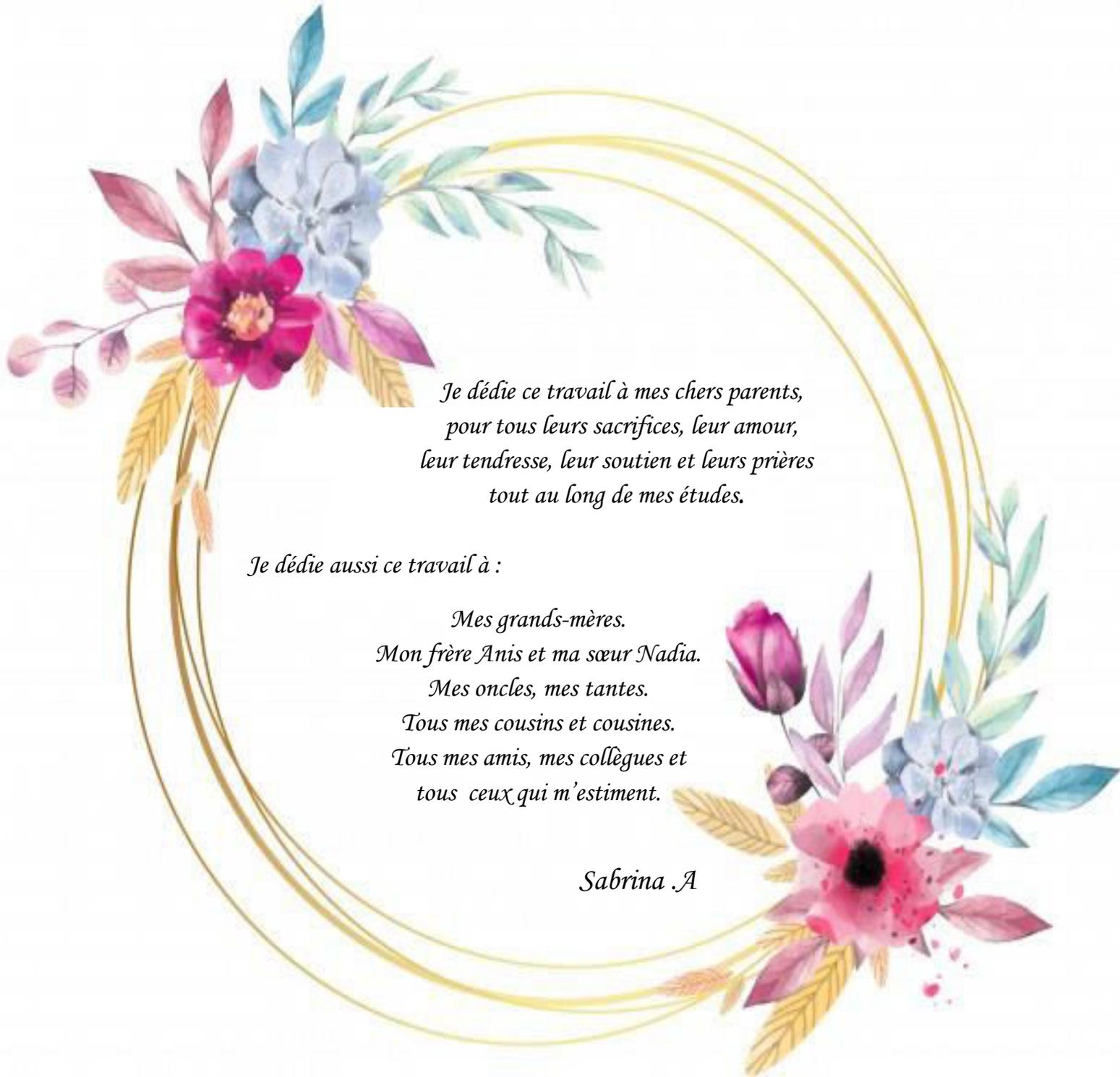
*À toute ma famille*

*À tous mes amis*

*Et à toute personne ayant cru en moi.*

*Sabrina .B*

# *Dédicace*



*Je dédie ce travail à mes chers parents,  
pour tous leurs sacrifices, leur amour,  
leur tendresse, leur soutien et leurs prières  
tout au long de mes études.*

*Je dédie aussi ce travail à :*

*Mes grands-mères.  
Mon frère Anis et ma sœur Nadia.  
Mes oncles, mes tantes.  
Tous mes cousins et cousines.  
Tous mes amis, mes collègues et  
tous ceux qui m'estiment.*

*Sabrina .A*



# Remerciements

*En premier lieu nous remercions le bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la volonté et la patience pour finir ce travail malgré toutes les difficultés. À lui seul la gloire.*

*Au terme de cette étude, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice **Dr. KACI Lyliá** maitre-assistante en Toxicologie à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, vos conseils et vos orientations nous ont été précieux nous espérons être digne de votre confiance. Que votre compétence pratique, votre rigueur au travail et vos qualités humaines et professionnelles soient pour nous un exemple à suivre.*

*À notre co-promotrice **Dr. SADOU Salima** assistante en Toxicologie au CHU de Tizi Ouzou nous vous somme très reconnaissantes pour votre patience, votre disponibilité et vos judicieux conseils tout au long de la période de l'étude, qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*Un grand merci aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions ;*

*Au **Dr. BELAZOUGUI** maitre-assistante en Toxicologie à l'UMMTO, nos sincères remerciements pour l'honneur que vous nous faites de bien vouloir présider le jury de notre soutenance, nous vous prions d'accepter notre profond respect.*

*Au **Dr. MEHNI** Maître-assistant en Biochimie, veuillez accepter nos sincères remerciements de bien vouloir juger ce travail et de l'enrichir par vos propositions et remarques.*

*À toute l'équipe du laboratoire de Toxicologie, où nous avons réalisé ce travail, nous tenons à vous remercier pour votre sympathie, votre écoute et votre aide pour la réalisation de notre travail.*

*Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance au **Dr. BOUBRIT** chef de service du laboratoire de Microbiologie, au **Dr. SELLAM** chef de service de transfusion sanguine au niveau du CHU de Tizi-Ouzou et au directeur de EPSP de DBK de Tizi Ouzou et toutes leurs équipes, pour leur accueil et leur aide à effectuer les prélèvements.*

*Au Dr. DAHMANI chef de service du laboratoire de Biochimie au niveau du CHU de Tizi-Ouzou, vous avez mis le matériel du laboratoire à notre disposition pour pouvoir réaliser l'étape analytique de ce travail, veuillez accepter l'expression de nos vifs remerciements.*

*Nous adressons de sincères remerciements à nos collègues pour leurs aides, et à toutes les personnes qui ont participé à cette étude.*

*Merci infiniment*



# TABLE DES MATIÈRES

---

-Remerciements personnels	
-Remerciements	
-Table des matières	
-Liste des abréviations .....	i
-Liste des figures.....	iv
-Liste des tableaux.....	vi
-Liste des graphes.....	vii
-Introduction générale.....	01
-Objectifs .....	03

## **PARTIE I : PARTIE THÉORIQUE**

### **CHAPITRE I : ÉTABLISSEMENT ET VALIDATION DES INTERVALLES DE RÉFÉRENCE AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE**

1. Généralités.....	04
1.1. Terminologie.....	05
1.2. Intérêt des intervalles de référence.....	07
1.2.1. Intérêt dans le diagnostic médical.....	07
1.2.2. Intérêt dans le pronostic et le suivi thérapeutique.....	08
1.2.3. Intérêt épidémiologique .....	08
2. Recommandations des organismes internationaux .....	08
2.1. Pour la détermination des intervalles de référence.....	08
2.2. Pour le transfert des intervalles de référence .....	09
3. Protocole de détermination des intervalles de référence.....	09
3.1. Sélection des individus de référence.....	11
3.1.1. Types d'échantillonnage .....	11
3.1.2. Facteurs de variations .....	12
3.1.3. Les principaux critères de sélection .....	13
3.2. Traitements statistiques et analyses des données.....	14
4. Transférabilité.....	15
4.1. Premier cas : comparaison des systèmes.....	16
4.2. Deuxième cas : comparaison de populations analytiques.....	17

### **CHAPITRE II : L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE**

1. Cholinestérases.....	21
1.1. Acétylcholinestérase ou cholinestérase globulaire.....	21
1.1.1. Origine.....	21
1.1.2. Spécificité d'action.....	21
1.1.3. Fonctions physiologiques.....	21
1.1.4. Structure .....	22
1.2. Butyrylcholinestérases ou cholinestérases sériques .....	25
1.2.1. Origine.....	25
1.2.2. Spécificité d'action.....	25

# TABLE DES MATIÈRES

---

1.2.3. Fonctions physiologiques.....	26
1.2.4. Structure .....	26
1.3. Mécanisme d'action des cholinestérases .....	27
<b>2. Principaux facteurs influençant l'activité des cholinestérases.....</b>	<b>28</b>
2.1. L'âge et le sexe .....	29
2.2. L'influence du poids corporel .....	30
2.3. Atteintes hépatiques .....	30
2.4. Variantes génétiques.....	32
2.5. Grossesse et prise de contraceptifs oraux .....	35
2.6. Inhibiteurs pharmaceutiques .....	36
2.7. Les pesticides.....	37

## CHAPITRE III : ACTION DES ORGANOPHOSPHORÉS ET CARBAMATES SUR L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

<b>1. Les organophosphorés.....</b>	<b>39</b>
1.1. Structure.....	39
1.2. Relation structure-activité .....	39
1.3. Classification.....	40
1.4. Propriétés physico-chimiques.....	44
1.5. Usages .....	45
1.6. Sources d'expositions .....	45
1.7. Toxicocinétique.....	46
1.8. Mécanisme d'action toxique.....	48
1.9. Symptomatologie.....	53
1.10. Diagnostic .....	55
1.11. Traitement.....	56
<b>2. Les carbamates.....</b>	<b>57</b>
2.1. Relation structure/activité et usages .....	58
2.2. Propriétés physicochimiques.....	60
2.3. Sources d'exposition aux carbamates.....	60
2.4. Toxicocinétique.....	61
2.5. Mécanisme d'action toxique.....	61
2.6. Symptomatologie.....	62
2.7. Diagnostic.....	62
2.8. Traitement des intoxications.....	62

## CHAPITRE IV : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

<b>1. Dosage de l'activité cholinestérasique.....</b>	<b>64</b>
1.1. Indication de la mesure de l'activité cholinestérasique.....	64
1.1.1. La butyrylcholinestérase.....	64

# TABLE DES MATIÈRES

---

1.1.2. L'acétylcholinestérase.....	65
1.2. Modalité de prélèvement et préparation des échantillons.....	65
1.3. La détermination de l'activité cholinestérasique.....	66
1.3.1. Méthodes manométriques.....	67
1.3.2. Méthodes potentiométriques.....	68
1.3.3. Méthodes titrimétriques.....	69
1.3.4. Méthodes photométriques.....	70
1.3.5. Méthodes fluorométriques.....	77
1.3.6. Méthodes polarographiques.....	80
1.3.7. Méthodes radio-isotopiques.....	81
1.3.8. Biocapteurs.....	82
1.4. Récapitulatif de l'ensemble des méthodes.....	83
<b>2. Intérêt du dosage de l'activité cholinestérasique dans les intoxications aux organophosphorés et carbamates.....</b>	<b>88</b>
2.1. Pour les organophosphorées.....	88
2.1.1. Cholinestérasés et organophosphorés.....	88
2.1.2. Diagnostic de certitude de l'exposition aigue.....	89
2.1.3. Marqueur de l'efficacité thérapeutique.....	90
2.1.4. Diagnostic des expositions professionnelles aux organophosphorés.....	91
2.2. Pour les carbamates.....	94

## **PARTIE II : PARTIE PRATIQUE**

### **CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1. Type de l'étude.....	95
2. Population de l'étude.....	95
3. Échantillonnage.....	95
3.1 Critères d'inclusion.....	95
3.2. Critères d'exclusion.....	96
4. Analyse statistique.....	96
5. Critères de jugement.....	97
5.1. Pour les intervalles de référence de l'activité cholinestérasique.....	97
5.2. Pour l'indice de masse corporelle (IMC).....	97
6. Matériels.....	98
6.1. Matériels utilisés pour le prélèvement.....	98
6.2. Matériels utilisés pour l'analyse.....	98
7. Protocole opératoire.....	102
7.1. Étape pré-analytique.....	102
7.1.1. Fiche de renseignements.....	103
7.1.2. Déroulement du prélèvement.....	103

# TABLE DES MATIÈRES

---

7.1.3. Centrifugation .....	103
7.1.4. Transport .....	104
7.2. Étape analytique.....	104
7.2.1. Programmation.....	104
7.2.2. Présentation de l'appareil .....	104
7.2.3. Principe de mesure de l'automate.....	105
7.2.4. Domaine de mesure .....	108
7.2.5. Précision.....	108
7.2.6. Calibration.....	109
7.2.7. Contrôle.....	109
8. Ethique.....	110

## CHAPITRE II : RÉSULTATS

1. Caractéristiques de la population.....	111
1.1. Distribution selon l'âge .....	111
1.2. Répartition géographique.....	113
1.3. Distribution selon l'indice de masse corporelle (IMC).....	115
2. Résultats .....	116
2.1. Résultats de l'activité cholinestérasique.....	116
2.2. Étude de corrélation .....	121
2.2.1. Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge .....	121
2.2.2. Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC .....	122
-Discussion.....	124
-Conclusion .....	128
-Références bibliographiques	
-Annexes	
-Résumé	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- **ACH** : Acétylcholine
- **AChE** : Acétylcholinestérase
- **ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique.
- **ADNc** : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
- **Ala** : Alanine
- **AMM** : Autorisation de Mise sur la Marché
- **ATCh**: Acétylthiocholine
- **BCh**: Butyrylcholine
- **BChE**: Butyrylcholinestérase
- **C.f.a.s**: Calibrator For Automated Systems
- **CE**: Communauté Européenne
- **CH** : Choline
- **CHE**: Cholinestérase
- **CHE2** :Cholinesterase Gen 2
- **CHO** :Choline Oxydase
- **CHU**: Centre Hospitalo-Universitaire.
- **CLSI**: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- **CMB** : Carbamates
- **CMP** : N- [4- (7-diéthylamino-4-méthylcoumarine-3-yl) phényl] maléimide
- **CN** : Cyanure
- **CTS** : Centre de Transfusion Sanguin
- **DBK** : Draa Ben Khedda
- **DL 50** : Dose létale 50%
- **DTNA**: Acide 6'-dithiodinicotinique
- **DTNB** : Acide 5,5'-DiThio-Bis-(2-Nitrobenzoïque)
- **EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique.
- **EN** : Norme Européenne
- **EPSP** : Etablissement Public de Santé de Proximité
- **F** : Fluor
- **GABA** : Acide Gamma Aminobutyrique
- **Glu** : Acide glutamique

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- **Gly** : Glycine
- **His** : Histidine
- **HPLC**: High-Performance Liquid Chromatography
- **Hz**: Hertz
- **IC**: Intervalle de Confiance
- **ICSH** : International Councilfor Standardization in Haematology
- **IFCC-LM** : International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
- **IHC** : Insuffisance Hépatocellulaire
- **IMAO** : Inhibiteur de la MonoAmine Oxydase
- **IMC** : Indice de Masse Corporel
- **INRS** : Institut National de Recherche en Sécurité
- **IR** : Intervalle de Référence
- **IRSST** : Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail
- **ISO** : Organisation Internationale de Normalisation
- **Kg** : Kilogramme
- **LCt50** :The median Lethal Dose
- **LG**: Lavage Gastrique
- **M** : Mètre
- **NF** : Norme Française
- **NMDA** : N Méthyl-D-Aspartate
- **NOP** : Neurotoxiques Organophosphorés
- **NTE** : Neuropathy Target Esterase
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **OP** : Organophosphorés
- **OPN** : Organophosphorés Neurotoxique
- **OPP** : Organophosphorés Pesticides
- **OPWC**: Convention on the Prohibition of Chemical Weapons
- **P**: Percentile
- **PCC1**: PreciControl ClinChem Multi 1
- **PCC2**:PreciControl ClinChem Multi 2
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- **PFC** : Plasma Frais Congelé
- **Phe** : Phenyl alanine
- **QA-KA** : Quisqualate-Kainate
- **SCN** : Thiocyanate
- **SER** : Serine
- **SN** : Système Nerveux
- **SNA** : Système Nerveux Autonome
- **SNC**:Système Nerveux Central
- **TCH**: Thiocholine
- **TEPP**:Tetraethyl-Pyrophosphate
- **TNB**: 3-carboxy-4-nitrothiolate
- **TOF**: Train of Four
- **Trp** :Tryptophane
- **Tyr**:Tyrosine
- **UV** : Ultra-Violet.
- **VR** : Valeurs de Référence.

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 01</b> : Relations entre les différents termes employés dans la définition du concept de valeurs de référence.....	06
<b>Figure 02</b> : Les étapes de détermination des intervalles de référence.....	10
<b>Figure 03</b> : Protocole de validation des intervalles de référence.....	19
<b>Figure 04</b> : Rôle de l'AChE au niveau des synapses .....	22
<b>Figure 05</b> : Réaction d'hydrolyse de l'ACH catalysée par l'AChE.....	22
<b>Figure 06</b> : Représentation schématique de l'acétylcholinestérase.....	23
<b>Figure 07</b> : Représentation schématique du site actif de l'AChE .....	25
<b>Figure 08</b> : Variations de l'activité des cholinestérases en fonction du type de l'atteinte hépatique.....	31
<b>Figure 09</b> : Séquençage de Sanger du gène BCHE .....	34
<b>Figure 10</b> : Structure chimique générale des organophosphorés.....	39
<b>Figure 11</b> : Voies de bio-transformation du Parathion.....	48
<b>Figure 12</b> : L'hydrolyse de l'acétylcholine à l'état normal.....	50
<b>Figure 13</b> : Fixation d'un OP sur l'acétylcholinestérase.....	51
<b>Figure 14</b> : Le blocage des cholinestérases par les OP.....	51
<b>Figure 15</b> : Phénomène d'Agging.....	52
<b>Figure 16</b> : Structure chimique générale des carbamates, thiocarbonates et dithiocarbamates .....	58
<b>Figure 17</b> :Structure du Chlorpropharm.....	59
<b>Figure 18</b> : Structure du Thiodicarb.....	59
<b>Figure 19</b> : Les principaux principes des méthodes de détermination de l'activité cholinestérasique.....	67
<b>Figure 20</b> : Principe de la méthode potentiométrique.....	68
<b>Figure 21</b> : Principe de la méthode titrimétriques.....	70
<b>Figure 22</b> : Les indicateurs acide-base utilisés dans les méthodes photométriques.....	71
<b>Figure 23</b> : La photométrie d'Hestrin pour le dosage de l'activité cholinestérasique.....	71
<b>Figure 24</b> : La méthode photométrique d'Ellman utilisant l'Acétylthiocholine.....	72
<b>Figure 25</b> :Inhibiteurs sélectifs de la BChE ethopropazine et l'iso-OMPA.....	73
<b>Figure 26</b> : Dosage photométrique introduit par Uete.....	74
<b>Figure 27</b> :Un test photométrique avec l'acide 6'-dithiodinicotinique.....	75
<b>Figure 28</b> : Un test photométrique pour les analogues de la benzoylcholine.....	75
<b>Figure 29</b> : Dosage selon Abernethy avec la cholinoxidase et la peroxydase de raifort.....	76

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 30</b> : Dosage basé sur l'accumulation d'indigo en présence d'oxygène.....	76
<b>Figure 31</b> : Hydrolyse des esters de résorufine.....	78
<b>Figure 32</b> : Dosage des esters de naphtyle par hydrolyse.....	78
<b>Figure 33</b> : Test fluorométrique utilisant l'iodure de 7-acétoxy-1-méthylquinoléinium .....	79
<b>Figure 34</b> : Analyse fluorométrique avec l'acétylthiocholine et CMP.....	79
<b>Figure 35</b> : Un dosage chimioluminescent selon Birman.....	80
<b>Figure 36</b> : Principe des biocapteurs potentiométriques.....	83
<b>Figure 37</b> : Biocapteur selon La Rosa .....	84
<b>Figure 38</b> : Inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques de guerre (NOP).....	88
<b>Figure 39</b> : Interprétation de la baisse de l'activité cholinestérasique dans le cadre du suivi des expositions professionnelles.....	92
<b>Figure 40</b> : Surveillance des travailleurs exposés aux neurotoxiques de guerre (NOP).....	93
<b>Figure 41</b> : Schéma de la validation des valeurs de référence .....	96
<b>Figure 42</b> : Automate COBAS INTEGRA 400 <sup>plus</sup> .....	99
<b>Figure 43</b> : A : Centrifugeuse ROTOFIX 32A. B : Centrifugeuse EBA 20.....	99
<b>Figure 44</b> : Micropipette.....	100
<b>Figure 45</b> : Embouts de pipettes.....	100
<b>Figure 46</b> : Réactif Cholinesterase Gen 2 (CHE2).....	101
<b>Figures 47</b> : PerciControl ClinChem Multi 1 (PCC1).....	102
<b>Figure 48</b> : PerciControl ClinChem Multi 2 (PCC2).....	102
<b>Figure 49</b> : Calibrator For Automated System (C.f.a.s).....	103
<b>Figure 50</b> : Principe de la photométrie d'absorption.....	108
<b>Figure 51</b> : Principe de dosage de l'activité cholinestérasique (BChE) sur COBAS intégra 400 plus .....	109

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 01</b> : Comparaison entre limites de référence et limites de décision médicale .....	07
<b>Tableau 02</b> : Facteurs de variations biologiques.....	13
<b>Tableau 03</b> : Influence de la puberté sur l'activité cholinestérasique pour des filles entre 10 et 14 ans.....	30
<b>Tableau 04</b> : Influence de la ménopause sur l'activité cholinestérasique chez des femmes entre 45 et 55 ans.....	30
<b>Tableau 05</b> : Activité de la cholinestérase plasmatique selon les syndromes hépatiques.....	32
<b>Tableau 06</b> : Les principales variantes génétiques de déficit en pseudo cholinestérase.....	33
<b>Tableau 07</b> : Taux de blocage selon le nombre d'adductions au TOF.....	34
<b>Tableau 08</b> : L'effet des contraceptifs oraux sur l'activité cholinestérasique .....	36
<b>Tableau 09</b> : Liste de certains médicaments influençant l'activité cholinestérasique.....	37
<b>Tableau 10</b> : Toxicité des OP selon le X.....	40
<b>Tableau 11</b> : Classification recommandée par l'OMS des pesticides en fonction de leur dangerosité, le nombre et des exemples qui leur sont associés.....	41
<b>Tableau 12</b> : Dénomination, structure et létalité des principaux neurotoxiques organophosphorés.....	43
<b>Tableau 13</b> : Les effets de l'inhibition de l'acétylcholinestérase .....	54
<b>Tableau 14</b> : Le tableau répertoriant les pesticides à base de carbamate et leurs principales utilisations pour chacune des trois catégories structurelles.....	60
<b>Tableau 15</b> : Prélèvements sanguins des cholinestérases.....	65
<b>Tableau 16</b> : Résumé des méthodes examinées.....	85
<b>Tableau 17</b> : Comparaison des différentes méthodes de dosage .....	86
<b>Tableau 18</b> : L'interprétation de l'IMC selon l'OMS.....	97
<b>Tableau 19</b> : Quelques spécifications de système COBAS INTEGRA 400 <sup>plus</sup> .....	105
<b>Tableau 20</b> : Précisions de COBAS INTERGRA 400 <sup>PLUS</sup> .....	109
<b>Tableau 21</b> : Distribution du groupe des hommes selon l'IMC .....	115
<b>Tableau 22</b> : Distribution du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux des selon l'IMC .....	116
<b>Tableau 23</b> : Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique du groupe des hommes.....	117
<b>Tableau 24</b> : Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.....	118

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 25</b> : Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique du groupe des femmes enceintes.....	119
<b>Tableau 26</b> : Résultats de la validation des intervalles de référence sur COBAS INTEGRA 400 <sup>PLUS</sup> fournis par ROCHE.....	125

## LISTE DES GRAPHEs

---

<b>Graphe 01:</b> Répartition du groupe des hommes selon l'âge.....	111
<b>Graphe 02:</b> Répartition du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux selon l'âge.....	112
<b>Graphe 03 :</b> Répartition du groupe des femmes enceintes selon l'âge.....	112
<b>Graphe 04 :</b> Répartition géographique du groupe des hommes.....	113
<b>Graphe 05 :</b> Répartition géographique du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux .....	114
<b>Graphe 06 :</b> Répartition géographique du groupe des femmes enceintes.....	114
<b>Graphe 07 :</b> Distribution du groupe des hommes selon l'IMC.....	115
<b>Graphe 08 :</b> Distribution du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux selon l'IMC.....	116
<b>Graphe 09 :</b> Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des hommes.....	117
<b>Graphe 10 :</b> Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.....	119
<b>Graphe 11 :</b> Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des femmes enceintes.....	120
<b>Graphe 12 :</b> Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour les trois groupes.....	121
<b>Graphe 13 :</b> Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge chez le groupe des hommes.....	121
<b>Graphe 14 :</b> Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge chez le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux....	122
<b>Graphe 15 :</b> Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC chez le groupe des hommes.....	122
<b>Graphe 16 :</b> Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC chez le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.....	123

**INTRODUCTION  
GÉNÉRALE**

# INTRODUCTION

---

La Toxicologie est une discipline qui s'intéresse à l'étude des substances susceptibles de nuire à l'organisme ou aux systèmes biologiques mais aussi à la prédiction du risque et la prise en charge des intoxications.

L'intoxication est un processus dynamique et parfois multifactoriel. Elle relève souvent d'une procédure d'urgence mobilisant le clinicien, le toxicologue et le biologiste dans une démarche d'évaluation des variations qualitatives et/ou quantitatives des constituants des milieux biologiques et/ou des substances exogènes.

Les résultats produits par un laboratoire n'ont de signification que s'ils peuvent être interprétés par comparaison avec une série de valeurs dites « de référence » obtenues sur des individus sélectionnés dans ce but. L'interprétation est une mission aussi essentielle pour le biologiste que celle de produire des valeurs.

L'aide à cette interprétation est l'une des préoccupations majeures des biologistes médicaux, notamment dans le cadre de la phase post-analytique. La présentation des comptes rendus de laboratoire revêt donc une importance toute particulière notamment la mention d'intervalles de référence pour chaque paramètre.

Les intervalles de référence ne peuvent être adaptés systématiquement d'un pays à un autre car les populations concernées ont des caractéristiques nutritionnelles, socio-économiques et environnementales qui distinguent les unes des autres, d'où l'intérêt de la détermination et/ou de la validation des intervalles de référence de chaque paramètre pour chaque population.

Les laboratoires de biologie médicale sont invités par la norme ISO 15189 pour répondre à un ensemble d'exigences en termes de management de la qualité qui est un élément indispensable pour la fiabilité des résultats. Parmi ces exigences, le laboratoire doit fournir sur le compte rendu, un intervalle de référence. Et selon les recommandations de l'IFCC-LM et CLSI ces intervalles de références sont soit établis soit transférés d'un autre laboratoire après validation.

# INTRODUCTION

---

Afin de garantir une interprétation meilleure et fiable des résultats obtenus au laboratoire de toxicologie dans le cadre de la prise en charge des intoxications, il convient de valider les intervalles de référence de l'activité cholinestérasique fournis pour la population concernée.

## OBJECTIFS

---

L'objectif principale de l'étude est la validation des intervalles de référence de l'activité cholinestérasique au laboratoire de toxicologie du CHU NEDIR MOHAMED par rapport aux intervalles de référence établis par le fournisseur Roche sur COBAS INTEGRA 400<sup>PLUS</sup> et cela chez trois populations : hommes, femmes enceintes âgées de 18 à 41 et les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux âgées de 16 à 39 ans.

L'objectif secondaire est d'étudier la corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge puis avec l'indice de masse corporelle (IMC) chez les hommes et chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux âgées de 16 à 39 ans.

**PARTIE I :**  
**PARTIE THÉORIQUE**

**CHAPITRE I :**  
**ÉTABLISSEMENT ET VALIDATION**  
**DES INTERVALLES DE RÉFÉRENCE**  
**AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE**  
**MÉDICALE**

## 1. Généralités

Le premier concept de la valeur de référence a été proposé par Grasbeck et Saris en 1969 dans l'objectif de mieux décrire les fluctuations des concentrations sanguines de différents paramètres chez des groupes d'individus. L'idée était d'exploiter les données biologiques afin d'interpréter les observations médicales.

Ce concept a remplacé celui des valeurs dites normales qui apparaissait alors comme imparfait car reposant sur l'hypothèse fautive que la distribution de l'ensemble des paramètres biologiques était normale ou gaussienne. Les valeurs normales étaient simplement déterminées à partir de la moyenne et de l'écart-type de la distribution (moyenne  $\pm 2$  écarts-types).

Entre 1980 et 2000, des recommandations internationales ont été publiées par l'IFCC-LM (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) sur la production des intervalles de référence, puis révisées en 2008. Les experts réunis proposaient alors l'utilisation de méthodes statistiques non paramétriques pour déterminer des valeurs de référence car non basées sur l'hypothèse d'une distribution normale.

Ils définissaient une valeur de référence comme étant une valeur observée chez un seul individu dit « de référence » car sélectionné pour son appartenance à la population ciblée, pour un paramètre donné et à un moment donné. Ils proposaient alors la notion de « limite de référence » définie comme une valeur dérivée à partir de l'ensemble des valeurs de référence obtenues sur chacun des individus de référence (constituant la population de référence ou population ciblée dans ce cas). Cette « limite de référence » est une donnée utilisable à des fins de caractérisation de la population de référence.

Par consensus, les limites de référence correspondent à des bornes inférieures et supérieures de l'intervalle de référence dans lequel se retrouvent 95 % de l'ensemble des valeurs de référence, à savoir les percentiles (P) 2,5 et 97,5. [1, 3, 8, 9, 10,58]

### 1.1. Terminologie

Les définitions qui suivent ont été approuvées par la Fédération Internationale de Chimie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC-LM), l'International Council for Standardization in Haematology (ICSH) ainsi que par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), puis par le CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute).

**-Valeur observée** : valeur d'un analyte obtenue par observation ou mesure d'un sujet à tester, qui doit être comparée à des valeurs de référence, une distribution de référence, une limite de référence ou un intervalle de référence.

**-Individu de référence** : une personne sélectionnée sur la base de critères bien définis ;

**-Population de référence** : groupe constitué de tous les individus de référence ;

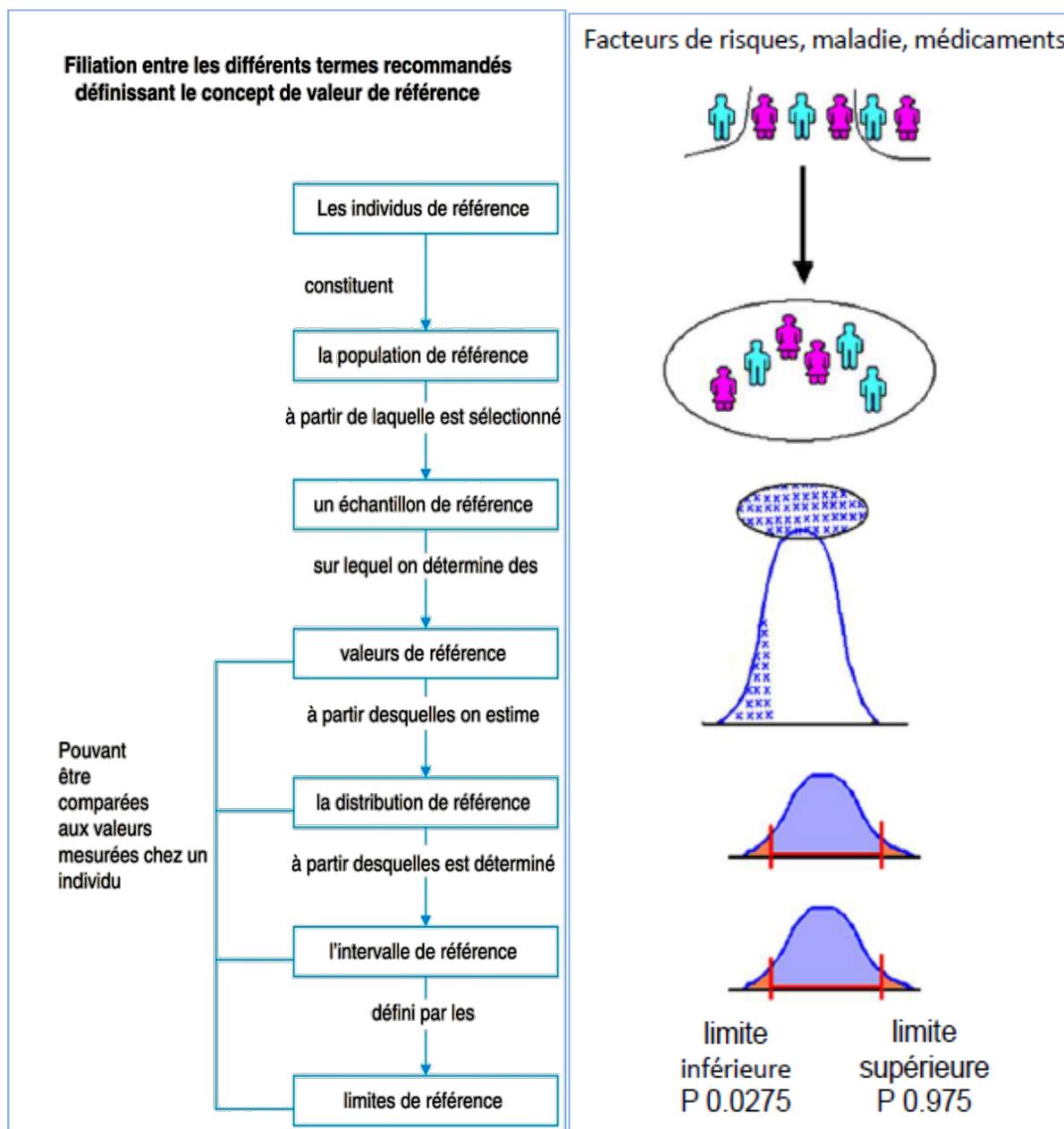
**-Valeurs de référence** : la valeur obtenue par observation ou mesure d'une quantité définie sur un individu de référence ;

**-Distribution de référence**: la distribution des valeurs de référence ;

**-L'intervalle de référence** : c'est l'intervalle entre deux limites de référence (celles-ci incluses) spécifié dans la distribution des valeurs obtenues à partir de populations de sujets sains. Ceci est généralement défini comme un intervalle correspondant à 95% de la population. La détermination de l'intervalle de référence est basée sur des calculs statistiques ;

**-Les limites de référence** : c'est les valeurs qui définissent un intervalle de référence. Dans certains cas, une seule limite de référence peut être utilisée, généralement une limite supérieure. [1, 3]

La relation entre les différents termes employés pour la définition du concept des intervalles de référence est illustrée à la figure 1 au-dessous.



**Figure 01 :** Relations entre les différents termes employés dans la définition du concept de valeurs de référence [7]

**-Entre limites de référence et limite de décision médicale :**

- Les limites de référence sont associées à une population de référence bien définie, généralement constituée de personnes en bonne santé. Elles permettent de comparer une valeur observée aux données de référence obtenues à partir de ce groupe de sujets bien définis. Elles constituent un des éléments contributifs à la prise de décision médicale en tenant compte des spécificités propres à la personne examinée. Les limites de référence sont

descriptives d'un état de santé donné et peuvent, parfois, dans des conditions bien définies servir de limites de décision.

- Les limites de décision médicales sont utilisées par le clinicien comme un seuil en-dessous ou au-dessus duquel une action médicale est recommandée. Alors que les limites de référence sont généralement au nombre de deux, supérieure et inférieure, le nombre de limites de décision est variable suivant l'examen de laboratoire concerné et le contexte clinique.

Dans certains cas, pour quelques paramètres, les limites de référence sont remplacées par des limites de décision établies par un consensus national ou international (ex. : cholestérol total, hémoglobine glyquée...). Pour ces paramètres, il est inutile de déterminer des limites de référence ou de valider celles de la littérature. (Tableau 01) [1]

**Tableau 01** : Comparaison entre limites de référence et limites de décision médicales [07]

	<b>Limites de références</b>	<b>Limites de décision</b>
Définition	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Statistique</li> <li>•Descriptive d'une population spécifique</li> <li>•Généralement en bonne santé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Seuil au-dessus ou en dessous duquel une décision clinique est recommandée (bonnes pratiques)</li> </ul>
Méthodologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Sélection d'individus de référence</li> <li>•Population de référence</li> <li>•Intervalle de référence central : 95% de la distribution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Consensus (national ou international)</li> <li>•Valeurs prédictives</li> </ul>
Nombre de valeurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Généralement deux : limites basse et élevée (associée à IC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Une ou plusieurs, dépendantes du contexte clinique</li> </ul>

## 1.2. Intérêt des intervalles de référence

### 1.2.1. Intérêt dans le diagnostic médical

Les valeurs de référence ont un intérêt diagnostique évident. En effet pour dire qu'un sujet est en bonne santé apparente pour un paramètre biologique donné, il faut comparer la valeur observée de ce paramètre à celle d'un groupe de référence bien homogène après avoir maîtrisé au maximum tous les facteurs de variations. L'établissement des valeurs de référence permet au clinicien:

- De fixer une limite de décision adaptée à chaque cas particulier ;

- De confirmer un diagnostic ;
- De dépister une affection cliniquement silencieuse et d'alerter le patient sur les risques encourus.

### **1.2.2. Intérêt dans le pronostic clinique et le suivi thérapeutique**

La comparaison de population saine et malade pour un paramètre biologique donné ne met pas totalement en lumière la gravité d'une pathologie. Pour dire qu'un sujet est atteint d'un syndrome il faut comparer la valeur mesurée à celle d'un groupe de référence de sujets atteints du même syndrome, afin d'avoir une vision clarifiée du pronostic clinique.

Les valeurs de référence permettent également d'évaluer l'effet thérapeutique, et de surveiller une situation à risque dû à la prise de médicaments.

### **1.2.3. Intérêt épidémiologique**

Les centres de santé doivent définir les intervalles de référence des populations saines mais également celles des groupes pathologiques.

L'étude comparative de populations saines et des populations malades permettra de classer les examens suivant leur pouvoir discriminant en ce sens que les valeurs de référence permettent de définir des priorités pour les examens de santé, d'autre part l'étude de valeurs de référence des populations donne le sens et l'importance des déviations des paramètres biologiques sous l'effet des différents facteurs précédemment décrits.

L'établissement des valeurs de référence est un impératif pour contourner les difficultés d'interprétation des examens de laboratoire. Cependant il est nécessaire de maîtriser tout d'abord les facteurs de variations dues au prélèvement, puis aux techniques d'analyse proprement dites, et enfin ceux liés aux variations intra et interindividuelles afin de ne pas biaiser l'interprétation clinique. [4,13]

## **2. Recommandations des organismes internationaux**

### **2.1. Pour la détermination des intervalles de référence**

La Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) a été proactive dans l'établissement de recommandations pour clarifier la véritable signification du terme intervalle de référence (IR) ; pour sélectionner la population de référence appropriée et analyser statistiquement les données.

La ligne directrice C28-A3 publiée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et l'IFCC est toujours la source de référence la plus largement utilisée dans ce domaine.

## **2.2. Pour le transfert des intervalles de référence**

Les difficultés rencontrées dans l'utilisation de la procédure de base ont été reconnues par les experts de l'IFCC et du CLSI (voir annexe XIII) qui ont indiqué que «les laboratoires individuels devraient s'attacher en priorité à vérifier des intervalles de référence déterminés ailleurs ». [8, 63,64]

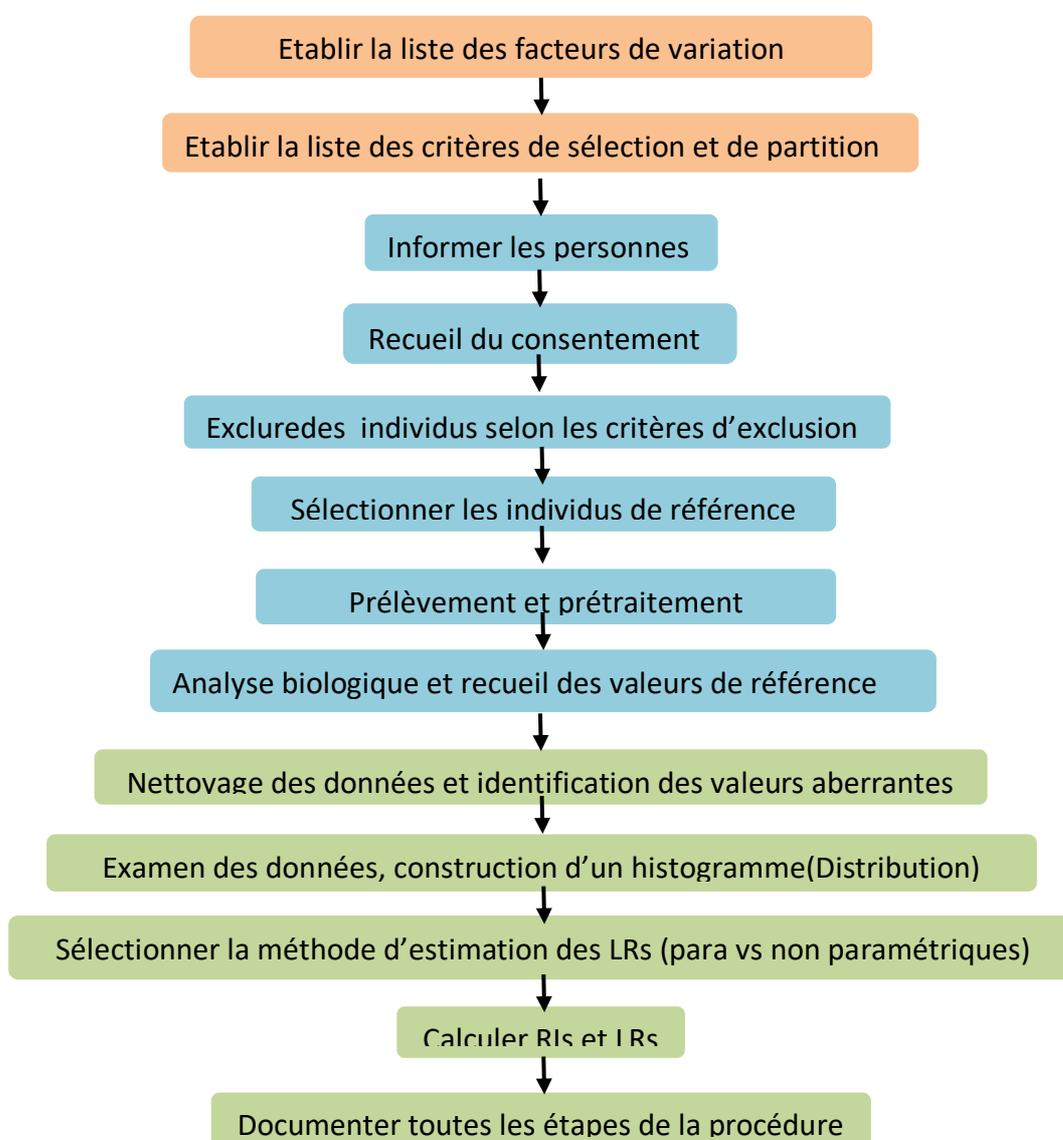
## **3. Protocole de détermination des intervalles de référence**

Pour un nouvel examen ou une nouvelle méthode, en l'absence de données fiables dans la littérature, le laboratoire utilisera le protocole de base pour déterminer l'intervalle de référence. Lorsque les informations sont disponibles, il peut être préférable de valider les intervalles de référence publiés ou fournis.

Le protocole de base comprend une série d'étapes successives décrites en détail dans des documents publiés par l'IFCC et CLSI. En voici un résumé (voir figure 02):

- Énumérer les facteurs de variations biologiques et analytiques (à partir des données de la littérature) ;
- Déterminer les critères d'exclusion et de partition sur la base d'un questionnaire adapté ;
- Faire un formulaire de consentement écrit et le faire signer par les individus sélectionnés ;
- Catégoriser les personnes de référence potentielles sur la base des données du questionnaire et d'autres évaluations des modes de l'état de santé ;
- Exclure les individus de l'échantillon de référence en fonction de critères prédéterminés ;
- Définir le nombre approprié d'individus de référence ;
- Préparer les individus sélectionnés pour la collecte des échantillons selon les procédures normalement utilisées pour les patients en laboratoire ;
- Recueillir et traiter des échantillons ;

- Recueillir des valeurs de référence : analyse des échantillons selon des méthodes bien définies ;
- Vérifiez les valeurs de référence. Établir un histogramme pour évaluer la distribution des données ;
- Identifier les erreurs possibles et/ou les valeurs aberrantes ;
- Analyser les valeurs de référence : sélectionner une méthode statistique et calculer les limites de référence et l'intervalle de référence ;
- Documentez toutes les étapes et procédures suivies. [1, 2,3 ,15]



**Figure 02** : Les étapes de détermination des intervalles de référence [07]

### 3.1. Sélection des individus de référence

La sélection d'un groupe de référence composé d'individus sains conformément à des critères bien définis est la tâche la plus difficile mais essentielle lors de l'établissement des intervalles de référence. La sélection d'un échantillon consiste à choisir des individus de référence aussi comparables que possible aux patients, mis à part leur maladie (donc pour l'âge, le sexe, les conditions de vie, ...).

La définition de l'état de « bonne santé » est particulièrement complexe à établir et suppose qu'une multitude de conditions soient réunies. Dans une première étape, les individus « malades » ou présentant des « facteurs de risques » seront exclus de l'échantillon. Dans une deuxième étape, on divisera l'échantillon de référence en sous-classes représentatives (on se limite, en pratique, le plus fréquemment au sexe et à l'âge).

Les valeurs de référence ne peuvent être adaptées systématiquement d'un pays à l'autre car les populations concernées ont des caractéristiques nutritionnelles, socio-économiques et environnementales qui distinguent les unes des autres. [1, 3, 8, 10, 17,18]

#### 3.1.1. Types d'échantillonnage

##### 3.1.1.1. Technique d'échantillonnage directe (recommandée par le comité IFCC /CLSI)

On distingue deux types de sélection :

**a. Sélection a priori :** lorsque les critères d'exclusion et de partition sont bien définis avant la sélection des individus de référence, ces critères sont basés sur les données de la littérature. Le processus de sélection sera mis en place avant le prélèvement. On résume ci-dessous les principales étapes :

- Déterminer le nombre d'échantillon à prendre en compte ;
- Ensuite procéder à l'étape de sélection selon les critères d'inclusion et d'exclusion ;
- Réalisation du prélèvement dans des conditions bien définies ;
- Effectuer l'analyse des spécimens biologiques recueillies ;
- Traitement des résultats et détermination des intervalles de référence. [1,8]

**b. Sélection a posteriori :** lorsque ces mêmes critères sont appliqués après que le prélèvement ait été fait. On préfère cette dernière méthode pour tout nouvel analyste ou lorsque les données de la littérature sont peu riches en informations pour déterminer les critères de sélection.

- Sélectionner un nombre important de sujets à partir de la population (généralement 1000 sujets) ;
- Un questionnaire devra être au préalable rempli afin de procéder à l'étape de prélèvement ;
- Effectuer ensuite le prélèvement qui est traité et analysé ;
- Et c'est à partir des résultats obtenus, que la sélection de l'échantillon de référence selon les critères d'inclusion et d'exclusion sera faite ;
- Après le traitement statistique des résultats, établir les intervalles de référence. [1,8,11]

### 3.1.1.2. Technique d'échantillonnage indirecte

Dans ce cas on utilise les informations contenues dans une base de données d'un laboratoire ou d'un hôpital. Cette technique peut être employée principalement s'il est trop difficile de recueillir des échantillons de personnes en bonne santé (par ex. : pédiatrie). Ce procédé est relativement simple et peu coûteux.

L'extraction des données est réalisée par des méthodes statistiques sophistiquées, nécessitant le recours à des statisticiens chevronnés. En revanche, des précautions particulières seront prises pour éviter d'inclure des valeurs d'individus « malades » ou « à risques ».

Le comité IFCC/CLSI est très réservé quant à l'usage de cette technique qui peut conduire à une « estimation grossière » des intervalles de référence. [1,11]

### 3.1.2. Facteurs de variations

Les différentes variables mesurées en biologie sont influencées par différentes variations biologiques (inter et intra individuelle), pré-analytique et analytique. Il n'existe pas de liste universelle de ces facteurs de variation. Chaque grandeur biologique peut être influencée par l'un ou l'autre de ces facteurs. [7]

#### a. Variations biologiques

Dans le tableau 2 ci-dessous une liste non exhaustive des facteurs de variations biologiques susceptibles d'influencer les examens de laboratoires.

**Tableau 02** : Facteurs de variations biologiques [07]

Le jeûne	Apesanteur	Exercice physique
Médicaments	Position	Rythme circadien
Age	Café ou caféine	Exposition à la lumière
Ménopause	Cycle menstruel	Rythme hebdomadaire
Nicotine et tabac	Race	Fièvre
Alimentation	Déficiences nutritionnelles	Rythme saisonnier
Obésité	Repas	Grossesse
Alitement	Environnement	Sexe
Poids	Rythme biologiques	Groupe sanguin
		Stress

**b. Variations pré-analytiques**

Concerne la préparation du sujet avant le prélèvement, la collecte et le traitement de l'échantillon (manipulation et conservation). Ces facteurs doivent être contrôlés et maîtrisés afin de minimiser leurs effets [1]

**c. Variations analytiques**

Les intervalles de références sont liés à la méthode de mesure employée. Il convient de la décrire soigneusement et de bien maîtriser les facteurs de variations au cours du temps (notamment la variation de lot-à-lot). [3]

**3.1.3. Les principaux critères de sélection**

Pour déterminer les intervalles de référence en biologie, il faut tout d'abord recueillir un certain nombre d'informations générales sur le sujet.

**a. Critères d'inclusion**

Ce sont les caractéristiques que doivent présenter les sujets pour être inclus dans l'étude et visent à classer les individus de référence en différentes sous-classes. L'âge et le sexe sont les principaux critères de partition.

**b. Critères de non inclusion**

Ce sont les caractéristiques que ne doivent pas présenter les sujets pour être inclus dans l'étude. Si un sujet présente l'un de ces critères, il sera exclu. Les critères d'exclusion visent à

sélectionner des groupes d'individus en bonne santé en éliminant les individus malades ou à risques.

Les recommandations des sociétés savantes imposent d'exclure les sujets prenant régulièrement des médicaments, ceux présentant des facteurs de risque : surcharge pondérale, tabagisme, une consommation excessive d'alcool, les sujets malades ou dans un état physiologique particulier (grossesse, exercice physique important). Cette liste n'est pas limitative, elle dépend des connaissances scientifiques et surtout de la disponibilité de l'information, ce dernier point étant crucial. [1,2]

### **3.2. Traitements statistiques et analyses des données**

Trois méthodes statistiques différentes ont été décrites dans les documents officiels de l'IFCC-LM et du CLSI. Les méthodes présentées ci-dessous ont fait leurs preuves et font l'objet à ce jour d'un consensus international.

#### **a. La méthode paramétrique**

- Applicable à des populations dont la distribution est normale « gaussienne » ;
- En cas de doute sur la nature de la distribution, les tests de normalité permettent de trancher : s'ils sont négatifs, on applique l'une ou l'autre transformation statistique afin de la normaliser ;
- Ensuite on vérifie que la nouvelle distribution suit bien une loi normale ;
- Déterminée entièrement par deux paramètres : la moyenne ( $m$ ) et l'écart-type ( $s$ ) ;
- L'intervalle de référence est exprimé par  $m \pm 1,96$  au risque  $\alpha=5\%$  ;
- Cette méthode est peu utilisée en biologie, les distributions observées étant le plus souvent asymétriques.

#### **b. La méthode non paramétrique**

- N'exige rien des lois de probabilités, elle est toujours applicable ;
- Elle requiert cependant une sélection soignée des individus de référence et un nombre d'individus suffisant ( $\geq 120$ ) ;
- C'est la méthode que recommande actuellement l'IFCC-LM.

#### **c. La méthode robuste**

- Elle a été introduite récemment dans le dernier document de l'IFCC/CLSI ;
- Elle peut rendre des services lorsque le nombre de sujets est limité ;

- Elle ne requiert pas que la distribution soit gaussienne ni un effectif  $> 120$  C'est une méthode proche de la méthode paramétrique, sauf qu'elle mesure la position et la dispersion au lieu de la moyenne et de l'écart-type.

D'autres méthodes statistiques sont décrites dans la littérature et de nouveaux travaux sont publiés chaque année (méthodes paramétriques traditionnelles, technique de boot-strap, etc.), mais elles nécessitent le recours à des statisticiens expérimentés. [1, 8, 12,14]

#### **Nombre minimum de valeurs de référence**

Les méthodes statistiques conventionnelles nécessitent un nombre minimum d'au moins 120 valeurs par classe ou sous classe. En effet, le nombre de valeurs affecte directement la précision du calcul des limites de référence. Il est parfois difficile d'atteindre ce nombre (tests coûteux, pédiatrie, échantillonnage difficile, etc.) et il est recommandé d'utiliser uniquement des méthodes non paramétriques (ou une méthode robuste au lieu de cela).

Le calcul de l'intervalle de confiance pour chaque limite de référence permet de valider le nombre d'individus sélectionnés. Il est généralement admis que l'intervalle de confiance pour chaque limite de référence doit être  $< 0,2$  fois la largeur de l'intervalle de référence concerné. [1]

#### **4. Transférabilité**

Le protocole de l'IFCC pour l'établissement des intervalles de référence est considéré comme le *gold standard*, mais il est inadapté à la pratique courante des laboratoires de biologie médicale parce qu'il est trop lourd et trop complexe à mettre en œuvre. Aussi il paraît peu réaliste que chaque laboratoire détermine ses propres intervalles de référence pour chaque nouveau test, méthode ou système analytique introduit au laboratoire.

La principale difficulté vient de la sélection de la population et de la définition d'un individu en « bonne santé » ; si le recrutement n'est pas correctement fait, les limites de référence calculées peuvent être faussées quelle que soit la méthode statistique employée.

Pour tenter de contourner cette difficulté, il est proposé de procéder seulement à une « vérification » des limites de référence publiées à l'usage des laboratoires. Le transfert de données produites par d'autres laboratoires ou de fabricants du diagnostic *in vitro*, associé à un processus de validation simple pourrait ainsi être d'une grande utilité.

En revanche, il convient de respecter certaines conditions pour que le processus de transfert soit acceptable, notamment une sélection soignée de la population de référence et le respect des conditions pré-analytiques et analytiques. [1,2, 3, 5,7 ,16]

#### 4.1. Premier cas : comparaison de systèmes

Des limites de référence ont été déterminées à partir de la population du laboratoire pour un système analytique donné : si le laboratoire décide de changer de méthode, la transférabilité à l'intérieur du même laboratoire vers un autre couple méthode-instrument se résume à une « comparaison de systèmes analytiques ». Il n'est donc pas nécessaire, dans ce cas, de sélectionner des individus de référence. L'opération se résume à une comparaison de méthodes suivant un protocole reconnu. On calculera l'équation de la droite de régression (pente, ordonnée à l'origine, leur incertitude). On utilisera des sérums frais de patients en veillant à respecter l'étendue du domaine de mesure de la méthode concernée. La fidélité de chaque méthode devra être du même ordre de grandeur, et les étalons similaires.

Deux cas peuvent se présenter :

- Il n'existe pas de différence systématique entre les deux méthodes :
  - La pente de la droite de régression est voisine de 1 ( $\pm x \%$ ) ;
  - L'ordonnée à l'origine (positive ou négative) est faible, inférieure aux critères définis ;
  - L'étendue du domaine de mesure est similaire.

En conséquence, les résultats obtenus avec l'une ou l'autre méthode sont compatibles.

L'intervalle de référence de la méthode antérieure peut être utilisé pour la nouvelle méthode.

- Il existe une différence systématique caractérisée entre les deux méthodes : les données des comparaisons sont homogènes ;
  - La pente de la droite de régression s'écarte de 1 de plus de  $\pm x \%$  ;
  - L'ordonnée à l'origine (positive ou négative) est faible, inférieure aux critères définis ;
  - L'étendue du domaine de mesure est similaire ;

En conséquence, les limites de référence pour la nouvelle méthode peuvent être recalculées en utilisant l'équation de la droite de régression.

La comparaison de systèmes analytiques suppose que :

- Le protocole de comparaison de méthodes est suivi de manière stricte, notamment la répartition uniforme des valeurs sur toute l'étendue du domaine de mesure, au risque de conduire à des calculs statistiques erronés ;
- Si l'ordonnée à l'origine est trop importante, le transfert direct n'est pas recommandé ;
- La régression linéaire n'est pas toujours la meilleure méthode pour comparer deux groupes de valeurs. Par exemple, si l'étendue des valeurs est trop restreinte, l'évaluation du biais entre les moyennes des deux méthodes est certainement mieux adaptée pour recalculer les limites de référence de la nouvelle méthode. [1,2, 3, 5,7]

#### **4.2. Deuxième cas : comparaison de populations analytiques**

Lorsqu'un laboratoire souhaite transférer les intervalles de référence établis par un autre laboratoire (publication, laboratoire voisin ou ayant le même système analytique, groupe d'utilisateurs, etc.) ou par un fabricant de matériel ou de réactifs, la transférabilité de l'intervalle de référence dépasse le cadre strict d'une comparaison de systèmes analytiques, elle devient une question de comparaison de populations de référence. Plusieurs approches sont proposées dans les dernières recommandations de l'IFCC-LM et du CLSI.

- **Méthode subjective**

On vérifie que les éléments essentiels de l'étude originelle sont en cohérence avec les conditions de travail et la population du laboratoire. Les principaux éléments à prendre en compte sont :

- Les critères géographiques et démographiques ;
- Les procédures pré-analytiques ;
- Les performances analytiques ;
- La description de la population de référence et du protocole utilisé ;
- La méthode statistique de détermination de l'intervalle de référence.

Si tel est le cas, l'intervalle de référence de l'étude originelle peut être transféré sans vérification.

La difficulté à disposer de l'ensemble des informations requises reste la principale limite.

- **Vérification de l'intervalle de référence à partir d'un échantillon de sujets apparemment sains**

Si la méthode subjective n'est pas applicable, le laboratoire vérifie l'intervalle de référence communiqué ou publié.

### **Protocole**

- Sélection de 20 individus apparemment sains en tenant compte des critères d'exclusion et de partition requis (sexe, âge, absence de pathologies, prise de médicaments, etc.).
- Détermination des valeurs de référence avec la méthode à tester. On vérifie l'homogénéité du groupe (en éliminant si nécessaire les valeurs aberrantes). Les conditions pré-analytiques et analytiques seront en cohérence entre la méthode testée et celle originelle.
- Les intervalles de références à vérifier sont acceptés si le nombre de résultats en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.
- Une nouvelle sélection de 20 échantillons biologiques est analysée si le nombre de résultats en dehors des limites proposées est égal à 3 : le même protocole que précédemment est appliqué. Dans ces conditions, les intervalles de référence à vérifier sont acceptés si le nombre de résultats de la nouvelle sélection en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.
- Dans le cas où 4 résultats ou plus sont en dehors des limites proposées, il est conseillé de revoir la procédure analytique, d'envisager la présence de possibles différences biologiques et/ou démographiques et de déterminer les intervalles de référence de la méthode utilisée suivant le protocole originel (Figure 3). [1, 2, 3, 5,7]

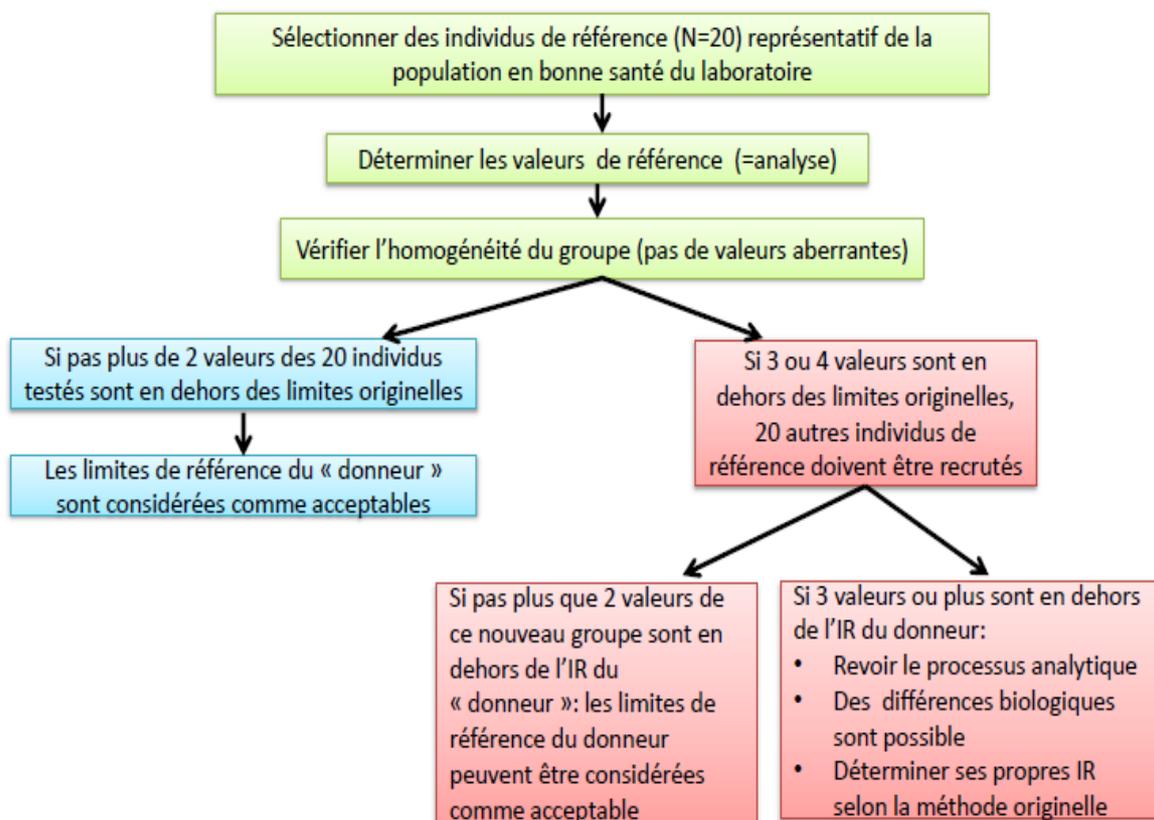


Figure 03 : Protocole de validation des intervalles de référence [07]

**CHAPITRE II :**  
**L'ACTIVITÉ**  
**CHOLINESTÉRASIQUE**

## 1. Les cholinestérases

Les cholinestérases sont des protéines exprimées dans les différents systèmes nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs. Il existe chez l'homme deux cholinestérases différant par leur origine, leur lieu de synthèse, leur structure, leur spécificité d'action, leur fonction physiologique et l'indication de la mesure de leur activité. [28]

### 1.1. Acétylcholinestérase(AChE) ou cholinestérase globulaire

#### 1.1.1. Origine

Elle est synthétisée dans le globule rouge (où son rôle n'est pas connu) et le tissu nerveux. Elle est présente essentiellement au niveau des synapses dans le tissu nerveux et la jonction neuromusculaire, dans la substance grise, les poumons et la rate. Elle est aussi présente de façon anormale dans le liquide amniotique au cours du défaut de fermeture du tube neural [20,28]

#### 1.1.2. Spécificité d'action

Elle a une affinité presque exclusive et spécifique pour son substrat naturel l'acétylcholine (ACH). [20 ,28]

#### 1.1.3. Fonctions physiologiques

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé de la neurotransmission. En hydrolysant le neurotransmetteur cationique acétylcholine (Figure 05), elle permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos, et notamment aux muscles de cesser de se contracter après la transmission de l'influx nerveux.[34]

Les principales fonctions physiologiques de l'acétylcholinestérase sont bien connues. Elle intervient dans le système nerveux périphérique et central et joue ainsi un rôle majeur au niveau de la transmission de l'influx nerveux en éliminant l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur cationique (Figure 4).L'ACh est libéré par le neurone pré-synaptique sous l'effet d'un potentiel d'action et diffuse dans la synapse pour se fixer à un récepteur cholinergique. Le potentiel d'action est ainsi transmis au neurone post synaptique. A ce moment, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh, interrompant la transmission de l'influx nerveux.

Dans le système nerveux périphérique, lorsque l'ACh se lie à l'un de ses récepteurs sur les fibres musculaires notamment, des canaux à calcium s'ouvrent dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. S'ensuit alors une série

d'étapes qui mènent à la contraction musculaire. Dans le système nerveux central, l'acétylcholine intervient notamment dans l'apprentissage et la mémoire à court terme. Au sein du système circulatoire, son rôle physiologique reste encore à élucider. [20,34]

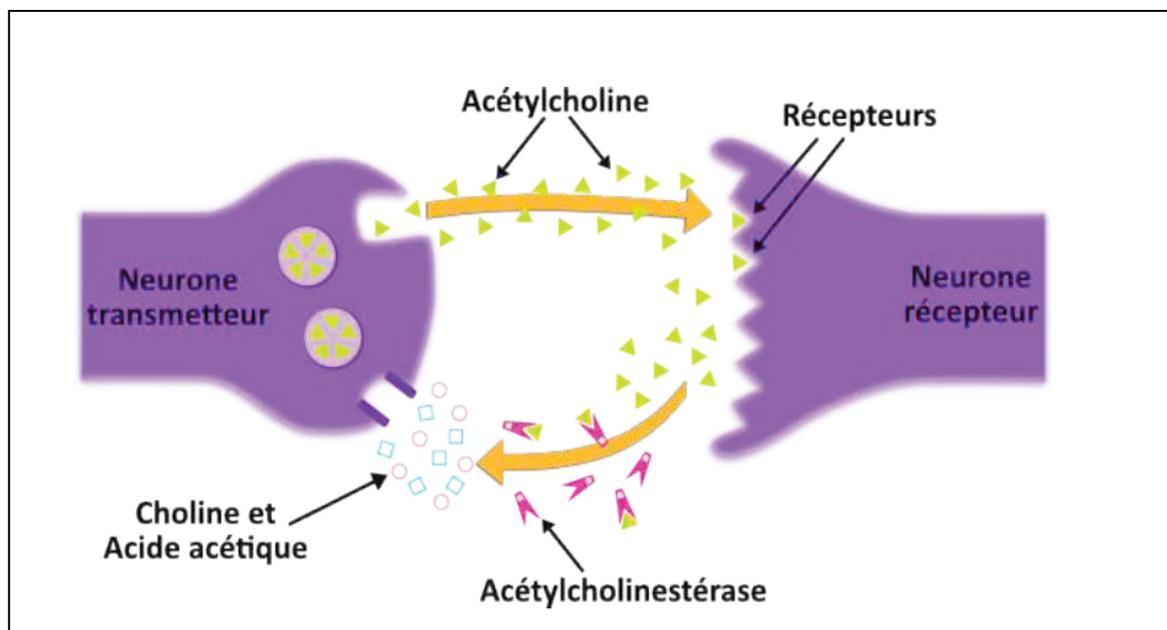


Figure 04 : Rôle de l'AChE au niveau des synapses [34]

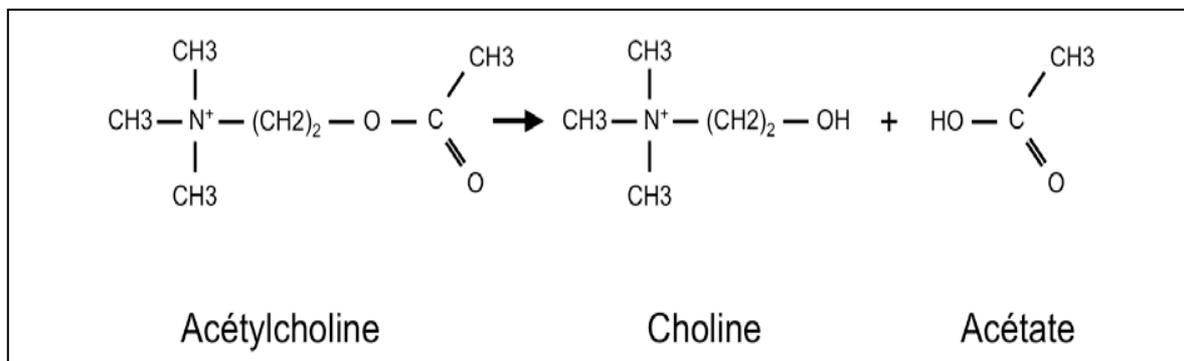


Figure 05 : Réaction d'hydrolyse de l'ACH catalysée par l'AChE [20].

#### 1.1.4. Structure

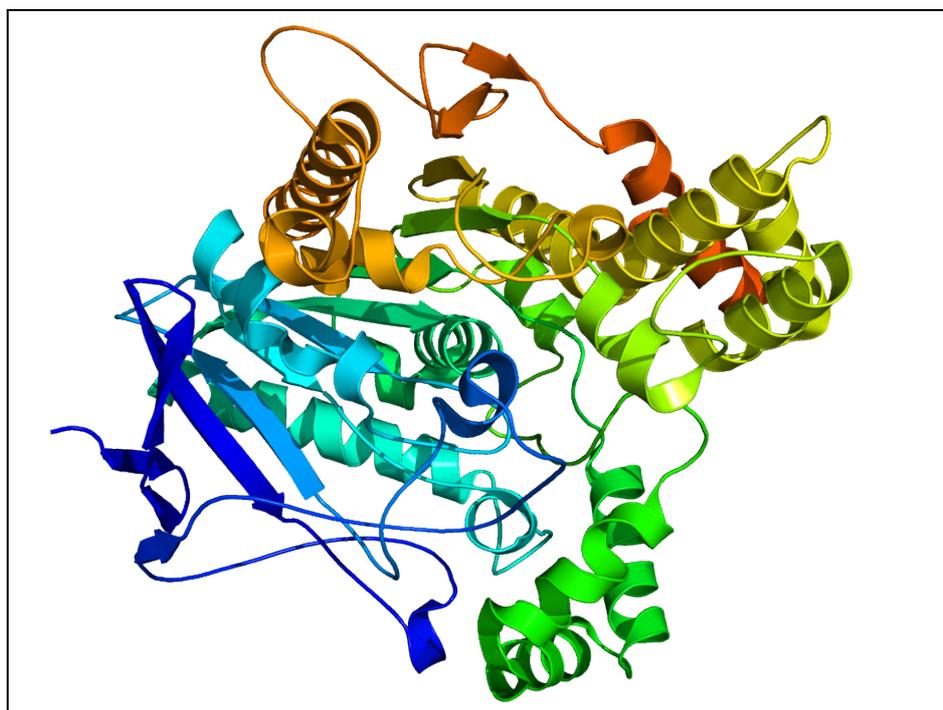
Comme toute protéine, l'AChE possède quatre niveaux de structuration :

- La structure primaire correspond à la succession linéaire des acides aminés constituant la protéine.
- La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale de la protéine (hélice, feuillet...).

- La structure tertiaire ou tridimensionnelle correspond au repliement de la structure secondaire dans l'espace.
- La structure quaternaire des protéines regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non covalentes (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals).

L'AChE de *Torpedo californica* (Raie électrique) a été la première dont la structure primaire a été déterminée. Quelques années plus tard, la structure primaire de l'AChE humaine a aussi été caractérisée. Sussman et al. en 1991 ont été les premiers à caractériser la structure tridimensionnelle de l'AChE de *Torpedo californica*. Les structures primaires des différentes AChE sont très proches : plus de 60% des résidus sont identiques entre l'AChE de *Torpedo californica* et celle de mammifères, et en particulier au niveau du site actif.

L'AChE de mammifères contient 543 résidus. Elle est cristallisée sous une forme homodimérique et constituée de 12 feuillets s'entourant 14 hélices (Figure 06). [34]



**Figure 06** : Représentation schématique de l'acétylcholinestérase. [41]

Le site actif de l'AChE est principalement organisé autour de la triade catalytique constituée des résidus Ser203, His447 et Glu334 (Figure 7). La fonction de ces résidus a été montrée par mutagenèse : si l'on remplace l'un de ces trois résidus par une alanine, une baisse

importante de l'activité de l'enzyme est observée. Cette triade est similaire à celles des sérines hydrolases et protéases, dans lesquelles le glutamate est remplacé par un aspartate. La triade catalytique est au fond d'une étroite gorge de 20 Å de profondeur. Pour que l'hydrolyse ait lieu, il faut donc que l'acétylcholine pénètre d'abord dans cette gorge et se positionne correctement vis-à-vis de la triade catalytique. Des interactions des cations avec les résidus aromatiques qui tapissent la gorge facilitent la pénétration du substrat dans celle-ci.

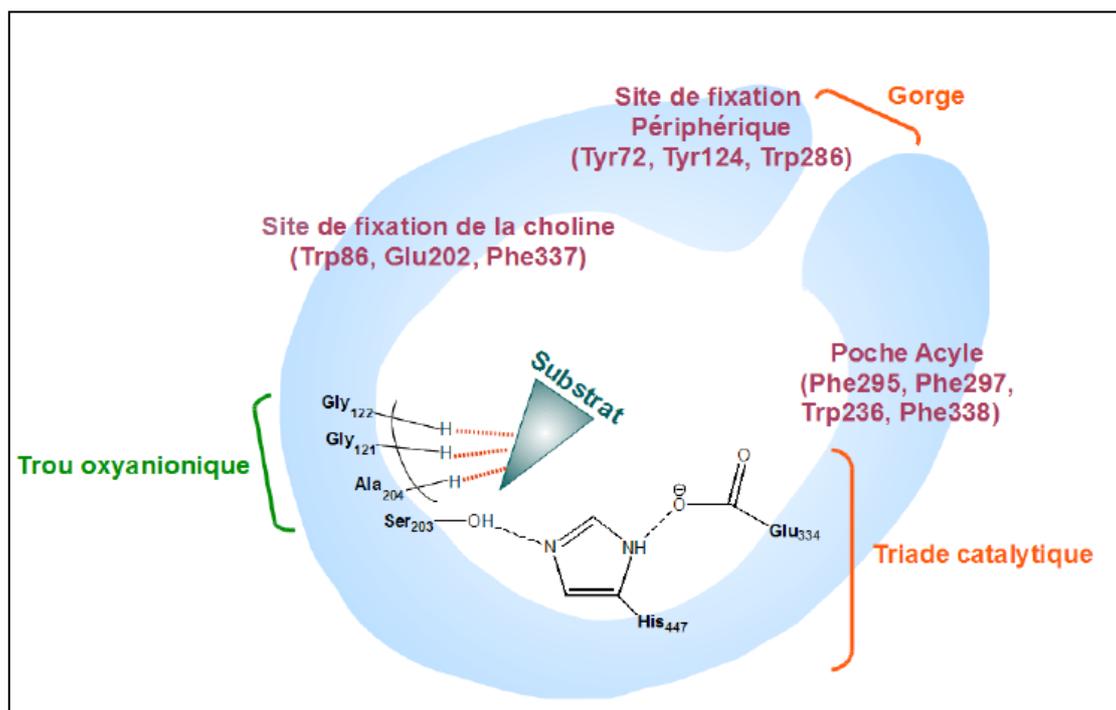
Au-delà de la triade catalytique, trois principales régions peuvent être définies au niveau du site actif (Figure 07) :

– **Le sous-site anionique** : ou site de fixation de la choline est constitué du Trp86, Glu202 et Phe337. Le Trp86 est particulièrement important dans la fixation du substrat puisque l'affinité de l'enzyme pour le substrat est divisée par 1000 lorsque le Trp86 est remplacé par une alanine. Par contre, si l'on remplace le Glu202 par une glutamine, l'activité de l'enzyme ne diminue que d'un facteur 5, ce qui semble montrer que le Glu202 n'a pas de rôle direct dans la catalyse.

– **La poche acyle** : région hydrophobe proche du site actif, permet de stabiliser la partie méthyle du groupe acyle et de délimiter la position du substrat. Elle est constituée des résidus Phe295, Phe297, Trp236, Phe338. Ceux-ci sont responsables de la sélectivité de l'AChE vis-à-vis de l'acétylcholine. En effet, du fait de l'encombrement stérique qu'ils induisent, seuls des groupements acétyl ou propanoyl peuvent venir s'y fixer. Ces résidus servent également à stabiliser l'His447, et participent donc par ce biais à l'efficacité catalytique de l'AChE.

– **Le trou oxyanionique** : composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, est une zone très importante pour la réactivité de l'AChE. Ces résidus établissent des liaisons hydrogènes avec le substrat, et stabilisent fortement l'intermédiaire acyl-enzyme, et la charge négative sur l'oxygène.

Une quatrième région peut également être définie. Il s'agit du site périphérique anionique qui se lie aux substrats cationiques, et notamment aux ligands trop gros pour pénétrer dans la gorge. Ce site est notamment constitué des résidus Tyr72, Tyr124 et Trp286. Il permet au substrat de se fixer avant de glisser vers le site actif où il sera hydrolysé. [21,34]



**Figure 07 :** Représentation schématique du site actif de l'AChE. [34]

## 1.2. Butyrylcholinestérase ou cholinestérase sérique ou pseudo cholinestérase

### 1.2.1. Origine

La butyrylcholinestérase (BChE), encore nommée cholinestérase sérique, plasmatique, ou pseudocholinestérase, est extracellulaire. La forme plasmatique, est synthétisée par le foie. Retrouvée dans la plupart des tissus et organes : cerveau, jonction neuro- musculaire, foie, muscle, pancréas, intestin. Elle existe également sous différentes formes moléculaires, solubles ou ancrées à la surface des cellules. [28]

BChE est présente dans des régions du cerveau dans des positions non liées à l'AChE, notamment dans les cellules endothéliales capillaires, dans les cellules gliales et dans les neurones. La BChE humaine est clairement synthétisée dans le cerveau et ne provient pas du plasma, car des clones d'ADNc ont été découverts dans des banques d'ADNc de cellules du cerveau [65].

### 1.2.2. Spécificité d'action

Elle a une affinité large ; elle peut hydrolyser un grand nombre d'esters synthétiques et naturels, y compris l'acétylcholine et la succinylcholine. [20, 23,28]

### 1.2.3. Fonctions physiologiques

Bien que la BChE soit présente dans différents tissus et suspectée de jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, le développement du système nerveux et des maladies neurodégénératives, voire dans la transmission cholinergique au niveau du système nerveux central, aucune fonction physiologique n'a pu lui être encore attribuée de façon claire. Les individus déficients en BChE (nullizygotés, de phénotype dit « silencieux ») ne développent pas de pathologie particulière, sinon une plus grande sensibilité à certains toxiques.

La BChE joue en effet un rôle important dans le métabolisme de nombreuses substances à action pharmacologique comportant une fonction ester. C'est le cas par exemple de la succinylcholine (myorelaxant), de la cocaïne, et d'autres esters naturels (poisons) ou artificiels (des médicaments anti-Alzheimer) et des prodrogues comme le bambutérol dont l'hydrolyse libère la terbutaline. Les individus dépourvus de BChE ou porteurs de variantes de l'enzyme aux propriétés catalytiques altérées sont exposés à des effets de surdosage car ils éliminent beaucoup moins rapidement ces composés toxiques [22]

Son importance en tant qu'enzyme de désintoxication a de plus en plus d'intérêt. La BChE humaine hautement purifiée peut être administrée sous forme de biopharmaceutique pour protéger l'AChE contre l'empoisonnement par les pesticides OP et agents neurotoxiques de guerre chimique. [22]

BChE est un modèle pour la conception et le développement de biocatalyseurs de détoxification (Bioscavengers catalytiques contre la toxicité de la cocaïne et de l'héroïne et OP). [24]

### 1.2.4. Structure

La BChE a une structure globulaire formée d'un feuillet  $\beta$  entouré d'hélices  $\alpha$ . Elle appartient à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases à sérine. Le résidu acide de la triade catalytique n'est pas un résidu aspartate comme chez les protéases à sérine, mais un glutamate comme chez les AChEs. La triade catalytique (Ser198/His438/ Glu325) est localisée au cœur de la protéine. La sérine catalytique est accessible par une gorge assez profonde. Globalement, la structure de la BChE ressemble à celle des AChE. La principale forme moléculaire circulante de la BChE est un tétramère, chaque monomère possède neuf chaînes glycanes capées par des acides sialiques

En raison de protéolyse partielle, une petite fraction du tétramère est coupée du côté C-terminal, cette coupure entraîne la perte des ponts disulfure et génère des tétramères instables, des dimères et des monomères. [22, 24, 30,34.]

### 1. 3. Mécanisme d'action des cholinestérases

Les sérines hydrolases dont font partie les cholinestérases sont considérées comme des enzymes relativement rapides et efficaces. Toutes les enzymes de cette famille présentent une triade catalytique, impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique ou glutamique qui, quant à lui, sera toujours trouvé dans une poche inaccessible au substrat. Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases, est le suivant :

- Après fixation du substrat dans le site actif, la sérine catalytique, nucléophile, attaque son groupement carbonyle et forme un complexe nommé intermédiaire tétraédrique. En effet des études ont été faites sur plusieurs sérines hydrolases montrent que la sérine catalytique est toujours positionnée idéalement dans le site actif, en vue de permettre cette attaque nucléophile. Le noyau imidazole de l'histidine catalytique, en constante liaison hydrogène avec l'hydroxyle de la sérine catalytique, prend en charge le proton libéré par cette dernière et forme ainsi un ion imidazolium (catalyse basique générale). La protonation de l'histidine catalytique sera maintenue jusqu'à la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique.
- L'intermédiaire tétraédrique se décompose rapidement en un intermédiaire « enzyme acylée » et un groupement partant. Dans le cas de l'AChE, c'est la portion choline (Ch) du substrat ACh qui est libérée après acylation de la sérine catalytique. La force d'entraînement qui mène à la formation de cet intermédiaire est le don d'un proton, par l'histidine catalytique, au groupement partant à la choline.
- L'intermédiaire « enzyme acylée » est enfin dégradé via un processus inverse à celui qui a mené à sa formation ; cette fois-ci, c'est une molécule d'eau, nucléophile, qui attaquera la sérine catalytique, permettant par ailleurs la reprotonation de l'histidine homonyme. Cet événement sera suivi par la libération du produit acétate, dans le cas de l'AChE, ou d'un autre carboxylate, dans le cas plus général des sérines hydrolases.

Loi de suivre une cinétique de type « Michaelis-Menten », l'AChE sera tour à tour activée puis inhibée par son propre substrat, l'ACh, selon qu'elle soit mise en présence de faibles ou d'importantes concentrations en celui-ci, respectivement. L'activation par le

substrat fut initialement observée, puis caractérisée, sur une enzyme structurellement homologue à l'AChE, la butyrylcholinestérase. L'inhibition par le substrat, quant à elle, fut observée pour la première fois sur l'AChE. Jusqu'il y a peu, d'ailleurs, cette différence de comportement cinétique était utilisée, de pair avec leurs spécificités de substrats respectives, pour distinguer les deux enzymes. Cependant, il a été montré que selon les conditions expérimentales et les substrats utilisés, l'AChE et la BChE pouvaient toutes deux être activées et inhibées par leurs substrats, à basse et haute concentrations en ces derniers, respectivement. [34]

## 2. Principaux facteurs influençant l'activité des cholinestérases

La variabilité intra individuelle de la butyrylcholinestérase plasmatique est plus marquée que celle des AChE érythrocytaires. En dehors de toute intoxication, l'activité BChE est soumise à de larges variations physiologiques au cours de la journée, et avec l'âge chez un même individu. Elle diminue chez les femmes sous contraception orale et en cas de grossesse.

Elle augmente avec le poids et la taille des individus. Elle est également soumise à des variations en cas de pathologies. Elle augmente en cas d'élévation du métabolisme de base, d'hyperthyroïdie, d'hémolyse, syndrome néphrotique, diabète. Elle diminue dans les cas suivants : infection, allergie, cancer, dénutrition, collagénose, infarctus du myocarde, brûlures étendues, hépatopathie, atteinte rénale sévère, épilepsie, maladie chronique débilitante et avec certains médicaments : anesthésiques locaux à fonction ester, procaïne en particuliers, fluorures (endoflurane et sevoflurane), lithium, IMAO, chlorpromazine, métoprolol, anti glaucomeux (l'eseridine), antimuscariniques (abédomium, néostigmine ou pyridostigmine), traitements anticholinestérasiques de la maladie d'Alzheimer (Donepezil, Rivastigmine ou Galantamine) ou la radiothérapie.

L'activité BChE présente aussi une importante variabilité interindividuelle. Elle est plus élevée de 10–15 % chez l'homme que chez la femme. Dans la population occidentale 3 à 4 % des personnes présentent une activité BChE basse d'origine génétique. Certains individus sont même totalement dépourvus de BChE sans présenter aucun symptôme.

La variabilité intra-individuelle de l'activité AChE de base peut atteindre 10 %. La variabilité interindividuelle peut être nettement plus importante. L'activité peut être plus élevée dans les thalassémies (par la polyglobulie secondaire) ou en cas de réticulocytose (par augmentation de la production de globules rouges). Elle est toutefois plus stable que celle de la BChE. Les causes de baisse de son activité sont rares, hormis lors de leucémies et de certains autres

cancers, dans l'anémie de Biermer (diminution du nombre de globules rouges) ou après traitements anti malariques. [28]

On cite les principaux facteurs influençant l'activité cholinestérasique :

### 2.1. L'âge et le sexe

L'âge et le sexe représentent une source potentielle de variation de l'activité cholinestérasique.

D'après une étude réalisée sur les facteurs influant la variation biologique de l'activité totale des cholinestérasés dans le plasma dans une population de 3372 sujets en bonne santé apparente au moins pour quatre ans :

- L'activité cholinestérasique n'est pas significativement corrélée avec l'âge chez les hommes, tandis qu'il y a une corrélation significative avec l'âge chez les femmes ;
- Il y a une diminution significativement de l'activité cholinestérasique d'environ 14% de 10-15 à 15-25 ans et atteignant une valeur minimale de 25 à 35 ans ;
- La maturation sexuelle affecte néanmoins l'activité des cholinestérasés chez les femmes, les valeurs de l'activité des cholinestérasés est significativement plus basses d'environ 10% chez les filles âgées de 10 à 14 ans qui avaient leur cycle menstruel que chez les filles du même âge qui n'en avaient pas (Tableau 3);
- À l'âge adulte, entre 35 et 45 ans, il y a aucune variation substantielle des valeurs plasmatiques des cholinestérasés, mais ces valeurs sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes d'environ 18% ;
- Après 45 ans, les valeurs des cholinestérasés augmentent chez les hommes et plus encore chez les femmes. Cette augmentation chez les femmes semble être liée principalement à la ménopause.
- L'activité cholinestérasique chez les femmes ménopausées est plus grande que chez celles non ménopausées d'environ 15% pour la même classe d'âge (45 à 55 ans) (Tableau 04). [46]

**Tableau 03** : Influence de la puberté sur l'activité cholinestérasique (U/L) pour des filles entre 10 et 14 ans [46]

	n	Centiles		
		2,5	50	97,5
<b>POST-puberté</b>	62	3710	6114	9890
<b>PRE-puberté</b>	154	4385	6766	9830

**Tableau 04** : Influence de la ménopause sur l'activité cholinestérasique chez des femmes entre 45 et 55 ans [46]

	n	Centiles		
		2,5	50	97,5
<b>POST-ménopause</b>	76	3890	6800	10 025
<b>PRE-ménopause</b>	136	3080	5854	8600

## 2.2. L'influence du poids corporel

L'influence du poids corporel sur l'activité des cholinestérases a été étudiée dans la même étude que précédemment (âge et le sexe) en utilisant comme index le degré de surcharge pondérale et le pli cutané sous-scapulaire. L'excès du poids a été calculé et exprimée en pourcentage d'écart par rapport au poids idéal.

Dans ces conditions, l'indice de pondération et pli cutané sous-scapulaire sont en corrélation significative avec l'activité des cholinestérases chez l'homme. En revanche, les coefficients de corrélation n'étaient pas significatifs chez les femmes. [46]

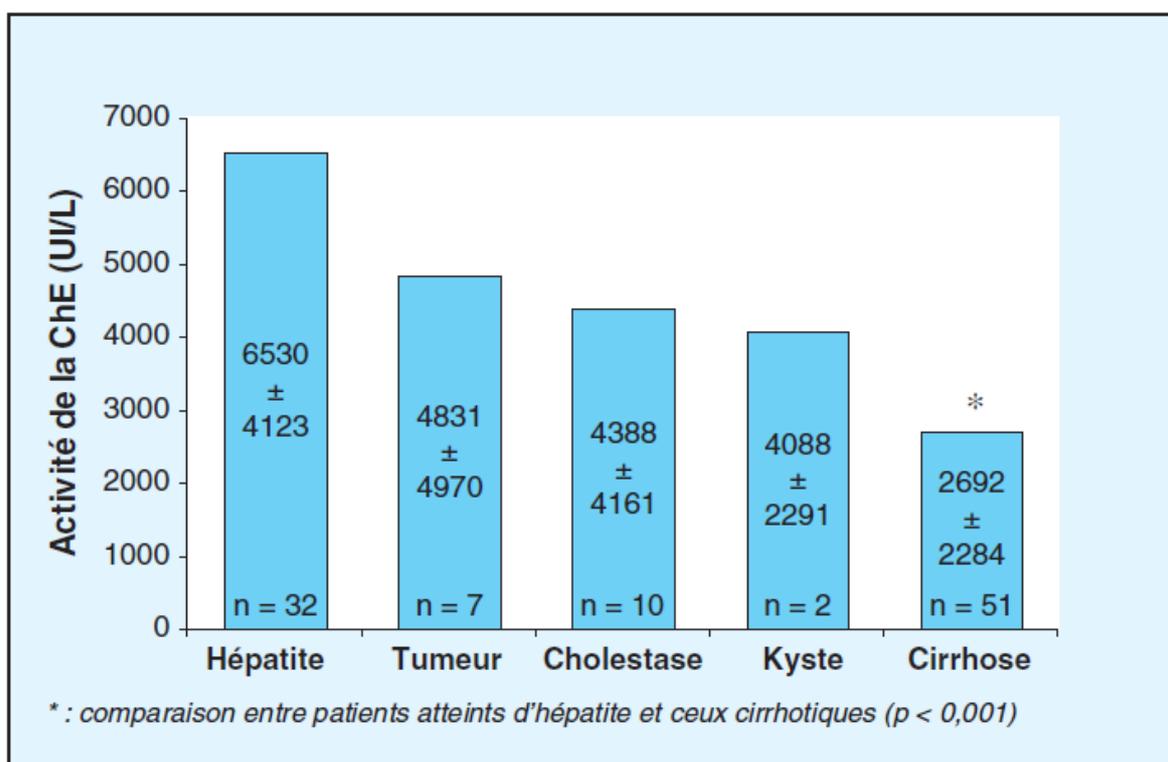
## 2.3. Atteintes hépatiques

Étant donné que c'est la ChE plasmatique (BChE) qui est synthétisée par l'hépatocyte c'est la valeur de cette dernière qui est influencée par les atteintes hépatiques.

En effet d'après une étude réalisée sur l'activité cholinestérasique plasmatique au cours des atteintes hépatiques, l'activité de cette dernière est significativement plus basse chez les patients présentant une atteinte hépatique et elle varie différemment selon le type de l'atteinte. La figure 08 illustre les variations de l'activité cholinestérasique selon le type d'atteinte hépatique. Cette étude a démontré que la BChE est plus basse chez les patients cirrhotiques. La différence n'est significative qu'entre les patients atteints d'hépatite et les cirrhotiques.

L'activité de la BChE varie en fonction des principaux syndromes hépatiques. Elle est

plus basse chez les patients présentant une cholestase ou une insuffisance hépatocellulaire (IHC), mais la différence n'est significative que chez les malades ayant une IHC par rapport à ceux qui ne présentent pas ce syndrome (Tableau 05). [25]



**Figure 08** : Variations de l'activité cholinestérasique en fonction du type de l'atteinte hépatique [25]

Les pathologies hépatiques, tant aiguës que chroniques, sont extrêmement fréquentes. Leur diagnostic, la recherche de leurs étiologies et le suivi des traitements nécessitent un ensemble d'examen biologiques pour les confirmer ou les exclure, incluant notamment les transaminases sériques, la bilirubine et les phosphatases alcalines. Cependant, certains paramètres du bilan hépatique classique peuvent être perturbés dans des situations pathologiques qui n'ont aucune relation avec le fonctionnement du foie. Une alternative est représentée par la mesure de l'activité de la BChE, qui pourrait être intégrée dans le bilan d'exploration hépatique, permettant de mieux mettre en évidence le dysfonctionnement de l'hépatocyte et contribuer ainsi au diagnostic des atteintes du foie[25]

L'étude de corrélation entre l'activité de la BChE avec les autres paramètres biochimiques en fonction du type d'atteinte hépatique, montre que la BChE est inversement corrélée avec la bilirubine totale chez les cirrhotiques ou ceux atteints d'une hépatite. Cependant, elle présente une corrélation positive significative avec l'albuminémie et la

protidémie. Cette corrélation est meilleure avec l'albuminémie. La comparaison de l'activité de la BChE entre les intervalles de valeurs usuelles et de valeurs pathologiques pour les différents paramètres biochimiques a permis de constater que l'activité de cette enzyme est plus basse dans les zones de valeurs pathologiques des différents paramètres étudiés. [25]

**Tableau 05** :Activité cholinestérasique plasmatique selon les syndromes hépatiques. [25]

Type de syndrome	Cytolyse		Cholestase		IHC	
	Absence	Présence	Absence	Présence	Absence	Présence
Nombre	55	47	88	14	79	23
Activité de ChE (UI/L)	3 977 ± 4 278	4 011 ± 3 867	4 122 ± 4 040	2 989 ± 1 496	4 764 ± 3 759	1 997 ± 1 147
p	0,104		0,193		0,001	

#### 2.4. Variantes génétiques

Nombreuses situations physiopathologiques peuvent affecter la synthèse ou l'activité de la butyrylcholinestérase, mais la principale cause du déficit enzymatique en BChE est génétique. En effets, les variabilités génétiques concernent plus la butyrylcholinestérase que l'acétylcholinestérase. [26,27]

Les individus déficients en BChE ne présentent pas d'anomalies métaboliques ou d'effets indésirables sinon une plus grande sensibilité à certains toxiques. En effet, la BChE joue un rôle important dans le métabolisme de nombreuses substances à action pharmacologique comportant une fonction ester. C'est le cas par exemple de la cocaïne, du bambutérol (pro drogue de la terbutaline), de l'acide acétylsalicylique ou encore de la succinylcholine ou du mivacurium (curare). Les individus dépourvus de BChE ou porteurs de variantes de l'enzyme aux propriétés catalytiques altérées sont exposés à des effets de surdosage car ils éliminent beaucoup moins rapidement ces composés toxiques. [27]

La succinylcholine est un curare de courte durée d'action dont la dégradation dépend de son hydrolyse rapide par la butyrylcholinestérase. Ainsi, un déficit en butyrylcholinestérase, congénital ou acquis, est à l'origine d'un bloc neuromusculaire prolongé.

Chez un individu avec une concentration et une fonction normale de la butyrylcholinestérase, 90–95% de la succinylcholine intraveineuse administrée est hydrolysée et inactivée avant qu'elle n'atteigne la jonction neuromusculaire (plaque motrice). Le reste de la succinylcholine agit sur les récepteurs de l'acétylcholine localisés sur le côté post synaptique de la jonction et crée ainsi une dépolarisation prolongée de la musculature squelettique. [26]

La paralysie flasque induite se développe dans la 1ère minute. Chez une personne sans déficit en cholinestérase plasmatique, la curarisation disparaît après environ 5 minutes après

l'injection du succinylcholine. Cependant chez les patients déficients en cholinestérase, la concentration résiduelle d'acétylcholine dans la plaque motrice mène à une paralysie qui peut durer jusqu'à 8 heures.

L'origine d'un déficit en pseudo cholinestérase peut être acquise ou héréditaire. Il est important d'en déterminer l'étiologie dans la perspective d'une intervention ultérieure sous anesthésie générale avec utilisation de succinylcholine. [24,26]

Parmi les cas héréditaires, la forme atypique (A) ou résistante à la dibucaïne, typiquement autosomique récessive et associée au gène butyrylcholinestérase, est localisée sur le bras long du chromosome 3. Quant aux formes variantes, il en existe environ 65. Les formes les plus étudiées sont la résistance au fluor (ou forme «F»), la forme silencieuse (ou «S») et la forme Kallow ou «K». (Tableau 06) [28]

**Tableau 06** : Les principales variantes génétiques de déficit en pseudo cholinestérase [29]

Formes	Fréquence	Activité	Sensibilité	Durée estimée de la paralysie
Type Sauvage (U)	98% de la population normale.	Normale	Réponse normale à la succinylcholine (UU).	Normale: ~5 min
Forme atypique (A)	Homozygote: 1/3000-1/10 000 (0,03-0,01%). Hétérozygote: <1/25 (4%).	Diminuée de 70%	Homozygote (AA): très sensible. Hétérozygote (UA): apnée prolongée occasionnelle.	≥2 h
Résistance au fluor (F)	Homozygote ou hétérozygote (plus fréquente).	Diminuée de 60%	Homozygotes (FF): Modérément sensible.	1-2 h
Silencieuse (S)	Homozygote ou hétérozygote (plus fréquente).	Pas d'activité	Homozygotes (SS): extrêmement sensible.	≥3-4 h
Kalow (K)	Homozygote: 1/65 (1,5%).	Diminuée de 30%	Homozygotes (KK) → modérément sensible.	<1 h

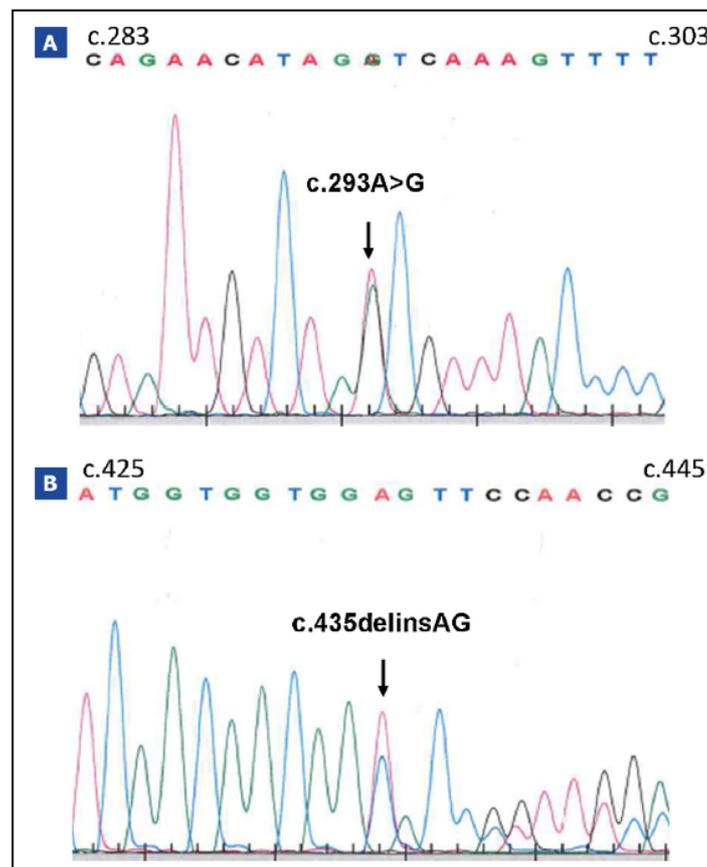
Pour retenir un diagnostic, les symptômes cliniques doivent être confirmés par des examens cliniques appropriés tels que la neurostimulation par TOF (Train of Four), des examens biologiques et génétiques.

Le «train de quatre» (Train of Four en anglais) est une technique de monitoring neuromusculaire préopératoire de la curarisation qui consiste à appliquer une succession de quatre stimulations électriques supra maximales de 2 Hz sur un nerf périphérique, puis apprécier la réponse du muscle ou du groupe musculaire correspondant. En général, le muscle choisi pour l'enregistrement est l'adducteur de pouce. Le nombre d'abductions reflète le niveau de paralysie (Tableau 07). [29]

**Tableau 07** : Taux de blocage selon le nombre d'adductions au TOF. [29]

Nombre d'adduction	Blocage (%)
4	75
3	80
2	85
1	90
0	100

L'analyse par PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'identifier la localisation de la mutation au niveau de l'ADN et ainsi de définir la forme.(Figure 09)



**Figure 09** : Séquençage de Sanger du gène BCHE : électrophorogrammes révélant la présence (A) de la mutation (c 293A>G, p.Asp70Gly, rs1799807, ou variant atypique) et (B) (c.435de linsAG, p.Phe118Valfs\*12, rs398124632, ou variant Sil-1). [28]

Il existe plusieurs recommandations pour la prise en charge d'un patient avec paralysie prolongée après administration de succinylcholine. La plus importante est la ventilation mécanique jusqu'à ce que les muscles respiratoires reprennent spontanément leur fonction. La transfusion prophylactique de plasma frais congelé (PFC) qui augmente l'activité cholinestérase plasmatique endogène n'est pas recommandée en raison des risques éventuels d'infections. L'administration d'inhibiteurs des cholinestérases (par ex. néostigmine) pour reverser l'apnée liée à la succinylcholine est controversée car l'effet peut être transitoire et potentiellement suivi d'un blocage intensif neuromusculaire. Concernant le pronostic, différentes observations cliniques ont montré une excellente récupération après une ventilation artificielle.

En résumé un réveil prolongé pathologique suite à une curarisation doit faire suspecter un déficit en pseudo cholinestérase. Le bilan complet comprend un examen clinique, notamment le TOF (Train of Four), des examens biologiques et des tests génétiques. Sur le plan de la prise en charge, le patient doit être ventilé mécaniquement avec surveillance aux soins intensifs jusqu'à la reprise d'une ventilation spontanée. La communication du diagnostic au patient ainsi qu'au médecin traitant est primordial afin d'éviter un problème d'extubation lors d'une prochaine anesthésie générale. [29]

## 2.5. Grossesse et prise de contraceptifs oraux

- **Grossesse**

Les effets de la grossesse sur les composantes protéiques du sérum sanguin sont complexes et non facilement compris. Certaines protéines sont connues pour l'augmentation de leur concentration tout au long de la gestation en réponse aux changements dans le métabolisme de l'œstrogène, d'autres protéines comme l'albumine voient leur concentration diminuer. La cholinestérase plasmatique est également influencée par la grossesse mais il n'existe pas d'accord général sur les changements intervenus.

Une étude témoigne, qu'une baisse significative de la concentration de la cholinestérase sérique survient chez les femmes enceintes. La chute semble commencer après la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse.

Les raisons possibles de cette chute sont difficiles à évaluer. Les uns suggèrent que ces changements sont principalement dus à l'hémodilution. D'autres considèrent que cette hémodilution n'explique pas entièrement cette diminution s'appuyant d'une part sur des études qui ont montré, qu'il y avait peu ou pas de changement de volume sanguin avant la

10<sup>ème</sup> semaines et d'autre part sur le fait que même avec des valeurs normales de l'hématocrite, l'activité moyenne des cholinestérases est diminuée. [43,44]

- **Prise de contraceptifs oraux**

D'après une étude sur les facteurs influençant la variation biologique de l'activité cholinestérasique totale dans une population de 3372 personnes, l'utilisation des contraceptifs oraux contenant des œstrogènes entraîne une diminution significative de l'activité cholinestérasique (Tableau 08).[46]

**Tableau 08** : L'effet des contraceptifs oraux sur l'activité cholinestérasique .[46]

	Centiles			
	N	2,5	50	97,5
Femmes sous contraceptifs oraux	202	2905	5060	6998
Femmes non sous contraceptifs oraux	481	3401	5667	8597

## 2.6. Inhibiteurs pharmaceutiques

A l'heure actuelle, un bon nombre d'inhibiteurs de l'AChE sont mis en évidence pouvant être classés selon leur origine comme suite :

- Origine naturelle ex : - Les alcaloïdes : Galantamine, Physostigmine, Huperzine A  
- Les flavonoïdes
- Origine Héli synthétique ex : Miotine
- Origine synthétique ex : Donepezil, Rivastigmine, Tacrine

L'administration de certains médicaments est également associée à la modification de l'activité cholinestérasique (Tableau 09). [21]

**Tableau 09** : Liste de certains médicaments influençant l'activité cholinestérasique [21]

<i>Liste des médicaments influençant l'activité cholinestérasique</i>
Bambutérol (β-agoniste de longue durée d'action)
La chlorpromazine (antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 et sérotoninergiques 5HT2A)
Le cyclophosphamide
L'esmolol (β-bloquant cardiosélectif) ;
Les gouttes oculaires contenant de l'echothiophate (inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase utilisé dans le traitement du glaucome),
Les glucocorticoïdes
L'hexafluorenium (antagoniste des récepteurs nicotiques)
Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase
Les inhibiteurs de la monoamine oxydase tels que la phénelzine
Le métoclopramide,
Le pancuronium (curare non dépolarisant)
Les pilules contraceptives
La tétrahydroaminacrine (inhibiteur de la cholinestérase utilisé dans la maladie d'Alzheimer).

## 2.7. Les pesticides

L'utilisation des produits phytosanitaires s'est considérablement accrue depuis la fin de la seconde guerre mondiale du fait du développement de l'industrie chimique et de la nécessité d'augmenter les rendements agricoles.

Cependant les insecticides sont des biocides destinés à détruire les insectes : largement utilisés en agriculture et en santé communautaire (lutte anti vectorielle), ils sont également présents dans l'environnement domestique sous forme de spécialités contre les poux, de médicaments vétérinaires, d'insecticides ménagers, de produits de jardinage ou encore de xyloprotecteurs. Les insecticides sont – et de loin – la famille de produits phytosanitaires la plus souvent responsable d'effets sur la santé. Ce sont en effet des substances puissamment toxiques pour le système nerveux, central et/ou périphérique : inhibition des cholinestérases pour les organophosphorés et les carbamates, action sur le canal sodique pour les pyréthrinoïdes de synthèse, interaction avec le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA) pour le fipronil, blocage des récepteurs nicotiques pour l'imidaclopride. Leur neurotoxicité explique à la fois leur efficacité sur les insectes et leurs effets toxiques chez l'homme.

Des évolutions réglementaires sont à l'origine du retrait de nombreuses substances actives, notamment organophosphorées et carbamates. Classe bénéficiant du meilleur rapport efficacité/toxicité, les pyréthrinoïdes sont les insecticides actuellement le plus souvent

employés dans les formulations à usage agricole et vétérinaire, mais aussi dans les préparations à usage domestique.

L'activité cholinestérasique, un des biomarqueurs d'effets, est de plus en plus utilisée dans les études épidémiologiques pour l'évaluation du risque lié à l'exposition aux insecticides organophosphorés et carbamates. Elle constitue un indicateur fiable et sensible d'exposition [32,37]

**CHAPITRE III :**  
**ACTION DES ORGANOPHOSPHORÉS**  
**ET CARBAMATES SUR L'ACTIVITÉ**  
**CHOLINESTÉRASIQUE**

## 1. Les organophosphorés

Les OP constituent une grande classe de substances chimiques organiques avec plus de 50 000 congénères. En 2007 il y avait plus d'une centaine d'OP vendus sur le marché sous forme de milliers de produits différents dans le monde. Quoiqu'on leur connaisse de multiples usages : insecticides, rodenticides, nématocides, herbicides, gaz de guerre, traitement de la myasthénie gravis et du glaucome chez l'humain, additifs dans certains produits de plastique et de pétrole, aujourd'hui, ces produits sont principalement utilisés comme insecticides sur les plantes, et contre les poux, les mites et la malaria chez les animaux et l'humain.[67]

### 1.1. Structure

Ce sont des esters et amides d'acides (thio) phosphorique ou (thio) phosphonique constitués d'un atome de phosphore pentavalent, lié à quatre substituants : un atome d'oxygène ou de soufre via une double liaison, un groupe partant (X), un groupement alkoxyyle (O-R1) et un autre groupement (R2), selon la structure générale suivante :

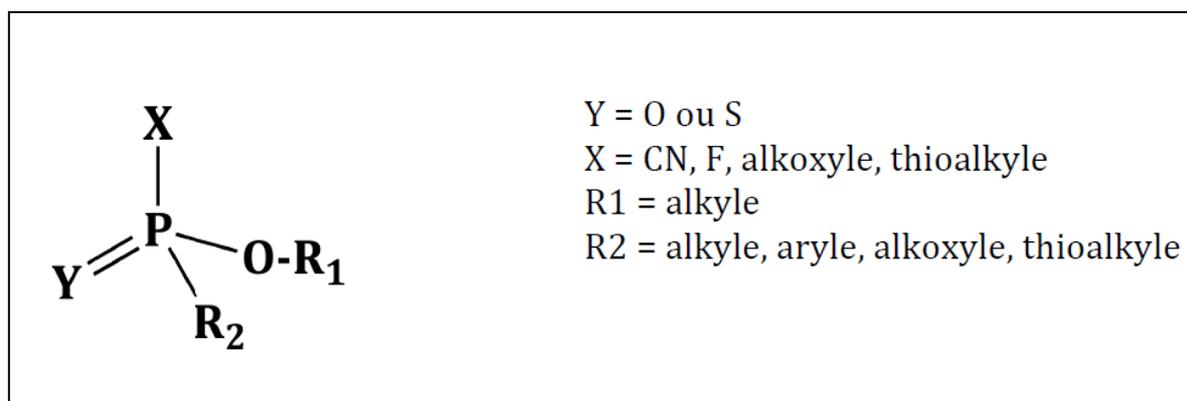


Figure 10 : Structure chimique générale des composés organophosphorés. [62]

### 1.2. Relation structure-activité

- Le mécanisme d'action diffère selon que le Y est un oxygène (O) ou un soufre (S), plus rarement un azote (N) ou un carbone (C), il est soit direct soit indirect. D'une façon générale, les OP possédant la fonction P-O sont des inhibiteurs directs et rapides des enzymes. Les OP contenant la fonction P-S sont des inhibiteurs indirects qui sont métabolisés en leur composé actif P-O comme le parathion (Figure : 11) qui se transforme en paraxon, son métabolite actif; ces produits sont caractérisés par une forte liposolubilité et une grande affinité aux tissus, en particulier au niveau du

système nerveux central. Ces caractéristiques sont à l'origine d'une inactivation prolongée de l'enzyme et par conséquent d'intoxications graves et surtout de complications neurologiques sévères en rapport avec l'anoxie cérébrale, rencontrées surtout avec le parathion et le dichlorvos. [69]

- Une toxicité différente est également observée selon le X, on distingue 4 classes détaillées dans le tableau suivant.

**Tableau 10:** Toxicité des OP selon le X [69]

Groupe	X =	Caractéristiques et Exemple
<i>I</i>	Ammonium quaternaire	Puissant pouvoir toxique et ne sont pas utilisés en agriculture ( <b>Ecothioline</b> )
<i>II</i>	F (Fluor)	Aussi toxiques que classe I + une forte tension de vapeur => ce qui explique leur utilisation comme gaz de combat : ex : sarin Le diméthoate, fenthion utilisés en agriculture => responsable de la majorité des décès
<i>III</i>	OCN, CN, SCN ou halogène autre que F	Toxicité intermédiaire entre les classes II et IV. Certains utilisés comme gaz de combat ( <b>tabun</b> )
<i>IV</i>	Autres substituants	Regroupent la plupart des produits utilisés en agriculture ( <b>Parathion, ..</b> )

- Ils peuvent être également classés selon que le X est une chaîne aliphatique (hautement toxiques et peu stables), un groupement aromatiques (plus stables avec une meilleure rémanence) ou un groupement hétérocycliques. [66]

### 1.3 .Classification

Parmi ces composés Organophosphorés, on retrouve différentes classes, les pesticides, les neurotoxiques de guerre et les médicaments :

**1.3.1. Les pesticides organophosphorés**

En 1854, le chimiste français P. de Clermont décrit, pour la première fois, la synthèse du tetraethyl-pyrophosphate (TEPP), qui deviendra, en 1944, le premier pesticide organophosphoré commercialisé en Allemagne.

Les progrès des pratiques agricoles et des connaissances scientifiques amènent à la découverte du parathion, par le chimiste allemand G.Schrader, également en 1944. Du fait de sa forte toxicité tant pour les animaux que pour les insectes, de nombreux autres pesticides, moins toxiques, verront le jour à partir des années 50. Dans les années 1970, l'interdiction de l'utilisation des pesticides organochlorés à favoriser la diffusion des organophosphorés, plus efficaces mais moins persistants. [37, 41,62].

Employés essentiellement comme insecticides ou acaricides, leur forte toxicité à entrainer leur substitution par les carbamates et les pyréthriinoïdes. Selon la classification publiée en 2010 par l'Organisation Mondiale de la Sante (OMS), presque la moitié des pesticides appartenant aux deux classes les plus dangereuses (Ia et Ib) sont des organophosphorés (Tableau 11)

**Tableau 11:**Classification recommandée par l'OMS des pesticides en fonction de leur dangerosité, le nombre et des exemples qui leur sont associés [64]

Classe		DL <sub>50</sub> (rat) (mg/kg)		OP sur pesticides recensés	Exemple
		oral	cutanée		
Ia	Extrêmement dangereux	< 5	< 50	13 sur 28	Parathion
Ib	Hautement dangereux	5 à 50	50 à 200	23 sur 58	Dichlorvos
II	Moyennement dangereux	50 à 2000	200 à 2000	25 sur 215	Diazinon
III	Faiblement dangereux	> 2000	> 2000	5 sur 104	Malathion
U	Sans danger apparent	> 5000		0 sur 179	

Selon le règlement CE 1107/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, 9 pesticides organophosphorés restent autorisés par l'Union Européenne dont le fenamiphos (classe Ia) et l'ethoprophos (classe Ib).

Malgré la réglementation prise par certains pays, les intoxications, accidentelles ou volontaires, sont fréquentes, particulièrement en Asie, avec une fréquence approchant les 3 millions d'intoxications par an dans le monde entier et une mortalité de l'ordre de 200 000 personnes par an. [62]

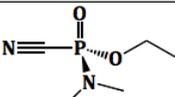
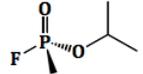
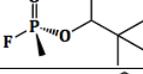
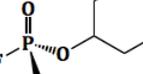
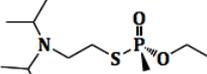
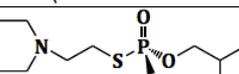
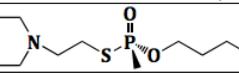
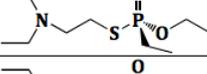
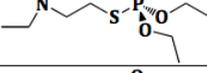
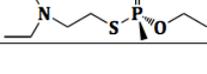
### 1.3.2. Les neurotoxiques de guerre

Issus de la recherche sur les insecticides, c'est dans la deuxième moitié des années 30 que les chimistes allemands ont mis au point la synthèse du **tabun** ou GA (1936), suivi du **sarin** ou GB (1937) puis du **soman** ou GD (1944). Aux agents G pour «German» à suivi la synthèse du **VX** par les Britanniques en 1953 à partir d'un insecticide, le Tetram.

Aujourd'hui, la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques(OPWC),signée le 13 Janvier 1993, vise à interdire la mise au point, la fabrication, le stockage et l'usage des armes chimiques et à détruire les stocks existants. Selon l'Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques, sur 195 Etats, 190 l'ont signée mais 5 ne l'ont pas encore ratifiée. Seuls l'Angola, la Corée du Nord, l'Egypte, la Somalie et la Syrie demeurent en dehors de la Convention. [62]

Le tableau ci-dessous les principaux agents neurotoxique organophosphorés

**Tableau 12:** Dénomination, structure et létalité des principaux neurotoxiques organophosphorés. La DL<sub>50</sub> (Dose Létale 50 %) estime la dose entraînant 50 % de décès après intoxication percutanée chez l'Homme. La LCt<sub>50</sub> estime la létalité après intoxication par inhalation chez l'Homme, en fonction du temps. (n.c: non communiqué) [62]

Agents G	Structure	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	LCt <sub>50</sub> (mg.m <sup>-3</sup> /min)
GA (tabun)		23	100-200
GB (sarin)		28	70-100
GD (soman)		18	70
GF (cyclosarin)		0.35	n.c
Agents V			
VX		0.14	30-50
VR		n.c	10-50
CVX		n.c	n.c
VE		n.c	n.c
VG (Tétram)		n.c	100-500
VM		n.c	10-50

### 1.3.3. Les médicaments

Des médicaments organophosphorés sont utilisés pour le traitement du glaucome et de la maladie d'Alzheimer :

- L'**echothiophate** (Iodure de Phospholine<sup>®</sup>) et le **diisopropylfluorophosphate** ou **DFP** (Fluostigmine<sup>®</sup>) utilisé dans le traitement du glaucome ;
- **Métrifonate**, initialement employé comme antihelminthique, et qui apparaissait comme un candidat intéressant des études de phase I et de phase II avait été réalisée en vue d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché du metrifonate comme traitement de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, des dysfonctionnements neuromusculaires et des paralysies respiratoires ont été constatés sur des patients lors des essais cliniques. La compagnie

pharmaceutique Bayer à retiré sa demande d'AMM et le développement du métrifonate comme traitement de la maladie d'Alzheimer a été arrêté.

Comme tous les composés organophosphorés, les médicaments organophosphorés agissent en tant qu'inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase cette irréversibilité entraîne des effets secondaires plus ou moins incommodes. [62]

#### 1.4. Propriétés physico-chimiques

Il apparaît que les organophosphorés présentent des caractéristiques physico-chimiques dans l'ensemble assez proches, avec quelques spécificités :

- De masses moléculaires élevée (220 à 368 g/mol), ils sont plus ou moins stables selon la nature du groupe X et de la présence d'un atome de soufre : aromatiques et composés sulfurés sont plus rémanents.
  - Leur grande solubilité dans l'eau induit l'hypothèse de leur présence dans ce milieu, d'autant plus que la rémanence globalement faible des organophosphorés oblige à plusieurs applications, dont la majeure part n'atteint même pas la plante.
  - Le coefficient de sorption au carbone organique est peu élevé, ce qui traduit une faible affinité pour les sols riches en matière organique, et une faible rémanence dans les sols (35 jours pour le chlorpyrifos, selon les conditions plus ou moins aérobiques).
  - Leur pression de vapeur est relativement faible, ce qui implique une faible volatilité ; le chlorpyrifos, le dichlorvos et le fenthion sont toutefois à considérer au vu des résultats plus élevés. Cette volatilité fait prendre en compte le milieu aérien comme milieu possible d'exposition.
  - Enfin, les organophosphorés sont très lipophiles, plus ou moins selon les substances. Cette caractéristique en fait une source de contamination des organismes vivants, par accumulation dans les graisses. Certains composés en particulier peuvent être stockés en partie dans les graisses, c'est le cas du diazinon, du fénitrothion et du parathion.
  - Le milieu alimentaire est un milieu probable d'exposition de la population générale.
- [66]

### **1.5. Usages**

En 1996, la consommation européenne était estimée à 5000 tonnes/an, dont 1200 tonnes/an en France. Aujourd'hui, les OP sont beaucoup moins utilisés qu'auparavant avec des usages très restreints, en particulier en ce qui concerne les usages agricoles.

Au niveau mondial, on leur connaît de multiples usages :

- Insecticides, rodenticides, nématocides, herbicides ;
- Traitement direct sur l'humain (cas des glaucomes) ;
- Additifs dans certains produits de plastique et de pétrole ;
- Les OP sont principalement utilisées aujourd'hui comme insecticides sur les plantes, les animaux et les humains (contre les poux, les mites et la malaria dans les pays de forte endémie) ;
- Ils sont utilisés en agriculture, horticulture et entretien paysager, autant dans le milieu industriel que dans le milieu domestique ;
- Le milieu industriel se prête essentiellement à la désinsectisation des surfaces agricoles, en traitement de sol et de parties aériennes des végétaux, ainsi que des locaux agricoles ;
- En milieu domestique, les OP se retrouvent principalement dans les jardins personnels, en traitement de la maison, et dans les colliers antipuces et tiques des animaux domestiques. [66]

### **1.6. Sources d'expositions**

#### **1.6.1. Exposition environnementale**

Il existe une exposition de la population générale aux OP, essentiellement par le biais des résidus alimentaires : les teneurs maximales en résidus sont fixées réglementairement, par composé et par type de culture. Il n'y a pas d'indication que cette exposition ait un retentissement sanitaire. La désinsectisation des locaux représente également une source potentielle de contamination. [37]

#### **1.6.2. Exposition professionnelle**

Les intoxications accidentelles survenant lors de la synthèse des OP sont exceptionnelles. Car leur synthèse se fait en milieu clos avec des personnels protégés. Cependant le conditionnement, le stockage, le transport peuvent être à l'origine de

contaminations accidentelles, par voie cutanée, digestive ou respiratoire. La contamination par voie transcutanée semble être la plus répandue, le risque toxique potentiel par inhalation étant moins important que par voie transdermique. La dilution avec des solvants et des émulsifiants réduit la pression de vapeur et minimise le risque inhalatoire, mais en revanche facilite l'absorption cutanée. Les employés manipulant des OP nécessitent une surveillance médicale, une éducation sanitaire spécifique et une surveillance régulière de leur taux de cholinestérases sériques. Il existerait en effet une baisse significative de l'activité cholinestérasique plasmatique, indicateur d'exposition plus sensible que l'activité cholinestérasique intra-érythrocytaire, chez les sujets ainsi exposés. [39]

### 1.6.3. Exposition domestique

La population générale est exposée de façon accidentelle durant l'utilisation domestique ou le jardinage que ce soit par inhalation ou par voie percutanée. Ces accidents surviennent essentiellement de juin à septembre période durant laquelle les conditions climatiques représentent un facteur favorisant par la sudation, facteur de pénétration cutanée et par le manque de protection en raison de la chaleur. L'ingestion accidentelle est plus rare, on la rencontre essentiellement chez les enfants. En revanche, l'incidence des intoxications volontaires par ingestion n'est pas négligeable, en particulier dans les pays en voie de développement. L'épandage est un mode d'intoxication fréquent, les particules aéroportées après épandage étant retrouvées à plus de 1 à 2 km du lieu de l'épandage. [39]

### 1.6.4. Exposition militaire

Les agents G, aisément entraînés par le vent et détruits sans difficulté par hydrolyse, sont des toxiques non persistants. Les agents V ont une faible volatilité et une plus grande résistance à l'hydrolyse, ce qui en fait des toxiques persistants. La contamination du sol, de la végétation et du matériel crée un danger de contact qui peut persister à long terme [39].

## 1.7. Toxicocinétique

### a. Absorption

Dépend de plusieurs facteurs : type de formulation, technique de préparation, modalités d'application. La pénétration dans l'organisme des OP est possible par toutes les voies : digestive, respiratoire, conjonctivale et percutanée. En milieu professionnel, la peau représente la voie de contamination prédominante : plus que les mains ou les avant-bras, la

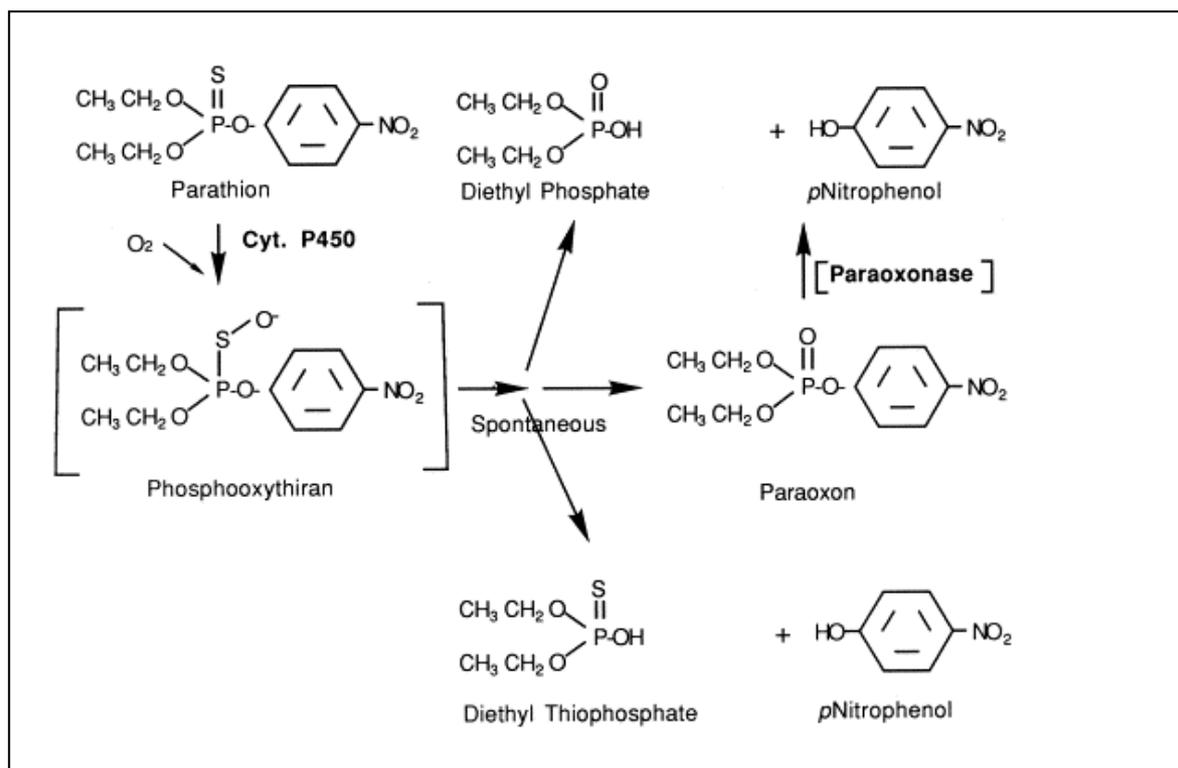
tête, le cou et les plis représentent les sites privilégiés d'absorption. Chez le volontaire sain, la pénétration percutanée apparaît relativement modeste : 6 % de la quantité déposée sur les téguments dans le cas du malathion, 4,3 % pour le chlorpyrifos, 3 à 4 % seulement dans le cas du diazinon. En situation de travail, l'absorption transcutanée est vraisemblablement bien supérieure, favorisée par la sudation, d'éventuelles excoriations de la peau, ainsi que par les solvants organiques et les adjuvants huileux des formulations liquides. La voie respiratoire ne concerne que les dérivés volatils, le dichlorvos surtout, plus accessoirement le chlorpyrifos et le pyrimiphos-méthyl ; elle n'est pas quantifiée. L'absorption par voie orale est rapide et importante, portant sur 70 à 100 % de la dose ingérée. [35,37]

#### **b. Distribution**

Les OP se distribuent dans tous les tissus ; ils traversent facilement la barrière hémato-méningée. Les composés les plus liposolubles comme le Diazinon, le Fénitrothion ou le Parathion font l'objet d'un stockage dans les graisses, à l'origine de phénomènes de redistribution expliquant des symptômes retardés et des évolutions prolongées. [37]

#### **c. Métabolisme**

Les thiophosphates (-P = S) doivent subir une activation métabolique par les cytochromes *P*-450 hépatiques en oxons (-P = O) pour devenir anticholinestérasiques : ainsi, le chlorpyrifos est biotransformé en Chlorpyrifosoxon, le malathion en Malaoxon, le parathion en Paraoxon(Figure11), la Phosalone en Oxophosalone. Molécules-mères et métabolites actifs sont ensuite rapidement hydrolysés, avec formation d'alkylphosphates et de divers dérivés hydrosolubles qui sont conjugués (acide glucuronique, sulfate, glycine) [37,40]



**Figure 11:** Voies de bio-transformation du Parathion. [40]

#### d. Elimination

Les dérivées hydrosolubles sont éliminés dans les urines, et, à un moindre degré, dans les selles : *p*-nitrocrésol pour le fénitrothion, *p*-nitrophénol pour le parathion, etc. Il n'y a pas d'accumulation significative : pour la majorité des composés, plus de 80 % de la dose absorbée est éliminée dans les 48 heures, du moins lors d'expositions faibles ou modérées. Certains composés ont cependant une demi-vie un peu plus longue : c'est le cas du chlorpyrifos, pour lequel la  $T_{1/2}$  est de 41 heures. Lors d'une ingestion massive, au contraire, les métabolites peuvent être détectés dans les urines pendant plusieurs semaines, vraisemblablement du fait d'un relargage de l'OP à partir du tissu adipeux. [37,40]

#### 1.8. Mécanisme d'action toxique

Les OP sont des toxiques létaux, à action systémique prédominante, dont le mécanisme principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine (ACH) au niveau de la synapse cholinergique par inhibition irréversible des cholinestérases (en se liant à leur site esterasique). L'enzyme, ne pouvant plus être hydrolysée, subit alors un phénomène de « vieillissement » (Figure 15) et devient non fonctionnelle et non réactivable après 24 à 48h.

Cette inhibition provoque l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine au niveau de la synapse, provoquant une sur-stimulation cholinergique et ainsi une paralysie du système nerveux entraînant la mort. Une fois l'enzyme a subit le phénomène de vieillissement, seule la synthèse de nouvelles cholinestérases peut permettre le retour à une activité fonctionnelle normale. Cependant, l'enzyme peut être réactivée par l'action d'oximes (dont le méthylsulfate de pralidoxime) avant que la liaison ne soit définitive et ainsi contrebalançant le phénomène de vieillissement. [39,41, 45]

#### **a. Activation**

Après absorption, de nombreux OP doivent être activés par des oxydases, des hydrolases et des transférases au niveau hépatique avant d'être toxiques pour l'homme, la connaissance de ces mécanismes permettant de déterminer le délai d'apparition des manifestations toxiques. Par exemple, les phosphorothioates sont sans effet avant d'être activés en phosphrodithioates par oxydation de leur liaison  $P=S$ , et leurs effets cliniques seront toujours d'apparition plus tardive que les phosphates qui ont toujours une liaison  $P=O$ . [39]

#### **b. Action sur la synapse cholinergique : inhibition des cholinestérases**

Les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases que ce soient les acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou les pseudos cholinestérases plasmatiques. Même si une faible quantité franchit la barrière hémato encéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité cholinestérasique.

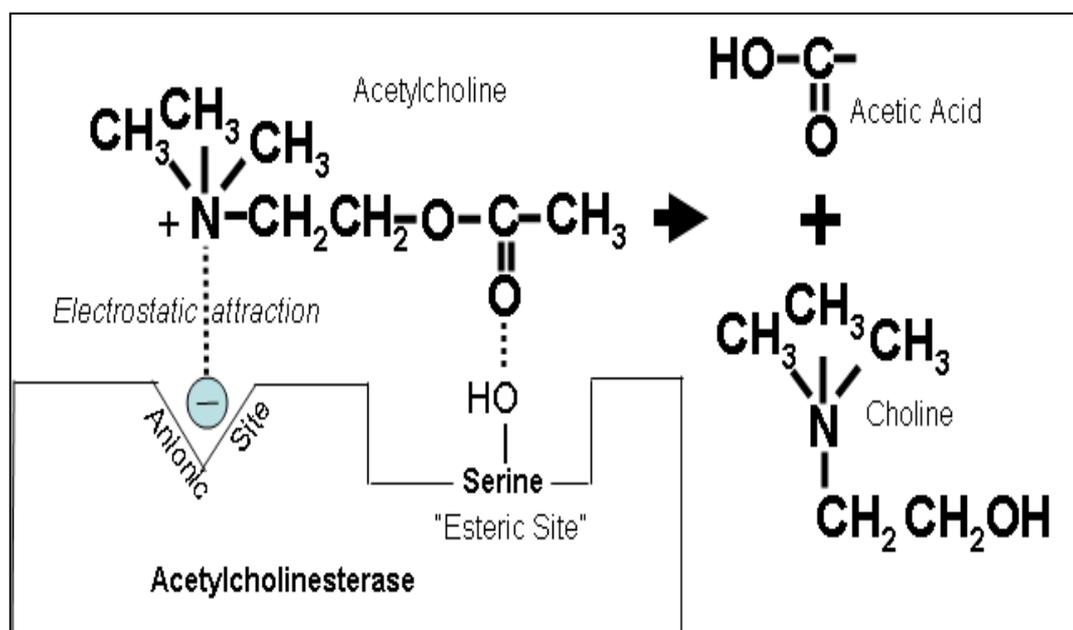
Il s'agit d'une véritable lésion biochimique puisque les OP viennent occuper le site estérasique de l'enzyme en la phosphorylant, s'opposant ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. Soixante-quinze grammes d'acétylcholine sont normalement hydrolysables en une heure par 1 mg d'enzyme. La déphosphorylation de l'enzyme inhibée par l'OP est très lente et varie selon la structure de l'OP, mais peut être accélérée par un réactivateur des cholinestérases (oxime) qui fait partie du traitement actuel de l'intoxication.

Dans un deuxième temps, la phosphorylation devient irréversible par désalkylation, c'est le phénomène vieillissement de l'enzyme (Aging) qui d'une part n'est plus fonctionnelle et qui d'autre part, n'est pas réactivable. Dans ce cas, c'est la synthèse de nouvelles cholinestérases

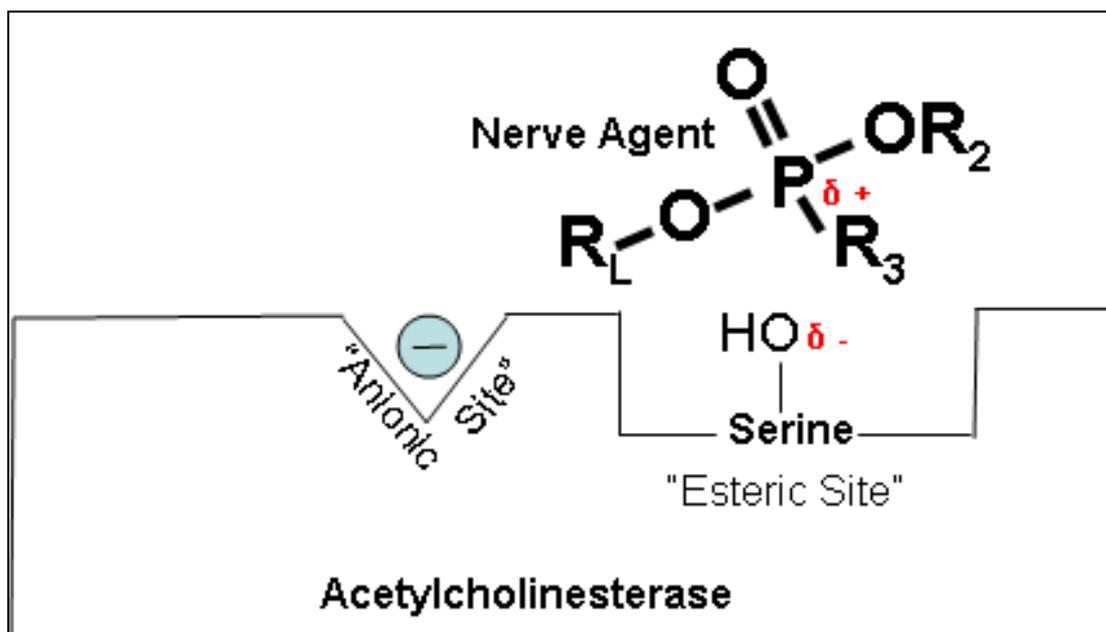
qui permettra le retour à une activité fonctionnelle normale. Cette difficulté, voire impossibilité de réactivation des cholinestérases différencie les intoxications par OP de celles par les carbamates au cours desquelles les cholinestérases sont spontanément et rapidement réactivées. Dans certains cas, le blocage va concerner le site anionique de l'enzyme ou l'ensemble de la structure quaternaire par blocage simultané des deux sites comme c'est le cas pour les agents V.

Dans le cas du Soman, la déphosphorylation par les oximes du site estérasique est incomplète et ne concerne que le groupement alcoyle du toxique, le groupement phosphoré restant fixé à l'enzyme. Aucune oxime conventionnelle ne s'avérant efficace pour le Soman, une équipe de Fribourg a synthétisé d'autres oximes dont l'efficacité *in vitro* ne s'est malheureusement pas confirmée sur le muscle humain. La prémédication par le méthylsulfate de pyridostigmine, parasymphaticomimétique inhibiteur réversible des cholinestérases n'entraînant pas d'altération de l'enzyme, les rend inaccessibles aux NOP. Cette prémédication est donc une sauvegarde de l'intégrité structurale de l'enzyme qui, ainsi, ne peut plus être définitivement détériorée par des NOP comme le Soman ou le VX. [39]

### A l'état normal

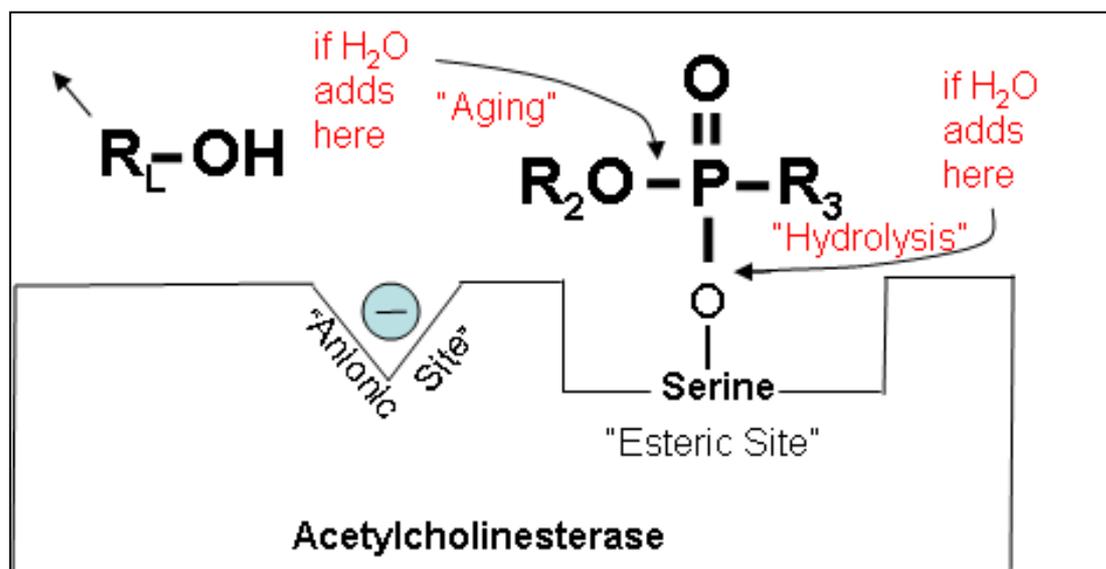


**Figure 12 :** L'hydrolyse de l'acétylcholine à l'état normal. L'azote chargé positivement dans la molécule d'acétylcholine est attiré vers le site anionique de l'acétylcholinestérase, et l'hydrolyse est catalysée au site estérasique pour former de la choline et de l'acide acétique.

En cas d'intoxication par les pesticides organophosphorés

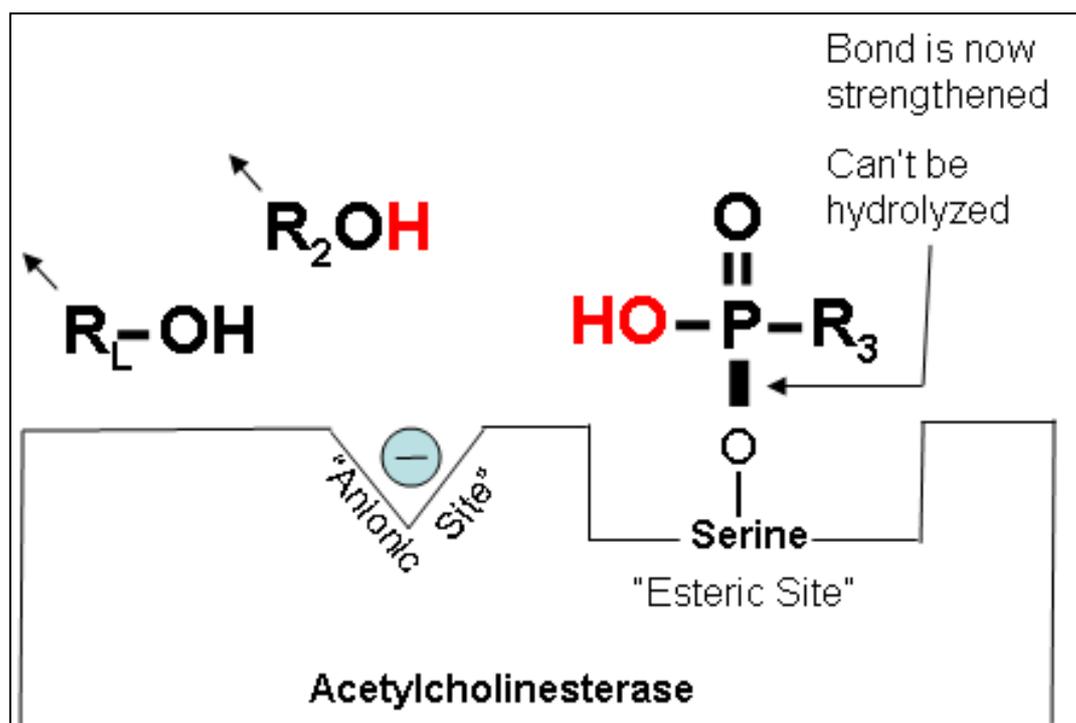
**Figure 13:** Fixation d'un OP sur l'acétylcholinestérase. L'inhibiteur des cholinestérases (OP) se fixe sur le groupe hydroxyle de la sérine de l'acétylcholinestérase. Cela empêche l'acétylcholine d'interagir avec l'enzyme cholinestérase et par conséquent d'être dégradée.

[40]



**Figure 14 :** Le blocage des cholinestérases par les OP. La cholinestérase est bloqué, mais elle peut : S'hydrolyser et retourner à l'état d'origine (processus lent). Se régénérer en présence d'une oxime (rapide). Demeure impossible de régénérer (phénomène d'"Aging" Figure 13).

[40]



**Figure 15 :** Phénomène d'Aging. Après addition d'une molécule d'eau à la liaison P-R3. Le groupe R2 éloigne les électrons de "P". Lors de son élimination au cours du processus d'Aging, ces électrons sont partagés avec "O" – Serine, renforçant sa liaison, de sorte qu'il ne peut plus être hydrolysé. [40]

### c. Mécanismes d'action associés

- **Effets sur d'autres systèmes enzymatiques**

Certains OP peuvent phosphoryler une protéine du système nerveux central, la Neuropathy Target Esterase (NTE) encore dénommée estérase neurotoxique en raison de ses propriétés neurotoxiques. Cette enzyme se retrouve également dans les leucocytes et les plaquettes. [39]

- **Atteinte cérébrale et NOP**

Il semble que les mécanismes d'action des NOP sur le système nerveux central ne se limitent pas à l'inhibition de l'acétylcholinestérase centrale. En effet, celle-ci n'est corrélée à l'apparition des différents symptômes que de façon très imparfaite, en particulier en ce qui concerne les convulsions et les lésions cérébrales qui les accompagnent (oedème cellulaire, nécrose neuronale). D'autres systèmes de neurotransmission semblent donc être impliqués dans la genèse des convulsions entraînées par les NOP.

Au niveau du système GABAergique, il existe probablement un déséquilibre entre les systèmes excitateurs (acétylcholine, glutamate) et les systèmes inhibiteurs du GABA, ce qui

explique le déclenchement des crises convulsives, la transmission GABAergique elle-même ne semblant pas altérée.

Au niveau des acides aminés excitateurs, il semble que la libération excitotoxique de glutamate par le *Soman* au niveau des récepteurs canaux de type quisqualate-kainate (QA-KA) et N méthyl-D-aspartate (NMDA) soit la cause du développement et surtout du maintien des crises généralisées, ainsi que de l'apparition des lésions cérébrales post convulsives, par analogie aux lésions d'ischémie ou d'anoxie cérébrale.

L'efficacité anticonvulsivante dans l'intoxication aux NOP de substances inhibitrices compétitives du récepteur canal NMDA, comme la phencyclidine, semble confirmer cette hypothèse et ouvre la voie à de nouvelles modalités thérapeutiques [39].

## 1.9. Symptomatologie

### 1.9.1. Intoxication aiguë

Les dérivés à fonction ammonium quaternaire pénètrent peu dans les cellules ; les signes neurologiques sont moins marqués. Les dérivés amines tertiaires sont liposolubles pénètrent très facilement dans le SNC. La gravité de l'intoxication dépend non seulement du degré d'inhibition de l'enzyme mais également de la vitesse à laquelle elle est inhibée. La mort survient par : Insuffisance respiratoire, insuffisance circulatoire (hypoxie, irrégularité du rythme cardiaque), paralysie de la plaque motrice, et dépression centrale [37,45]

#### a. Syndrome classique ou la crise cholinergique

Comme évoqué ci-dessus, les OP ne constituent pas une classe homogène de par leurs propriétés physiques, chimiques et toxicologiques. Malgré cela, les intoxications aiguës aux OP provoquent un tableau clinique similaire, évoluant classiquement en plusieurs phases et dominé en premier lieu par la crise cholinergique, au cours de laquelle peut survenir à tout moment le décès de la victime.

Elle correspond à une véritable intoxication à l'ACH (neuromédiateur excitateur), qui va, en l'absence d'hydrolyse, aller sur-stimuler le système nerveux autonome (SNA) (par ses récepteurs nicotiniques et muscariniques), les jonctions neuromusculaires et enfin le système nerveux central (SNC) par leurs récepteurs nicotiniques. [45]

Les effets sont résumés dans le tableau 13.

**Tableau 13:** Les effets de l'inhibition de l'acétylcholinestérase. [37]

Système	Récepteurs	Organe ou tissu	Action	Effet clinique
Parasympathique	Muscariniques	Ceil	Contraction de l'iris et du muscle ciliaire	Vision trouble, myosis
		Glandes lacrymales, salivaires et sudoripares Cellules à mucus des voies respiratoires et du tube digestif	Sécrétion Sécrétion	Larmolement, salivation, hypersudation Rhinite, bronchorrhée, œdème pulmonaire, vomissements, diarrhée
Sympathique	Muscariniques	Bronches et tube digestif	Contraction du muscle lisse	Bronchospasme, nausées, crampes et douleurs abdominales
		Anus et vessie Cœur	Relaxation du muscle lisse sphinctérien Dépression du nœud sinusal et augmentation de la période réfractaire au niveau du nœud auriculoventriculaire	Incontinence fécale et urinaire Bradycardie, arythmies, bloc auriculoventriculaire
Jonction neuromusculaire	Nicotiniques	Muscles squelettiques	Contraction	Fasciculations, crampes, paralysies du diaphragme et des muscles respiratoires
		Cœur Ceil	Excitation Relaxation de l'iris	Tachycardie, hypertension Mydriase
Système nerveux central	Nicotiniques	Cerveau	Excitation initialement, puis dépression	Céphalées, malaise, confusion mentale, ataxie, tremblements, coma, convulsions, dépression des centres respiratoires, hypotension!

**b. Syndrome intermédiaire**

En raison du caractère très lipophile de certains organophosphorés les manifestations cliniques peuvent resurgir après plusieurs jours et ce malgré une évolution initiale favorable, voire une guérison apparente. Elle apparaît en général 1 à 4 jours après l'intoxication alors que les symptômes cholinergiques ont disparu. Il se traduit par une atteinte des muscles proximaux des membres fléchisseurs du cou et de certaines paires crâniennes. Il ne réagit ni à l'atropine, ni aux oximes, mais régresse spontanément en 4 à 18 jours. [39,45]

**c. Les neuropathies retardées**

Des neuropathies d'apparition retardée par démyélinisation des nerfs périphériques, peuvent être à l'origine d'une détresse respiratoire retardée ou d'un retard de sevrage ventilatoire. Elles surviennent 1 à 5 semaines après une intoxication. De type sensitivomotrices, elles vont se traduire par des paresthésies et une diminution de la force musculaire progressant de façon ascendante. Leur résolution est très lente, parfois incomplète. Elles doivent être distinguées des polyradiculonévrites type Guillain-Barré de symptomatologie proche. [39]

### 1.9.2. Intoxication chronique

- L'exposition répétée à certains esters OP peut avoir un effet cumulatif : chaque exposition entraîne une augmentation du degré d'inhibition d'ACHE du SN ; quand elle atteint un certain degré, des symptômes similaires à ceux de l'intoxication aiguë apparaissent.
- Cancérogénèse : la plupart des études expérimentales sont négatives, quelques dérivés comme le dichlorvos ont donné des résultats positifs (Groupe 2B depuis 1991), Malathion (2A) en 2015.
- Reproduction : Il n'y a pas de données chez l'Homme. In vivo : certains composés possèdent une toxicité testiculaire avec altération de la spermatogénèse. L'intoxication maternelle aiguë s'accompagne d'une intoxication fœtale. [40]

### 1.10. Diagnostic

La confirmation analytique de l'intoxication repose sur le dosage de l'activité cholinestérasique.

Le dosage de la BChE est réalisé en première intention (Indicateur le plus sensible) le taux normal dépend de la méthode enzymatique utilisée par le laboratoire ; il est soumis à de larges variations selon l'âge, le sexe, le poids et la taille, et surtout le phénotype.

En effet, 3 à 4 % de la population occidentale présente une activité BChE basse : ces sujets n'en sont pas pour autant plus sensibles aux effets toxiques des OP ; ils sont en revanche exposés à un risque d'apnée prolongée par paralysie respiratoire en cas de curarisation par le suxaméthonium et le mivacurium, normalement hydrolysés par la BChE. La grossesse, la prise de contraceptifs oraux, ainsi que certaines pathologies (insuffisance hépatocellulaire, collagénoses, infections chroniques, etc.) sont également susceptibles de diminuer l'activité de la BChE. Synthétisée au niveau du foie, la BChE est régénérée, en 3 à 4 semaines environ.

Le taux à l'admission n'a aucune valeur pronostique : sa corrélation avec les signes cliniques, avec la durée de la ventilation assistée ou encore avec les doses d'atropine qui seront nécessaires est médiocre. En revanche, le dosage est utile pour le suivi de l'intoxication.

Le dosage de l'AChE permet de confirmer celui de la BChE, étant plus spécifique et présente un meilleur reflet du degré d'inhibition de l'AChE du système nerveux. Le taux normal est fonction de la technique utilisée. Le dosage de l'AChE globulaire n'a pas d'intérêt

pour le suivi de l'intoxication : sa régénération est lente, au rythme des globules rouges (1 % par jour, soit environ 3 mois pour la totalité de l'enzyme), elle va donc rester abaissée malgré la guérison clinique. En revanche, l'administration précoce de pralidoxime peut la corriger, voire la normaliser.

L'interprétation des résultats doit être toujours faite par comparaison au taux basal d'un individu.

Le dosage direct de l'OP ou de ses métabolites par méthodes colorimétrique, immunologique, chromatographique ou par fluorescence n'a d'intérêt qu'à titre médico-légal. [37]

### **1.11. Traitement**

La prise en charge de ces intoxications dépendra de la symptomatologie présentée par le patient et donc de la gravité, du mode et des circonstances de la contamination.

#### **1.11.1. Décontamination et évacuation du toxique**

L'une des priorités en cas d'intoxication aiguë grave sera la réalisation d'une décontamination et/ou d'une évacuation du toxique afin de réduire la dose d'OP absorbée et d'éviter la transmission de l'intoxication. Elle sera adaptée au mode et aux circonstances de la contamination.

- Lors d'une contamination par inhalation priorité sera donnée à l'extraction de la victime et de l'entourage de la source toxique tout en veillant à la protection des secouristes.
- En cas d'exposition cutanée, le patient devra être déshabillé et un lavage cutané (par eau savonneuse ou solution d'Eau de Javel à 12° diluée) sera réalisé (le Dakin sera utilisé sur les plaies et muqueuses).
- Dans le cas particulier de l'ingestion, un lavage gastrique serait utile. Il devra être rapide (en raison de la rapidité d'absorption des OP), et réalisé chez un patient stabilisé, conscient ou intubé. [19].

#### **1.11.2. Traitement symptomatique**

L'objectif prioritaire, est d'éviter l'asphyxie par le rétablissement d'une ventilation efficace. Le sulfate de magnésium pourra être utilisé afin de réduire les effets cardiovasculaires dans le cas des intoxications aux OP ayant une activité inhibitrice sur les Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPases pouvant induire des troubles du rythme cardiaque. Les traitements anticonvulsivants seront surtout

nécessaires en cas d'intoxications aux NOP, qui provoquent de façon quasi systématique des crises convulsives répétées du fait de leurs doses souvent très importantes. [38]

### 1.11.3. Traitement spécifique ou antidotique

La bithérapie atropine-pralidoxime, utilisée à posologie et durée adéquate, est à l'heure actuelle la pierre angulaire de la prise en charge des intoxications aiguës graves aux OP.

- **L'atropine** : anti cholinergique et un véritable antidote des intoxications aiguës graves aux organophosphorés. Elle agit directement, par son entrée en compétition avec l'ACH, sur le syndrome muscarinique et le syndrome central engendré par l'intoxication. Cependant, elle n'a aucune action sur le syndrome nicotinique neuromusculaire et l'inhibition des cholinestérases. Les doses d'atropine peuvent être très importantes (des doses de 20 à 80 mg/24h sont parfois nécessaires). Cependant, il n'y a pas à l'heure actuelle de consensus ou de protocole standardisé sur les schémas thérapeutiques à utiliser.

- **La pralidoxime** : sa fonction principale est la réactivation des cholinestérases (inhibées par l'OP). Son efficacité est dépendante de plusieurs facteurs : notamment du type d'OP, du délai d'administration (dans les 36 heures suivant l'intoxication idéalement, avant la survenue du phénomène de vieillissement), mais surtout de la dose administrée qui doit être élevée. En effet, la pralidoxime ne sera efficace qu'utilisée à forte dose et pendant une période durable.

Chez l'adulte : administrer 2 g sur 30 minutes (ou 30 mg/kg), suivi d'une dose d'entretien en continu de 1 g/h pendant 48h. Puis au delà 1 g toutes les 4 h jusqu'à sevrage.

Chez l'enfant : 25-50 mg/kg IV sur 30 minutes puis 10 à 20 mg/kg/h en continu.

[45]

## 2. Les carbamates

Les carbamates sont des produits utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les larves, les insectes, les rongeurs et les champignons, mais aussi dans les ménages et dans les agglomérations urbaines pour lutter contre les moustiques et les vecteurs.

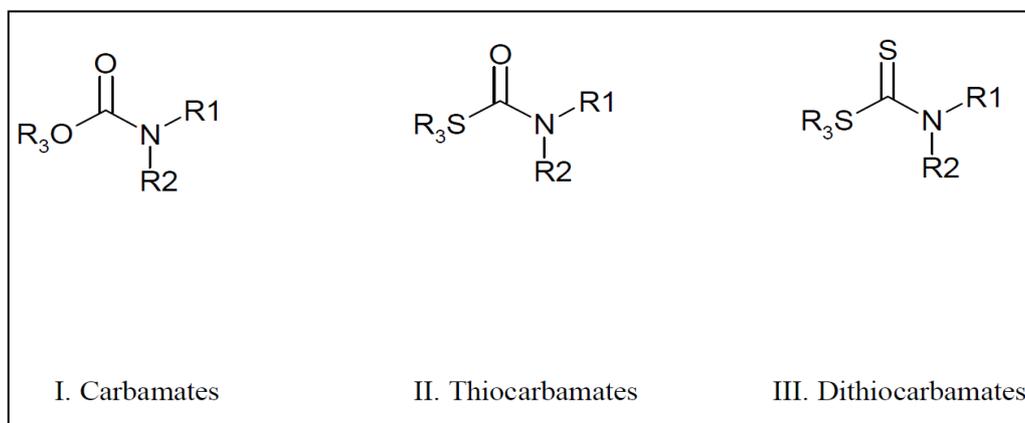
Comparés théoriquement à leurs homologues organophosphorés, les carbamates (CBM) anticholinestérasiques ont des propriétés physico-chimiques, des modalités d'utilisation, une

cinétique et un mode d'action globalement superposables de même que le tableau clinique de l'intoxication aiguë (à part le syndrome intermédiaire et les neuropathies retardées).

Cependant la liaison carbamate-enzyme est spontanément réversible, sans phénomène de « vieillissement » de l'enzyme. Ceci est à l'origine d'une symptomatologie moins sévère qu'avec les organophosphorés et surtout de plus courte durée, de l'ordre de 12 à 24 h, sans toxicité cumulative. De plus, le passage à travers la barrière hémato-méningée est faible, ce qui explique le fait que les cholinestérases cérébrales sont peu affectées et les signes neurologiques centraux sont nettement moins marqué [20,31, 37]

### 2.1. Relation structure/activité et usages

Les pesticides à base de carbamate peuvent être divisés en trois grandes catégories structurales, illustrées par la figure 16, qui diffèrent selon que la liaison en R 3 est une liaison oxygène (I) ou soufre (II, III); et selon que l'atome partageant la double liaison du carbone des carbamates soit un oxygène (I, II) ou un soufre (III). Pour n'importe laquelle de ces catégories, le R 3 peut être un groupe alkyle, un dérivé d'oxime, un groupe aryle ou 3 autres fractions plus complexes.



**Figure 16** : Structure chimique générale des carbamates, thiocarbamates et dithiocarbamates [19]

– **Pour les carbamates (I)**, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> peuvent tous deux être des groupes méthyle (carbamates de méthyle), ou R<sub>1</sub> peut être un atome d'hydrogène et R<sub>2</sub> un groupe méthyle (N-méthyl carbamates). Les pesticides contenant ces 2 substituants sont généralement de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et sont couramment utilisés comme insecticides. Lorsque R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont des groupes plus grands que l'hydrogène ou un groupe méthyle, les carbamates substitués ont généralement une activité anti-cholinestérase minime

ou nulle. Ils sont généralement commercialisés sous forme d'herbicides ou de fongicides, ou pour d'autres utilisations. Le chlorprophame, un herbicide au phénylcarbamate, où R1 est un groupe phényle, appartient à cette catégorie (Figure 17).

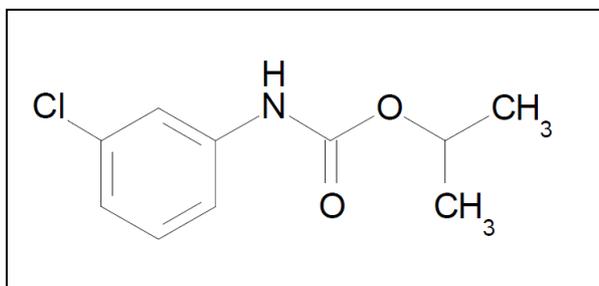


Figure 17 : Structure du Chlorpropharm. [19]

Les pro-carbamates sont une autre sous-catégorie des insecticides à base de carbamate dans lesquels le substituant R1 est un fragment ester d'oxygène ou de soufre et dans lesquels le composé parent est transformé en un carbamate pesticide. Ils sont conçus pour être plus facilement métabolisés en carbamates chez les insectes que chez les mammifères. Le Thiodicarbe est un exemple de pro-carbamate dans lequel l'ester de soufre R1 est un autre carbamate (Figure 18).

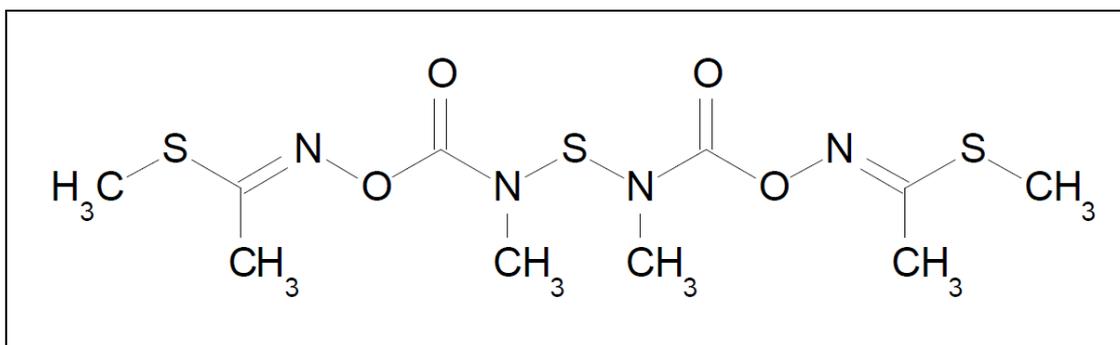


Figure 18 : Structure du Thiodicarb [19]

– **Les thiocarbamates (II)** sont utilisés comme herbicides et ont une puissance moindre (le cas échéant) que les substances du groupe I en tant qu'inhibiteurs de l'AChE. Néanmoins, ils répondent aux exigences structurelles générales pour l'inhibition de l'AChE de cette classe et il a été démontré que certains provoquent l'inhibition de l'AChE chez les animaux à des doses plus élevées. L'effet critique, ou le plus sensible pour ces thiocarbamates et d'autres, peut ne pas être une conséquence de l'inhibition de l'AChE.

– Les **dithiocarbamates (III)** sont généralement utilisés comme fongicides, bien que certains aient d'autres utilisations et qu'ils puissent également contenir des esters R3 qui, en théorie, pourraient inhiber l'AChE. Au moins un d'entre eux, Thiram, s'est avéré le faire, mais encore une fois, à des doses plus élevées que celles induisant d'autres effets critiques préoccupants.[19]

Le tableau suivant répertorie les pesticides à base de carbamates et leurs principales utilisations :

**Tableau 14:**Le tableau répertoriant les pesticides à base de carbamate et leurs principales utilisations pour chacune des trois catégories structurales. A = aphicide ; I = insecticide ; H = herbicide ; F= fongicide ; GR= Régulateur de croissance ; SI = inhibiteur de germination ; WP = préservateur de bois. [19]

<b>Carbamates</b>	<b>Thiocarbamates</b>	<b>Dithiocarbamates</b>
Aldicarb <b>I</b> , Carbaryl <b>I</b> , Methomyl <b>I</b>	Butylate <b>H</b>	Mancozeb <b>F</b>
Trimethacarb <b>I</b> , Thiodicarb <b>I</b>	Cycloate <b>H</b>	Maneb <b>F</b>
Chlorpropham <b>H</b>	EPTC <b>H</b>	Metiram <b>F</b>
Desmidipham <b>H</b>	Molinate <b>H</b>	Zineb <b>F</b>
Propham <b>H</b> , <b>SI</b>	Pebulate <b>H</b>	Metam, Na, K. <b>F, I</b>
Pirimicarb <b>A</b>	Vernolate <b>H</b>	NaDMDTC <b>F, I</b>
Thiophanate <b>F</b>	Diallate <b>H</b>	Thiram <b>F, H, I</b>
Fenoxycarb <b>GR</b>	Triallate <b>H</b>	Ferbam <b>F</b>
IPBC <b>WP</b>	Thiobencarb <b>H</b>	Ziram <b>F</b>

## 2.2. Propriétés physicochimiques

Les carbamates se présentent sous forme de cristaux ou de liquides huileux pratiquement non volatils, lipophiles, peu hydrosolubles mais solubles dans la majorité des solvants organiques. Le pyrimicarbe, modérément volatil, et le formétanate, très soluble dans l'eau, font exception. [37] (voir annexe XII)

## 2.3. Sources d'exposition aux carbamates

### a. Exposition professionnelle

Inhalation de gouttelette par dispersion du produit, contact cutané avec des vêtements souillés en milieu de travail.

**b. Exposition domestique**

L'ingestion accidentelle provoque une intoxication sévère chez l'enfant, d'évolution parfois fatale. Plusieurs « épidémies » d'intoxications par des fruits et légumes contaminés ont été décrites, car ces insecticides sont absorbés par les feuilles, les fruits et les racines des plantes. [37]

**2.4. Toxicocinétique**

Très voisine de celle des OP

**a. Absorption**

- Une absorption digestive rapide et quasi complète (>90%);
- Une bonne pénétration cutanée du fait de leur lipophilie importante ;
- L'absorption respiratoire est accessoire (produits non volatils) compte tenu de la non-volatilité de la plupart des dérivés et de la taille des gouttelettes d'aérosols générées par les pulvérisateurs, arrêtées au niveau des voies aériennes supérieures.

**b. Distribution**

La distribution se fait dans tous les organes et tissus ; les carbamates franchissent le placenta.

**c. Métabolisme**

Ils sont totalement et rapidement métabolisés, en moins de 24 heures, par des réactions d'hydrolyse, d'oxydation (cytochromes *P*-450) et de conjugaison. L'aldicarbe-sulfoxyde, principal métabolite de l'aldicarbe, est plus actif que la molécule mère. À l'exception du thiodicarbe, qui nécessite une activation métabolique, les carbamates sont des inhibiteurs directs des cholinestéras.

**c.Élimination**

Il n'y a pas d'accumulation dans l'organisme ; les métabolites sont éliminés dans les urines [37]

**2.5. Mécanisme d'action toxique**

Les carbamates ne sont pas irritants pour la peau et les muqueuses mais certains de leurs solvants peuvent l'être ; la sensibilisation est très exceptionnelle. Globalement, leur toxicité aiguë est très importante, et même majeure dans le cas de l'aldicarbe, du carbofuran, du formétanate et du méthomyl. Le carbaryl et le fénoxycarbe font exception avec une DL50 par voie orale respectivement élevée et très élevée .Comme les OP, les carbamates inhibent les

différentes cholinestérases de l'organisme : l'AChE, la BChE, et les cholinestérases non spécifiques présentes dans le foie et divers tissus. [36,37]

## **2.6. Symptomatologie**

### **2.6.1. Aigue**

Le tableau clinique de l'intoxication aiguë est très voisin de celui provoqué par les OP : intrication de signes muscariniques, nicotiniques et centraux. La différence majeure réside dans l'hydrolyse spontanée, théoriquement en quelques heures, de la liaison carbamate-ChE, sans phénomène de « vieillissement » de l'enzyme mais avec destruction de l'insecticide (le carbamate reste actif tant que la fonction ester n'est pas hydrolysé), la symptomatologie est donc de courte durée, 12 à 24 heures usuellement, et il n'y a pas de toxicité cumulative. Les carbamates ne sont pas génotoxiques ni repro-toxiques expérimentalement ; les études de cancérogenèse animale sont négatives pour la plupart des dérivés [37]

### **2.6.2. Toxicité chronique**

L'exposition chronique à certains carbamates (méthomyl, carbaryl) provoque des dermatoses (eczéma) et l'utilisation du carbofuran est significativement associée à la prévalence de l'asthme. Il n'y a pas d'étude de mortalité par cancer portant sur des cohortes de travailleurs exposés exclusivement ou majoritairement à des carbamates. [37]

## **2.7. Diagnostic**

### **a. Identification du produit**

L'étude de certains métabolites urinaires peut être utilisée pour le diagnostic des intoxications ou pour l'évaluation de l'importance d'une exposition récente.

### **b. Mesure de l'activité cholinestérasique**

La mesure de l'activité cholinestérasique est un test de confirmation diagnostique utile pour les intoxications (ou l'exposition) aux carbamates.

Cependant, la réversibilité très rapide de l'inhibition des cholinestérases, rend la mise en évidence de cette inhibition beaucoup plus délicate que dans le cas des intoxications par les OP. Ainsi, l'analyse doit être effectuée très rapidement après l'intoxication [31,36]

## **2.8. Traitement des intoxications**

### **2.8.1. Décontamination**

- En cas d'ingestion : LG (si possible dans les 30 minutes). L'administration de charbon activé.
- En cas d'inhalation : Soustraction de la victime du milieu contaminé.
- En cas de projection : Déshabillage du sujet, lavage à l'eau légèrement savonneuse de la peau et des muqueuses souillées.

### **2.8.2. Traitement symptomatique**

Assistance ventilatoire avec oxygénothérapie, aspiration des sécrétions bronchiques, le remplissage vasculaire, la correction des convulsions par administration de diazépam

### **2.8.3. Traitement spécifique**

- Administration intraveineuse de l'Atropine (anti cholinergiques), jusqu'à apparition des signes d'atropinisation (bouche sèche, mydriase, tachycardie...); (Pour la posologie voir organophosphorés)
- L'utilisation des oximes (ex : pralidoxime ou contrathion®), lors des intoxications par carbamates est controversée. [31,37]

**CHAPITRE IV :**  
**DOSAGE DE L'ACTIVITÉ**  
**CHOLINESTÉRASIQUE**

## 1. Dosage de l'activité cholinestérasique

La détermination de l'activité des cholinestérases est devenue un outil important dans la conception et la découverte de médicaments, ainsi en médecine qu'en toxicologie. Il existe un grand nombre de composés capables de moduler l'activité des cholinestérases. Ces composés peuvent être utilisés pour la gestion pharmacologique de divers troubles (par exemple, la maladie d'Alzheimer, la myasthénie grave). De plus, l'intoxication aux organophosphorés est fréquemment diagnostiquée via un dosage de l'activité des cholinestérases. Une grande variété de méthodes a été développée au cours des dernières décennies pour la détermination de l'activité cholinestérasique.

Il existe plusieurs méthodes basées sur les propriétés spécifiques des cholinestérases et leurs interactions avec des substrats naturels ou artificiels, des méthodes manométrique, potentiométrique, titrimétriques, photométrique, fluorométrique et radio-isotopique.

Les méthodes existantes permettent de résoudre la plupart des problèmes rencontrés lors de la détermination de l'activité cholinestérasique. Selon Ellman, la colorimétrie s'est avérée l'approche la plus utile et la plus polyvalente. Elle peut être utilisée dans divers protocoles pour déterminer l'exposition aux pesticides ou aux agents neurotoxiques ou pour mettre au point de nouveaux médicaments. Son amélioration possible réside dans l'optimisation des échantillons riches en hémoglobine. Les progrès des méthodes les plus courantes (y compris Ellman) dépendent de la miniaturisation et des plateformes physiques modernes (par exemple, les fibres optiques, les méthodes utilisant des puces ou les nanotechnologies). [47,50,54, 55, 56,57]

### 1.1. Indication de la mesure de l'activité cholinestérasique

#### 1.1.1. La butyrylcholinestérase

La mesure de l'activité de la butyrylcholinestérase est indiquée dans l'intoxication aiguë ou l'exposition chronique aux produits organophosphorés, l'évaluation d'une insuffisance hépatocellulaire et la recherche d'une anomalie de production qualitative se traduisant par une curarisation prolongée. La mesure de l'activité des butyrylcholinestérases réalisée en urgence garantit une prise en charge spécifique et rapide du patient, afin de réactiver au plus vite les cholinestérases. Même si le niveau de diminution de l'activité des butyrylcholinestérases n'apporte pas de valeur pronostique à l'intoxication, son suivi dans le temps permet de juger de l'efficacité du traitement et de la rémission progressive du patient [33, 27,24]

**1.1.2. L'acétylcholinestérase**

L'AChE est en effet impliquée dans divers problèmes majeurs de santé publique comme la maladie d'Alzheimer, myasthénie, intoxication aux insecticides, aux gaz neurotoxiques, au venin de serpents Mamba ou au curare. La mesure de l'activité des acétylcholinestérases est utile en routine, pour le suivi biologique des personnels exposés de façon chronique à des phytosanitaires organophosphorés. [20]

**1.2. Modalité de prélèvement et préparation des échantillons****Tableau 15 : Prélèvements sanguins des cholinestérases [28]**

Prélèvements sanguins des cholinestérases	
<b>Matériels de prélèvement</b>	
BChE	Tube héparinate de lithium
AChE	Tube EDTA
<b>Précautions</b> Eviter la contamination des échantillons par des OP	Effectuer les prélèvements à distance des locaux contaminés si cela est possible et après nettoyage soigneux de la peau. Le sang veineux doit être préféré au sang capillaire, facilement souillé par une contamination de la peau.
<b>Conservation des spécimens</b>	
BChE	Le transport des tubes au laboratoire peut être réalisé à température ambiante, mais les températures trop élevées peuvent détériorer l'enzyme et son activité. L'activité BChE est stable pendant sept jours si les échantillons sanguins sont réfrigérés (2-8° C), plusieurs semaines après centrifugation et séparation, si le plasma est conserve à 0-5°C, le plasma séparé et congelé (recommandé si l'analyse ne peut être effectuée le jour même). Quelques cycles de congélation-décongélation peuvent être réalisés sans conséquence importante.
AChE	Les échantillons sanguins doivent être traités très rapidement Ils peuvent être réfrigéré a 4° C le plus tôt, puis analysés rapidement ou congelés après dilution très rapidement dans un tampon au 1/100.
<b>Destinataires</b>	Laboratoires expérimentés ayant des contrôles de qualité, utilisant la même technique de dosage, et si possible toujours au même laboratoire.

- En l'absence de contamination de la peau, le port d'équipements de protection spéciaux est inutile pour le préleveur.
- Le concentré globulaire doit être lavé par du sérum salé isotonique plusieurs fois puis hémolysé par choc osmotique. Ces étapes de lavage permettent l'élimination du

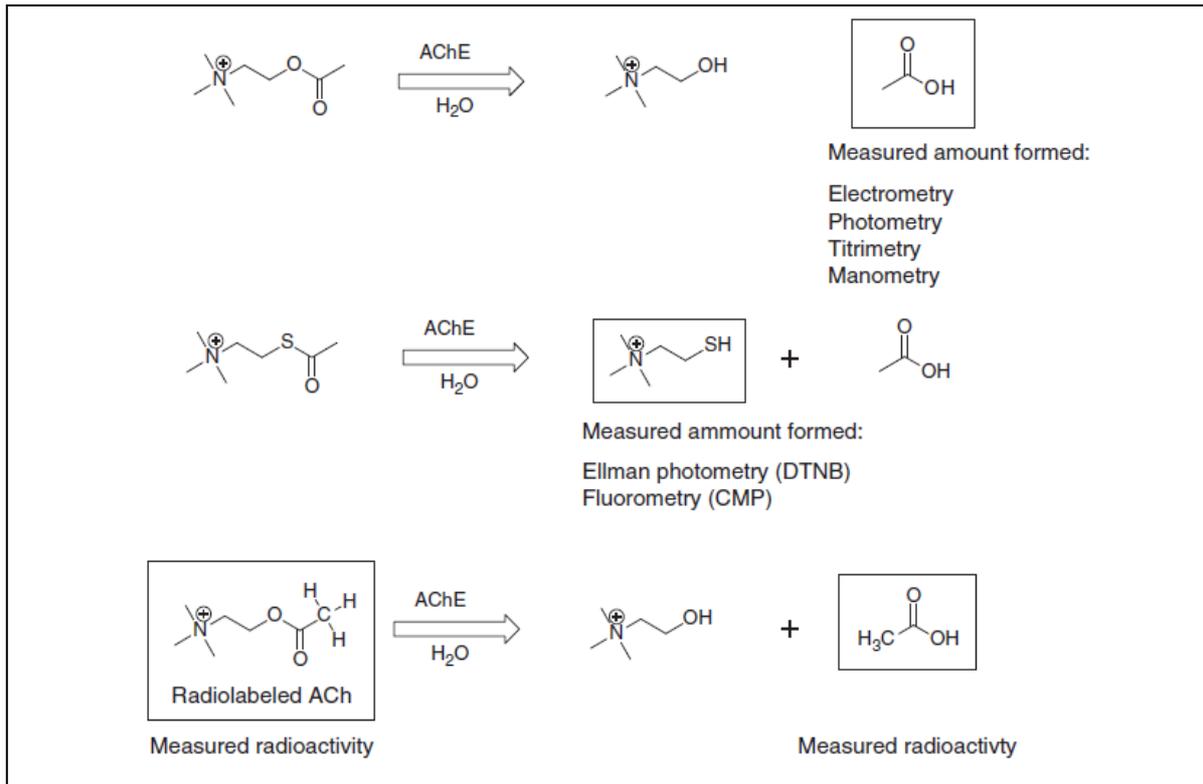
plasma et préviennent donc la détermination concomitante des deux activités ChE. Elles alourdissent les protocoles et s'opposent au traitement automatique expliquant le faible nombre de laboratoires utilisant cette approche. Les appareils du type ChE Check mobile 1 permettent une analyse quasi-immédiate sur sang total et permettent donc de s'affranchir de cette étape si on en dispose.

- Sans réfrigération, la réaction de réactivation peut se poursuivre dans le tube de prélèvement, en cas d'exposition avec un OP et traitement par une oxime. Si l'inhibiteur est un carbamate, la réversibilité de la réaction d'inhibition entrainera une normalisation progressive de l'activité enzymatique au cours du stockage. [28]

### 1.3. La détermination de l'activité cholinestérasique

Les méthodes de dosage des cholinestérasés reposent sur leurs propriétés spécifiques telles que le pouvoir hydrolytique de divers esters. Ainsi, la détermination de l'activité des cholinestérasés repose sur la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine soit par la quantification du produit de décomposition soit du substrat n'ayant pas réagi au cours de la réaction. En général, trois principes peuvent être utilisés lors de la détermination de l'activité cholinestérasique. (Figure 19)

- Le premier principe utilise le substrat naturel - ACh. Lorsque le substrat naturel ACh est hydrolysé, l'activité enzymatique peut être déterminée par une évaluation du  $\Delta\text{pH}$  (détermination de l'acidification par l'acétate libéré).
- Le deuxième principe consiste à utiliser un substrat artificiel - généralement l'acétylthiocholine (ATCh). La thiocholine (TCh), un produit de décomposition du substrat, peut être quantifiée par réaction avec des agents chimiques fournissant une réaction colorée ou par voltampérométrie.
- Le troisième principe utilise également un substrat artificiel, mais le substrat radiomarqué est généralement ACh avec la partie acétyle radiomarquée. Le substrat décomposé ou le substrat n'ayant pas réagi est en outre déterminé par des techniques de scintillation. [56,57]



**Figure 19 :** Les principaux principes des méthodes de détermination de l'activité cholinestérasique [56].

### 1.3.1. Méthodes manométriques

- **Principe général**

Cette méthode permet d'étudier les réactions enzymatiques s'accompagnant d'un dégagement ou d'une absorption de gaz (méthode directe) ou des réactions au cours desquelles se forme un acide capable de déplacer (donc de dégager) le gaz carbonique d'un tampon bicarbonate (méthode indirecte). Dans le cas des cholinestérases le dosage manométrique est basé sur la mesure du dioxyde de carbone libéré à partir d'un tampon hydrogencarbonate. Ce tampon est décomposé par l'acide acétique libéré par l'hydrolyse de l'ACh.

Les premiers tests de détermination de l'activité cholinestérasique utilisaient la méthode manométrique. Lindstrom-Lang et Glick ont introduit la méthode manométrique « Warburg » qui nécessitait une quantité importante d'homogénat de tissu et limitait le choix du milieu au tampon hydrogencarbonate.

Plus tard, Augustinsson et ses collègues ont introduit une modification de la méthode de Warburg. Cette méthode optimisée comprenait un échantillon de sang séché sur du papier

filtre qui pourrait ensuite être envoyé à l'installation avec un appareil de mesure manométrique.

L'approche manométrique a été encore miniaturisée par Giacobini et al. en 1958 pour la détermination de l'activité cholinestérasique dans des cellules neuronales simples. La méthode de « Warburg » permet de déterminer une activité cholinestérasique relativement faible dans tous les tissus. Cette méthode permet une détermination relativement rapide de l'activité cholinestérasique à partir d'échantillons assemblés dans n'importe quel environnement dans lequel l'évaluation manométrique n'était pas disponible.

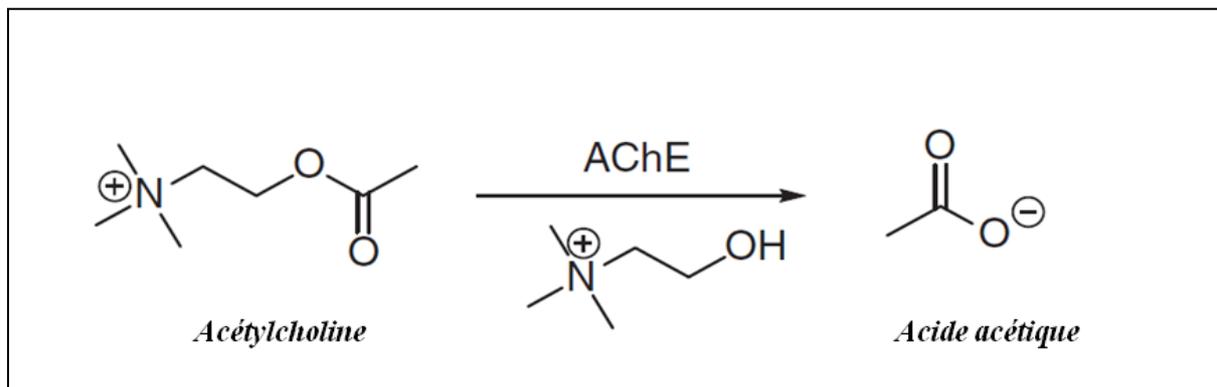
Les inconvénients de cette méthode résident dans l'utilisation limitée de tampons (seul le tampon à l'hydrogencarbonate convient) et dans l'impossibilité de modifier le pH pendant la mesure. [54-56]

### 1.3.2. Méthodes potentiométrique

- **Principe général**

La potentiométrie repose sur la mesure du potentiel électrique d'une solution entre deux électrodes, l'une appelée électrode de référence dont le potentiel reste constant tandis que le potentiel de la seconde (électrode de travail) change en fonction de la composition de l'échantillon. La différence de potentiel entre les deux électrodes permet alors d'évaluer la composition de l'échantillon.

Les méthodes potentiométrique pour le dosage de l'activité cholinestérasique utilisent la décomposition du substrat naturel ACh en choline et en acide acétique (Figure 20). L'activité enzymatique est déterminée par la  $\Delta$  pH dans le milieu réactionnel.



**Figures 20.** Principe de la méthode potentiométrique. [56]

Le premier dosage potentiométrique était communément appelé méthode de Michel (1949). L'activité cholinestérasique a été déterminée en tant que la différence de pH ( $\Delta$ pH)

évaluée après 1 h de début de l'expérience. Le système tampon phosphate / hydrogénocarbonate a été conçu pour assurer une chute de pH linéaire dans le temps. Cette méthode nécessitait un appareil sensible au pH ou deux appareils pH-mètres (première mesure avant incubation et seconde après incubation).

Cette méthode est utile pour la mesure de routine des échantillons biologiques (cas des intoxications par les pesticides anticholinestérasiques) et elle est relativement peu coûteuse et simple. Une méthode électrométrique adoptée a été utilisée pour la détermination de l'activité des cholinestérasés du sang total, des érythrocytes et du plasma. Les échantillons ont été incubés pendant 20 min en présence d'ACh et d'un tampon barbital-phosphate.

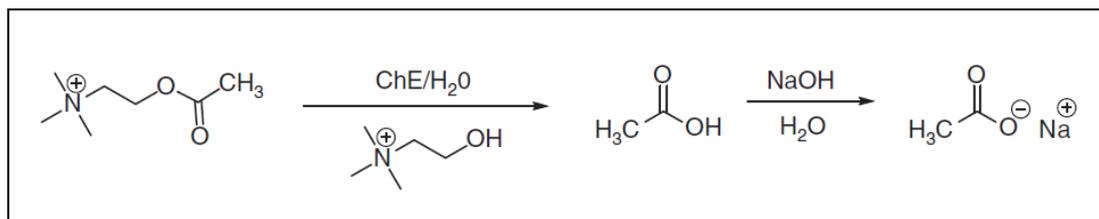
La méthode originale de Michel a été comparée à la photométrie Ellman standard, les résultats de l'activité cholinestérasique étaient comparables, mais l'approche colorimétrique s'est avérée plus précise.

L'électrométrie est une méthode indirecte. Par conséquent, le principal inconvénient de cette méthode réside dans la mesure du pH, qui est une fonction logarithmique de la concentration en acétate (et non de la production d'acétate elle-même). Ainsi, le pH pourrait être affecté par un autre processus en cours pendant la mesure. Le changement rapide du pH est un autre inconvénient de cette technique, car le pH peut chuter rapidement dans les échantillons présentant une activité cholinestérasique élevée. Par conséquent, la variation du pH peut affecter la mesure de l'activité cholinestérasique. Ce problème a récemment été compensé par une nouvelle méthode utilisant une électrode sélective pour ACh. Une nouvelle méthode potentiométrique basée sur la surveillance de l'épuisement du niveau d'ACh a été rapportée. [48, 49, 52,54-57]

### 1.3.3. Méthodes titrimétriques

- **Principe général**

Les méthodes titrimétriques ont été adoptées à partir de la méthode potentiométrique mentionnée précédemment. L'acide acétique libéré par la réaction enzymatique de l'ACh est neutralisé en continu par une solution alcaline standard et un pH constant est maintenu. (Figure 21)



**Figure 21:** Principe de la méthode titrimétrique [56].

Les premières méthodes titrimétriques ont permis une chute du pH pendant un temps spécifique qui a été stoppé par l'ajout d'un inhibiteur de la ChE, puis le titrage a été effectué. Le potentiomètre ou l'indicateur de couleur peut être utilisé pour reconnaître la  $\Delta$ pH. En raison des limitations importantes de la détermination de la couleur, seules quelques études titrimétriques portant sur le pH ont été déterminées par le changement de couleur de l'indicateur. Par ailleurs, les études potentiométriques utilisant une électrode de verre ont été les plus utilisées parmi les méthodes titrimétriques.

L'approche titrimétrique a été utilisée pour la première fois par Wilson et Cabib en 1956 et Jorgensen en 1959. Les effets de la concentration du substrat, du pH et de la température ont également été décrits par Nabb et Whitfield en 1967. Depuis leur introduction, les méthodes titrimétriques ont été largement répandues pour diverses déterminations de l'activité cholinestérasique. De plus, l'introduction du titre automatique avec le dispositif d'enregistrement a permis la production de résultats plus rapides et plus précis. La méthode pH-stat automatisée pour le dosage des cholinestérasés est l'un des tests les plus précis et les plus pratiques sur le terrain.

Le plus gros inconvénient lié aux changements rapides de pH est similaire aux méthodes électrométriques. Ces inconvénients sont également liés à la nécessité d'utiliser le support non tamponné ou faiblement tamponné. Le volume d'alcali ajouté ne devrait pas augmenter significativement le volume de réaction. [51, 54-57,59]

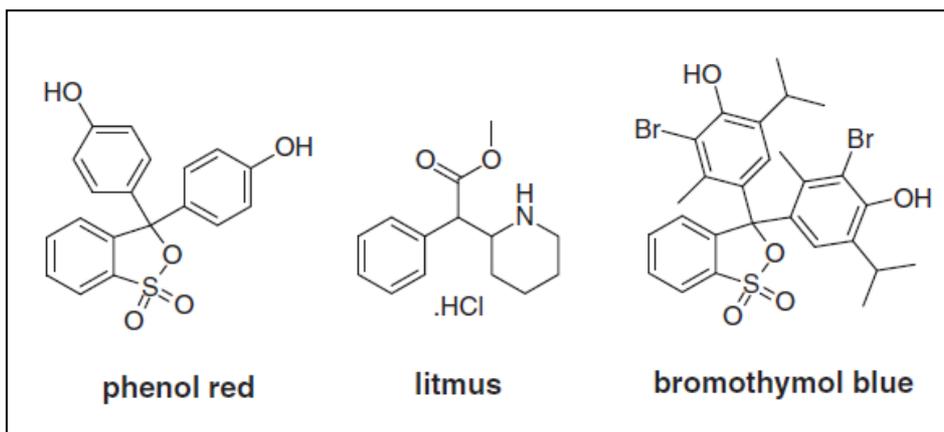
#### 1.3.4. Méthodes photométriques

- **Principe général**

La détermination photométrique de l'activité cholinestérasique est basée sur le produit d'une réaction chimique capable d'interférer avec la lumière d'une longueur d'onde spécifique.

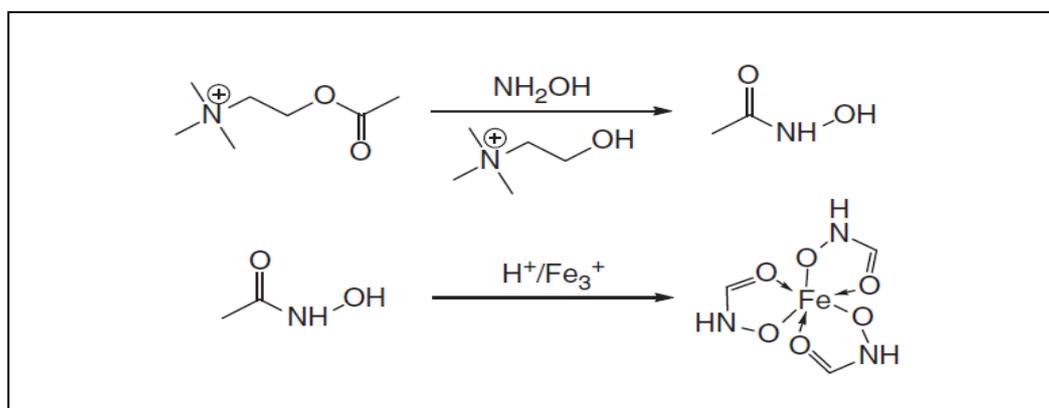
L'importance des dosages optiques augmente avec le développement des fibres optiques et la miniaturisation des spectromètres. Les méthodes basées sur les variations de pH et les indicateurs acide-base tels que le rouge de phénol, le tournesol ou le bleu de bromothymol le

plus couramment utilisé ont été introduites au début du développement photométrique et font partie des premières méthodes photométriques. (Figure 22)



**Figure 22.** Les indicateurs acide-base utilisés dans les méthodes photométriques [56].

L'approche colorimétrique d'Hestrin (1949) a décrit une réaction entre le substrat restant (ACh) après hydrolyse et l'hydroxylamine formant ensemble un complexe acétohydroxamique (Figure 23), qui en présence d'acide chlorhydrique et de trichlorure ferrique forme un complexe rouge-violet. Ce produit a été quantifié par photométrie à 500-540 nm. Cependant, cette technique ne fournit pas le taux de disparition du substrat, qui est son inconvénient le plus important. La méthode d'Hestrin est utilisée dans le dosage sur microplaque pour la détermination des agents neurotoxiques. Ce test a été comparé à l'approche colorimétrique standard d'Ellman et s'est révélé plus spécifique dans la détermination pratique des OP.



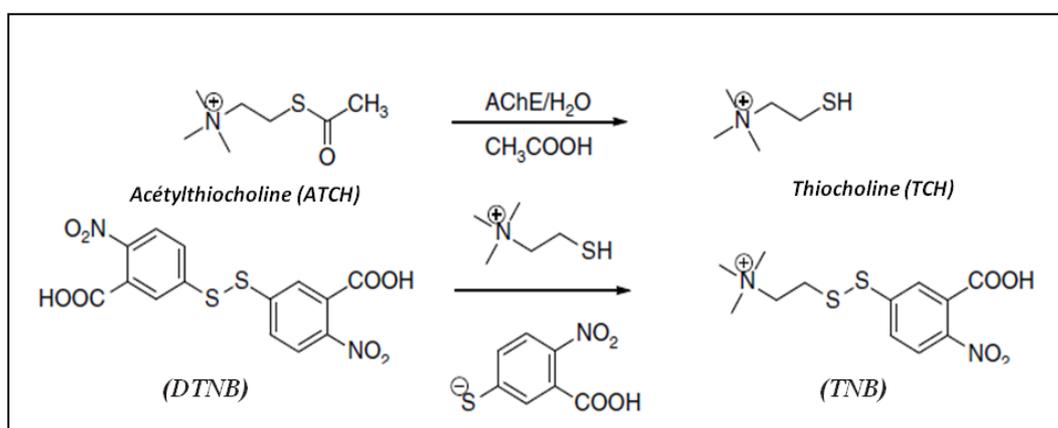
**Figure 23.** La photométrie d'Hestrin pour le dosage de l'activité cholinestérasique [56]

L'adaptation de la méthode colorimétrique d'Hestrin au dosage de l'activité cholinestérasique décrit par VINCENT et SEGONZAC en 1958 est une technique très

utilisée. Elle s'applique au plasma et aux globules rouges et même, grâce à l'inhibition sélective de la pseudocholinestérase par le « diparcol », au dosage séparé des cholinestérases globulaires et plasmatiques dans le sang total. Après réaction de l'enzyme sur le substrat à 37°C à PH 7,4 pendant 30 mn, on mesure la quantité d'acétylcholine non hydrolysée qui donne en milieu acide et sous l'action de l'hydroxylamine, l'acide hydroximique celui-ci développe une coloration rouge en présence de FeCl<sub>3</sub> dosée à 520nm.

La spectrophotométrie selon Ellman (1961) est la méthode photométrique la plus utilisée. Cette méthode utilise des substrats artificiels (esters de thiocholine). La thiocholine libéré réagit avec l'acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour former l'anion 3-carboxy-4-nitrothiolate (TNB), cet anion absorbe fortement à 412nm. (Figure 24)

Nombreux substrats ont été testés dans le but de trouver le substrat présentant le meilleur rapport spécificité / stabilité et les substrats spécifiques se sont révélés être Acétylthiocholine (ATCh) pour AChE et butyrylthiocholine (BTCh) pour BChE.



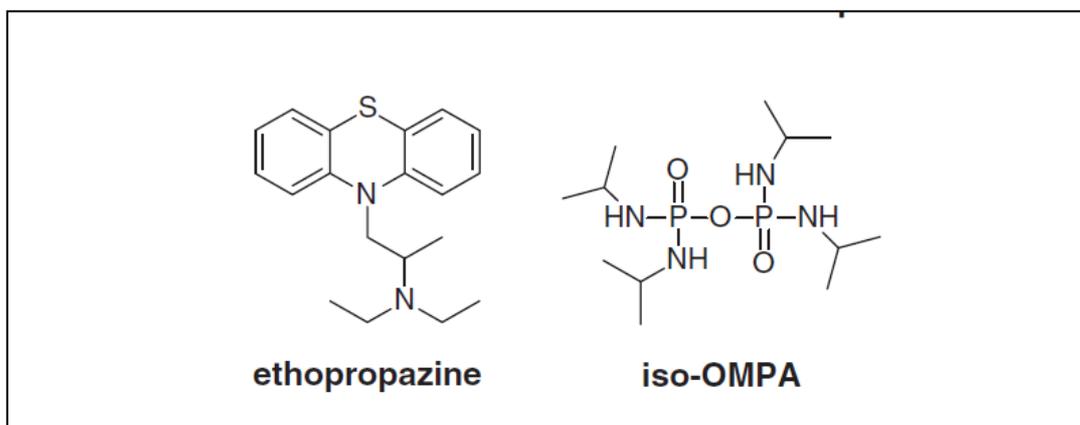
**Figure 24.** La méthode photométrique d'Ellman utilisant l'Acétylthiocholine [56]

Une revue par Worek et al. en 2012 de la méthode d'Ellman a montré que l'approche colorimétrique d'Ellman peut être utilisée pour la plupart des objectifs lors d'études sur l'activité cholinestérasique.

Cependant, la méthode d'Ellman a aussi quelques limitations, le taux d'hydrolyse du thioester (ATCh, BTCh) peut être modifié de manière significative lors de la mesure de l'activité en présence de réactivateurs oximes. Car ces réactivateurs sont capables d'hydrolyser la liaison ester dans les thiocholines et ça peut donner des résultats faussés lors de la mesure d'Ellman. Par conséquent, la méthode Ellman ne peut pas être utilisée sans discernement pour évaluer les réactivateurs oxime avec ATCh ou d'autres thioesters, en particulier lorsque cette

réaction (oxymolyse) est plus rapide que la réaction d'Ellman. De plus les esters de thiocholine peuvent subir une hydrolyse spontanée, qui est accélérée par une température élevée ou un pH supérieur à 8. L'interférence de l'anion TNB avec l'absorbance de l'hémoglobine et la photosensibilité au DTNB sont également des limites de la photométrie d'Ellman.

Worek et ses collègues ont adapté en 1999 la méthode d'Ellman pour les échantillons de sang total avec l'option de mesure sélective de l'AChE. Étant donné que l'absorbance de l'anion TNB interfère fortement avec l'absorbance de l'hémoglobine à 412 nm, seuls des échantillons très dilués peuvent être utilisés pour atteindre la sensibilité acceptable. Ainsi, la longueur d'onde de mesure a été adaptée à 436 nm. À cette longueur d'onde, l'absorption de l'hémoglobine est réduite à 25% par rapport à son absorption à 412 nm, alors que l'absorption de l'anion TNB est à 80% de son maximum. Par conséquent, une interférence inférieure avec l'hémoglobine. L'utilisation d'une longueur d'onde plus longue est un outil important pour surmonter l'interférence de l'hémoglobine. Le meilleur rapport TNB / hémoglobine a été trouvé à 462,5 nm. L'activité AChE d'un échantillon de sang total est déterminée en présence d'éthopropazine, inhibiteur sélectif de BChE (Figure 25)

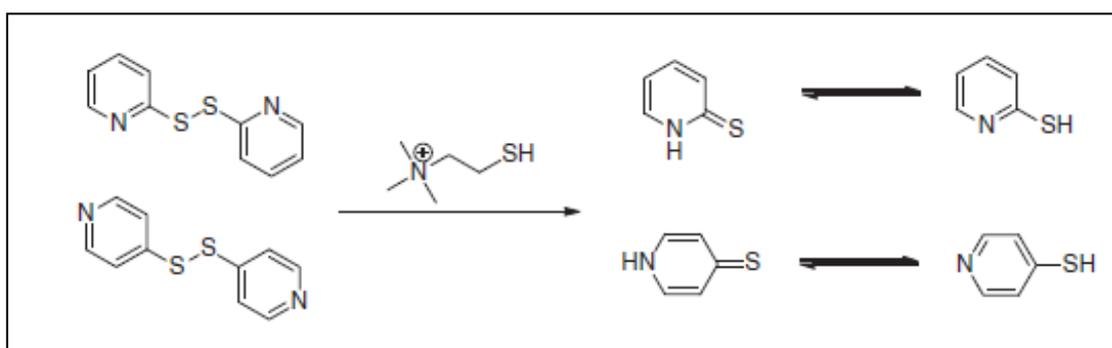


**Figure 25.** Inhibiteurs sélectifs de la BChE ethopropazine et l'iso-OMPA. [56]

Padilla et ses collègues (1995) ont proposé une autre option possible pour limiter l'interférence de l'hémoglobine avec l'absorbance de l'anion TNB. Comme on le savait, l'AChE est fixée à la surface des érythrocytes par une ancre au phosphatidylinositol. Cette technique utilise la lipase C spécifique du phosphatidylinositol pour libérer les molécules d'AChE de la membrane érythrocytaire sans la lyse érythrocytaire. L'AChE libéré est séparé du reste de l'échantillon par simple centrifugation. Les échantillons d'érythrocytes contenant

de l'AChE sans contamination par l'hémoglobine sont le principal avantage de cette procédure. L'élimination de l'influence de l'hémoglobine évite la dilution de l'échantillon et augmente la précision de l'activité AChE mesurée.

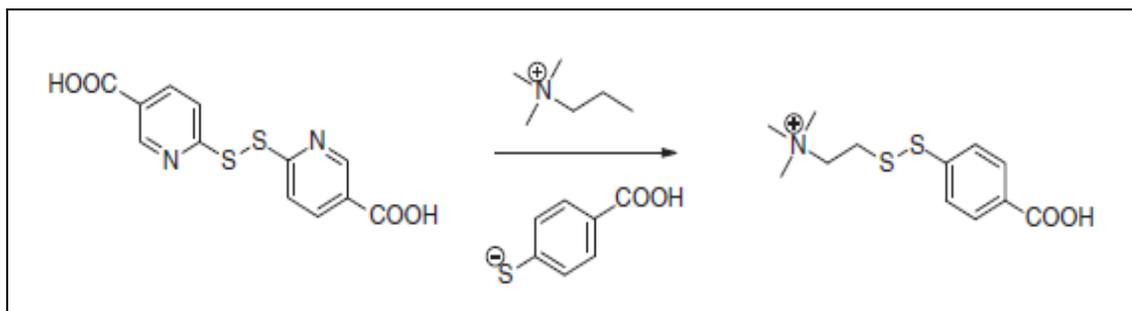
Uete et al. 1972 ont introduit un test très similaire à la procédure d'Ellman en essayant d'éviter toute interférence avec l'hémoglobine. La thiocholine réagit avec la 2,2' ou de 4,4'-dithiopyridine avec la formation de 4-thiopyridine ou de 2-thiopyridine (Figure 26 ), qui présentait une forte absorption dans l'UV à 324 nm et à 343 nm respectivement.



**Figure 26.** Dosage photométrique introduit par Uete, adapté pour éviter l'interférence avec l'hémoglobine.[56]

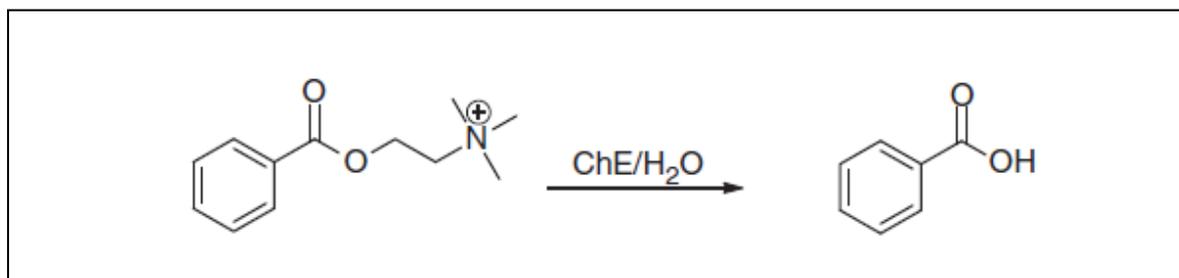
Il s'agit d'une technique rapide et précise utile pour une large gamme d'expériences, en particulier pour les analyses d'échantillons de sang total. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans l'inhibition significative de la ChE par le réactif utilisé.

Une autre méthode a été introduite dans le but de remplacer le DTNB par de l'acide 6'-dithiodinicotinique (DTNA)(Figure27 ). La méthode s'est révélée utile, car la DTNA n'affecte pas  $K_m$  contrairement à DTNB. L'aspect le plus pratique de la méthode DTNA était son adaptabilité aux instruments automatisés, qui peuvent suivre l'évolution de l'absorbance à 340 nm différente du pic d'hémoglobine. De ce fait, le DTNA est un chromogène précieux pour la détermination de l'activité cholinestérasique dans les tissus riches en hémoglobine.



**Figure 27.**Un test photométrique avec l'acide 6'-dithiodinicotinique.[56]

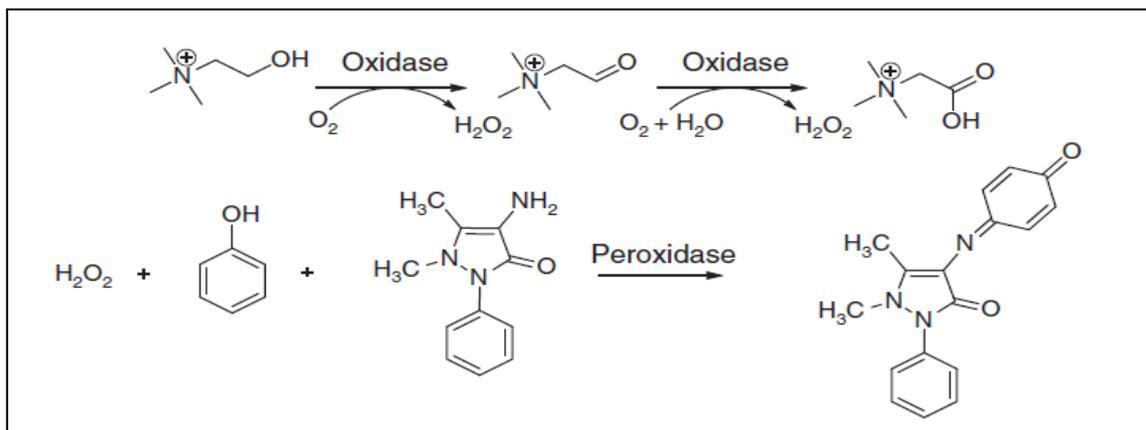
L'hydrolyse des dérivés de la benzoylcholine (BCh) par les cholinestérases a été décrite pour la première fois par Ormerod en 1953 (Figure28). Une série de dérivés de benzoylcholine avec différentes fractions sur le cycle aromatique a été testée. Les analogues de benzoylcholine se sont avérés avoir une absorption UV plus forte que les produits de leur hydrolyse.



**Figure 28.**Un test photométrique pour les analogues de la benzoylcholine. [ 56]

Kalow et Lindsay ont ensuite en 1955 utilisé cette découverte pour déterminer l'activité cholinestérasique sérique en utilisant de la benzoylcholine comme substrat artificiel. Cette méthode est basée sur la disparition du substrat lors d'une réaction enzymatique à 235 nm.

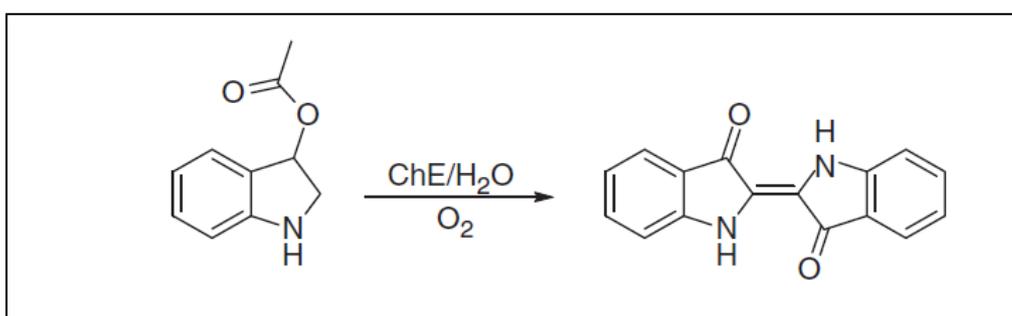
Les tests basés sur l'hydrolyse de divers esters de choline (succinylcholine, benzoylcholine ou ACh) par des cholinestérases ont été introduit par Abernethy et ses collègues en 1984. La génération d'acide cholinique est couplée à un système choline oxydase / peroxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé au cours du processus est déterminé par la réaction avec la peroxydase-phénol-aminoantipyrine (Figure 29) donnant un chromophore ayant une absorbance maximale à 500 nm.



**Figure 29.** Dosage selon Abernethy avec la cholinoxidase et la peroxydase de raifort [56].

Cette technique a été principalement développée pour prédire la sensibilité à la succinylcholine. Cependant, cette procédure est également applicable à la détermination de l'activité de routine. Cet essai indirect avec un nombre relativement élevé de modifications post-essai perd de la sensibilité et de la précision par rapport aux méthodes moins compliquées.

Un dosage direct de l'activité cholinestérasique peut être effectué en utilisant le substrat indoxylacétate via la détermination de son produit de réaction enzymatique indigo (Figure 30). Les molécules d'indoxyle libérées réagissent rapidement en présence d'oxygène. Par conséquent, cette réaction pourrait être considérée comme quantitative. L'indigo peut être quantifié par analyse spectrométrique (420 - 450 nm) ou fluorimétrique (excitation  $\lambda = 395$  nm; émission  $\lambda = 470$  nm) à pH 6,5.



**Figure 30.** Dosage basé sur l'accumulation d'indigo en présence d'oxygène. [56]

L'indoxylacétate n'étant pas le substrat spécifique de l'AChE, il pourrait donc être utilisé également pour la détermination du BChE dans le plasma. [53, 54, 56, 60]

### 1.3.5. Méthodes fluorométriques

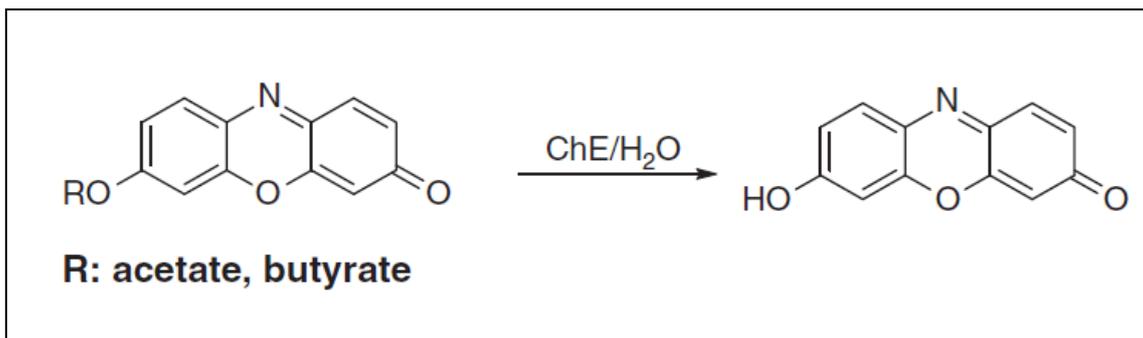
- **Principe général**

C'est des méthodes de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescentes. La fluorescence fait partie de phénomènes physiques, qui consiste en l'émission de photons lors du retour à l'état fondamental d'une molécule portée au préalable à un état excité à une longueur d'onde donnée. Cette fluorescence est proportionnelle à la concentration.

Le principe de dosage des cholinestérases basé sur la formation de produit fluorescent est couramment utilisé. Le dosage fluorométrique est dans la plupart des cas plus sensible (jusqu'à 100 fois) que la technique colorimétrique correspondante. De manière optimale, le substrat est non fluorescent (par exemple, indoxylate d'acétate, esters de résorufine ou esters de naphthyle) et fournit un produit hydrolytique hautement fluorescent. Lorsque le substrat et le produit sont tous deux des composés fluorescents, leurs spectres ne doivent pas interférer l'un avec l'autre.

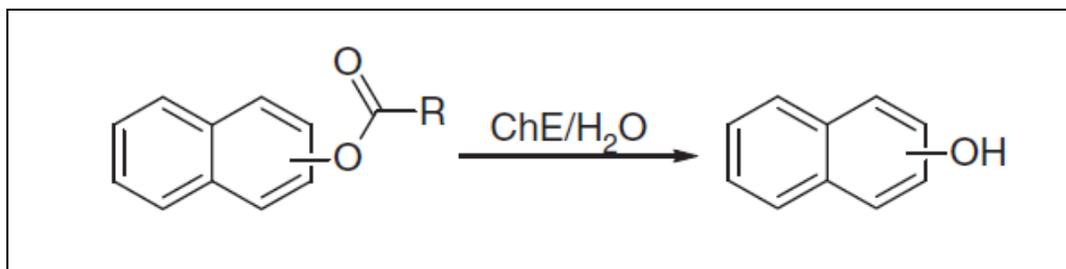
Une autre approche possible est basée sur l'hydrolyse enzymatique couplée à une autre réaction pour obtenir un produit hautement fluorescent. La sensibilité d'un tel test et la possibilité de fournir des données pour la cinétique sont les avantages les plus importants. Les limites possibles de l'utilisation des méthodes de substrats artificiels résident dans les différents paramètres cinétiques de divers substrats.

Kramer et Guilbault en 1965 ont indiqué que des esters de résorufine (Figure 31) peuvent être utilisés comme substrats pour la détermination de l'activité hydrolytique de l'enzyme. Bien que l'acétate ou le butyrate de résorufine ne soit pas un substrat favorable pour la détermination de l'activité cholinestérasique, les esters de résorufine non fluorescents fournissent des produits hautement fluorescents. Cependant, la longueur d'onde d'excitation trop proche de la longueur d'onde d'émission optimale, ce qui limite l'utilisation d'une telle méthode de dosage. L'hydrolyse spontanée rapide semble constituer un autre inconvénient, car la réaction non enzymatique ne peut être distinguée de la réaction enzymatique. De plus, la réaction non enzymatique peut affecter les résultats cinétiques. Les raisons mentionnées conduisent à exclure les esters de résorufine des protocoles de dosage de routine de l'activité cholinestérasique.



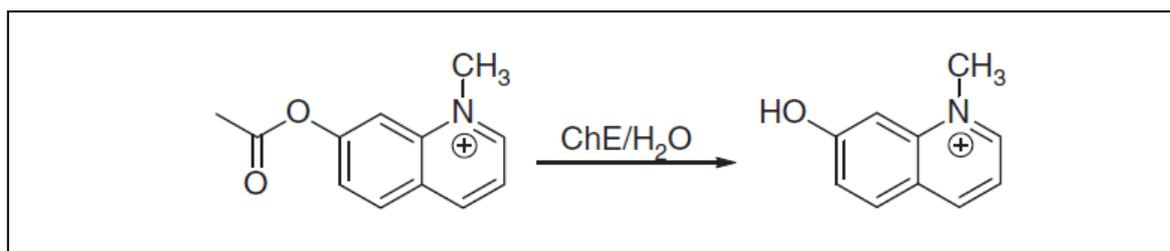
**Figure 31.** Hydrolyse des esters de résorufine. [56]

Les esters de naphyle étaient également des substrats fréquemment utilisés pour la détermination de l'activité cholinestérasique (Figure 32). Les esters de 1- ou 2-naphtols étaient généralement utilisés car leur produit d'hydrolyse (naphtol) est une fraction hautement fluorescente. Cette méthode était auparavant développée comme un outil approprié pour la mesure cinétique. Comme on pouvait s'y attendre, différents esters de naphyle doivent être utilisés pour la détermination de l'AChE (naphyle acétate) et du BChE (naphyle butyrate). La fluorescence du 1-naphtol s'est avérée supérieure à celle du 2-naphtol. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé. Comparé aux méthodes de quantification à l'acétate, cet essai est capable de mesurer la cinétique en présence d'autres substrats hydrolytiques.



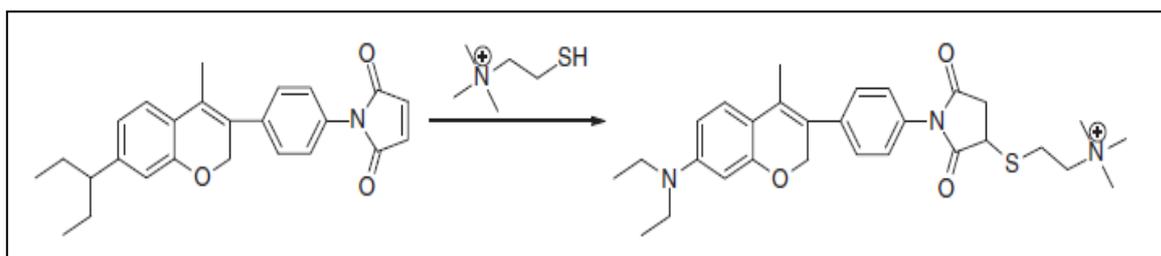
**Figure 32.** Dosage des esters de naphyle par hydrolyse. [56]

Une méthode fluorimétrique utilisant l'iodure de 7-acétoxy-1-méthylquinoléinium comme substrat (l'excitation à 320 nm ; émission à 410 nm) a également été mise au point en 1966 (Figure 33). Le produit d'hydrolyse est l'iodure de 7-hydroxy-1-méthylquinoléinium hautement fluorescent (l'excitation 406 nm ; l'émission 505 nm). Ce test permet des études cinétiques ainsi que des mesures de dépistage rapides. Cette méthode n'est spécifique ni pour AChE ni pour BChE, car les autres enzymes hydrolytiques peuvent également cliver ce substrat, bien qu'il soit clivé à vitesse plus élevée par BChE.



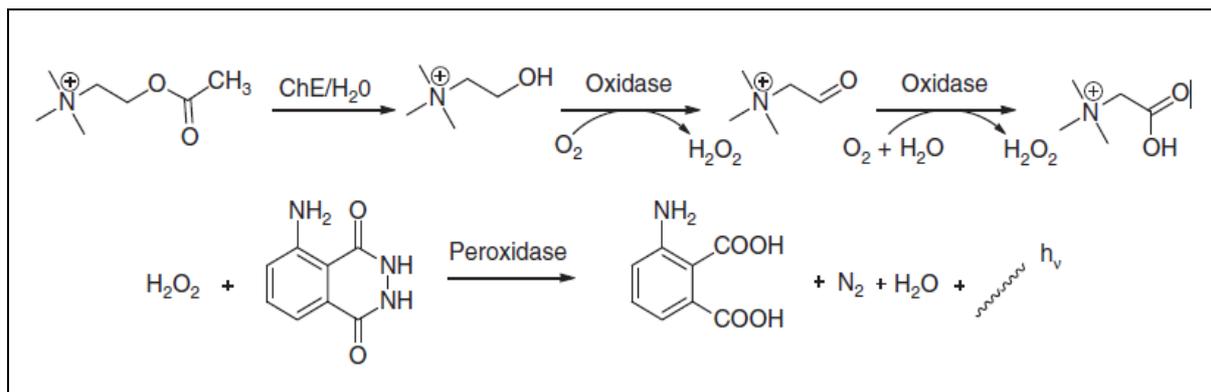
**Figure 33.** Test fluorométrique utilisant l'iodure de 7-acétoxy-1-méthylquinoléinium comme substrat [56].

La méthode fluorométrique adaptée aux très faibles quantités d'enzyme et à la distribution enzymatique instable a été établie par Parvari en 1983. Cette méthode est très sensible lorsque sa sensibilité est comparable à celle des méthodes radiométriques. Le dosage est linéaire dans la plage allant des picomoles aux nanomoles de thiocholine. Au cours de la réaction enzymatique, la thiocholine libérée (la méthode d'Ellman) se condense avec le N- [4- (7-diéthylamino-4-méthylcoumarine-3-yl) phényl] maléimide (CMP) (Figure 34). Le produit de réaction a un coefficient d'extinction élevé et une fluorescence bleue intense.



**Figure 34.** Analyse fluorométrique avec l'acétylthiocholine et le N- [4- (7-diéthylamino-4-méthylcoumarine-3-yl) phényl] maléimide(CMP). [56]

En 1985, Birman proposa une méthode chimioluminescente pour doser l'activité de l'AChE. Cette méthode utilisait le substrat naturel ACh. L'ACh a été hydrolysé en choline qui a été convertie en choline bêtaïne et en peroxyde d'hydrogène par la choline oxydase. Le peroxyde d'hydrogène associé au luminol et à la peroxydase de raifort produit une émission chimioluminescente. La peroxydase catalyse l'oxydation du luminol en 3-aminophtalate (Figure 35).



**Figure 35.** Un dosage chimioluminescent selon Birman [56].

Diaz et ses collègues en 1995 ont amélioré cette méthode en utilisant du 2-naphtylacétate, qui a été converti en 2-naphtol (activateur chimioluminescent). Cette réaction a de nouveau été couplée à la réaction avec le luminol et la peroxydase de raifort. Cette méthode a été miniaturisée par Guardigli et al en 2005. Cette miniaturisation a utilisé un lecteur de microplaques à 96 puits. Une consommation de substrat significativement inférieure, une meilleure limite de détection et des possibilités de mesure en parallèle constituaient les principaux avantages de cette amélioration. Le 2-naphtylacétate joue le rôle d'amplificateur positif pour la réaction luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -peroxydase de raifort. Après le clivage du 2-naphtylacétate, le 2-naphtol libéré améliore la réaction chimioluminescente. Le 2-naphtylacétate s'hydrolyse rapidement à  $\text{pH}=8,8$  en l'absence d'enzymes hydrolytiques, ce qui continue un inconvénient. Cette mesure doit donc être effectuée en présence de tampon ( $\text{pH}$  6,5). Cette technique convient à la détermination de BChE en raison de la faible spécificité du substrat à AChE. [56]

### 1.3.6. Méthodes polarographiques

#### • Principe général

La polarographie est une forme particulière de la voltampérométrie qui utilise comme électrode de travail une électrode à goutte tombante de mercure et dont laquelle la solution n'est pas agitée. Le principe est d'obtenir un courant proportionnel à la concentration de l'analyte à étudier. On observe donc le transfert d'électrons durant une réaction d'oxydoréduction à la surface de la goutte de mercure.

Kramer et Guilbalut ont décrit 1962 l'un des premiers procédés polarographiques pour la détermination de l'activité cholinestérasique. C'est un procédé électrochimique utilisant l'ATCh avec des électrodes en platine à deux cartouches immergées ensemble dans un échantillon à mesuré. Un courant constant de  $25 \mu\text{A}$  est appliqué aux électrodes. La variation

du potentiel de réduction sur l'électrode de platine a été automatiquement enregistrée dans le temps.

Ridgway et Mark ont publié une méthode polarographique similaire en 1965. L'avantage de cette méthode réside dans la possibilité d'une surveillance rapide des réactions. Cette méthode détermine l'augmentation de la production de thiocholine au cours de la réaction enzymatique. La vitesse d'hydrolyse a été étudiée en appliquant une tension constante entre l'électrode au calomel saturé et l'électrode au mercure tombant dans la cellule polarographique. L'augmentation du courant oxydant en fonction du temps a été enregistrée.

La validation de la méthode a été effectuée par comparaison du taux de production de la thiocholine au cours de la détermination spectrophotométrique et polarographique. Cette détermination est limitée par une toxicité significative du mercure. [56]

### 1.3.7. Méthodes radio-isotopiques

- **Principe général**

Le marquage radio isotopique consiste à remplacer dans la molécule que l'on désire étudier, un atome ou un groupe d'atomes par un atome radioactif de manière à pouvoir l'utiliser comme traceur.

La détermination de l'activité cholinestérasique radio-isotopique est basée sur l'évaluation de l'ACh marquée au  $^3\text{H}$  ou au  $^{14}\text{C}$ . Ces méthodes sont très similaires car elles ne diffèrent généralement que par la quantification de l'ACh marquée non hydrolysée ou par la quantification de l'acétate libéré marqué. Le dosage radiométrique est généralement la mesure au point final. Ainsi, il ne convient pas aux études cinétiques. L'approche radiométrique est la plus sensible permettant d'évaluer une très faible activité enzymatique. D'autre part, le coût élevé du substrat radiomarké et les complications liées à la manipulation de matières radioactives doivent être pris en compte.

Winteringham et Disney ont introduit en 1962 une méthode sur la base de l'ACh marqué au  $^{14}\text{C}$  restante. Ils ont incubé des échantillons biologiques avec du  $^{14}\text{C}$ -ACh et quantifié la quantité de substrat non hydrolysé après élimination du  $^{14}\text{C}$ -acétate volatil sous vide. C'est l'un des premiers procédés de dosage radio isotopique de l'activité cholinestérasique.

Par la suite en 1966 Reed et ses collègues ont lié l'ACh à une résine échangeuse d'ions, après centrifugation du mélange on mesure l'acétate marqué au  $^{14}\text{C}$  dans le surnageant. Cette méthode permet une détermination rapide et précise de l'hydrolyse enzymatique à une concentration de  $10^{-9}$  M de  $^{14}\text{C}$ -ACh. De plus, il permet l'utilisation de pH variable, d'une

large gamme de concentrations de substrat et de diverses concentrations d'échantillons d'enzymes. Cette méthode est plus sensible que celle présentée par Winteringham et Disney puisqu'elle mesure l'acétate plutôt que le substrat restant.

McCaman dans son travail en 1968 a sélectivement retiré le substrat marqué du surnageant. Le procédé décrit utilise l'ACh radiomarké comme substrat et mesure la production d'acétate marqué au  $^{14}\text{C}$  dans le surnageant après précipitation quantitative du substrat sous la forme du sel de Reinecke insoluble. Cette procédure pourrait être utilisée pour déterminer l'activité AChE dans des échantillons biologiques tels que le cerveau, les érythrocytes de rat ou les muscles squelettiques humains. La précipitation s'est révélée remarquablement quantitative et la radioactivité après précipitation simple a été déterminée à environ 1% de la valeur initiale.

Johnson et Russel en 1975 ont introduit un dosage rapide et simplifié basé sur l'extraction liquide-liquide. Cette analyse est basée sur les travaux précédemment introduits de Potter en 1967, qui a extrait l'acétate radiomarké dans un système de solvant organique consistant en un mélange toluène-alcool isoamylique à 5/1. Du l'ACh marqué au  $^3\text{H}$  a été utilisé comme substrat pour l'hydrolyse enzymatique dans un flacon à scintillation. Après l'hydrolyse, le mélange réactionnel a été arrêté par addition de tampon (pH 2,5). Cette étape a conduit à la protonisation de l'acétate libéré et a permis son extraction efficace vers un liquide de scintillation à base de toluène. L'acétate marqué  $^3\text{H}$  dans la couche organique peut être efficacement compté. ACh non hydrolysé marqué  $^3\text{H}$  dans la couche aqueuse ne peut pas être compté. Les particules bêta émises par un substrat non hydrolysé sont piégées en phase aqueuse avant d'atteindre le scintillateur. Par conséquent, la seule radioactivité mesurée est l'acétate marqué extrait dans la phase organique. Ce test ne diffère que légèrement de la technique de Potter. Il utilise un substrat marqué au  $^3\text{H}$ , par opposition au  $^{14}\text{C}$ -ACh, ce qui permet d'éviter l'extraction post-dosage de Potter et d'utiliser un flacon de comptage comme récipient de réaction. La technique de Johnson et Russel a été adoptée pour convenir au dosage des cholinestérases de la salive. L'activité de la salive cholinestérase s'est révélée être un marqueur précieux d'intoxication à l'OP ou au carbamate. [56]

### 1.3.8. Biocapteurs

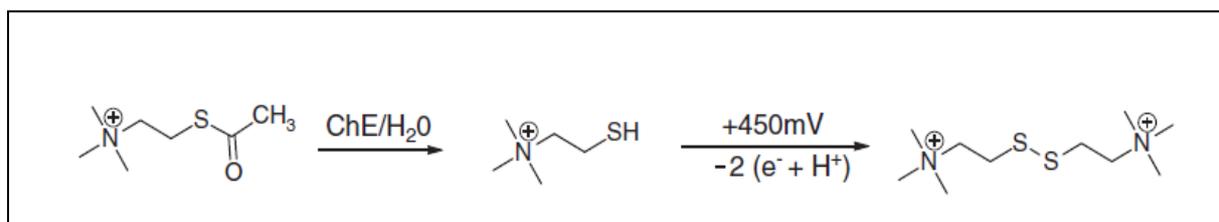
- **Principe général**

Les biocapteurs sont les dispositifs d'analyse qui utilisent la sensibilité et la sélectivité d'un biorécepteur fixé à la surface d'un transducteur physique.

Les biocapteurs à base de cholinestérase représentent une technique très utile à des fins analytiques et cliniques. Bien que les biocapteurs à base de cholinestérase soient considérés comme des outils d'analyse, ils peuvent également être utilisés dans des applications de chimie médicale ou de toxicologie. Au cours des dernières décennies, les biocapteurs sont devenus le système susceptible de remplacer les techniques de dosage classiques. Leur miniaturisation, leur simplicité et leur portabilité représentent les avantages les plus significatifs.

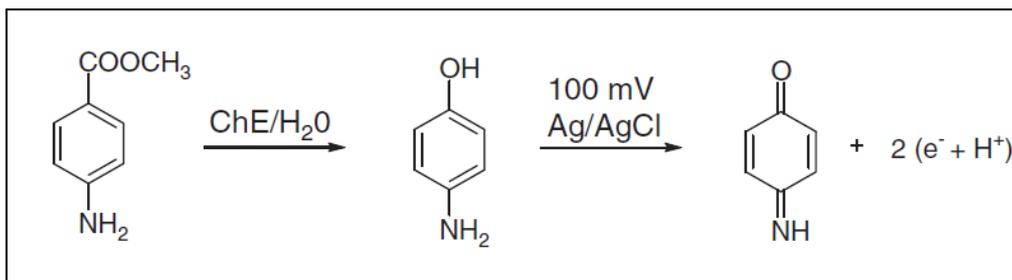
La première génération de biocapteurs cholinestérasique était un capteur bi-enzymatique ampérométrique basé sur deux enzymes : la cholinestérase (ChE) et la choline oxydase (ChO). La choline ne conduisant pas de courant électrique, la ChO est utilisé pour produire du peroxyde d'hydrogène, qui peut être détecté par ampérométrie lors de sa réduction en eau par une tension de niveau bas appliquée.

La deuxième génération de capteurs utilise des esters de thiocholine comme substrats. La thiocholine libérée au cours de la réaction enzymatique est facilement oxydable en dithioforme (Figure 36). Le système est basé sur la détection ampérométrique directe de la thiocholine.



**Figure 36.** Principe des biocapteurs potentiométriques. [56]

Outre les systèmes mentionnés, diverses autres techniques de biocapteurs peuvent également être appliquées. Le capteur proposé par La Rosa et ses collègues en 1994 utilise l'acétate de 4-aminophényle comme substrat. Le produit de la réaction enzymatique peut être détecté par ampérométrie (Figure 37). Ce substrat présente certains avantages, liés à la moindre utilisation du potentiel électrique.



**Figure 37.** Biocapteur selon La Rosa utilisant l'acétate de 4-aminophényle en tant que substrat [56].

L'autre exemple de biocapteur à base de ChE est un système tri-enzymatique sans médiateur développé par Ghindilis en 1996. Le capteur est très similaire à la configuration ampérométrique bi-enzymatique, mais il utilise une troisième enzyme (peroxydase) pour détecter le peroxyde d'hydrogène généré dans la réaction catalysée par ChO. Les trois enzymes doivent être co-immobilisés sur la surface de l'électrode de travail. [56]

#### 1.4. Récapitulatif sur les méthodes de dosage

Il est nécessaire de comparer les approches examinées en fonction des paramètres définissant leur applicabilité à différents types de mesures. Chaque type d'expérience a des exigences différentes en termes de sélectivité, de sensibilité, de possibilité de suivre l'activité enzymatique dans le temps et du coût. Certains auteurs exigent un appareil miniaturisé (par exemple, Test-mate ChE, ChE check mobile), portable et pouvant être utilisé sur le terrain. Le tableau 16 récapitule ces caractéristiques.

La technique la plus utilisée pour déterminer l'activité cholinestérasique est la colorimétrie d'Ellman. C'est le gold-standard (étalon-or) pour l'évaluation de l'activité cholinestérasique. Il permet la réalisation une large gamme d'expériences. Il convient à l'évaluation d'échantillons biologiques, à l'identification de modulateurs des cholinestérasés et à la détermination de leur efficacité. Le principe de la colorimétrie d'Ellman peut être utilisé dans diverses modifications. Il peut être miniaturisé dans un appareil portable capable d'évaluer l'exposition aux pesticides ou aux agents neurotoxiques. Couplé avec HPLC, il permet de mesurer l'activité cholinestérasique en temps réel. Adopté pour les microplaques à 96 puits, il convient aux mesures en parallèle de plusieurs échantillons. Sa limite réside dans une forte interaction avec l'hémoglobine lors de l'analyse d'un échantillon de sang total, qui semble être partiellement surmontée par l'adaptation réalisée par Worek et al.

En ce qui concerne les autres techniques, le dosage radiométrique selon Johnson et Russel est une approche pratique pour les protocoles nécessitant une sensibilité élevée. Les modifications de cette technique améliorent au minimum les étapes de pré-dosage et ce test convient donc à la détermination multi-échantillons. En outre, il est également applicable aux dosages sur tissus, car la compatibilité optique des échantillons n'est pas nécessaire. Les protocoles fluorométriques sont un outil utile pour la détermination sensible dans les études cinétiques à de très faibles concentrations en enzymes. La possibilité de déterminer l'agent cholinergique directement dans des échantillons naturels via des biocapteurs peut être très utile pour diverses études pharmacologiques et environnementales. La technique du biocapteur semble être très prometteuse pour le développement futur en raison de sa miniaturisation disponible, simplicité et portabilité. (Tableau 17)

L'approche optimale de la détermination de l'activité cholinestérasique doit répondre à plusieurs exigences. Elle doit être suffisamment sensible, la sélectivité pour l'activité AChE et BChE est nécessaire, elle devrait être capable d'évaluer des échantillons biologiques ainsi que des études cinétiques et la découverte de nouveaux médicaments, sans coûter cher.

Au cours des dernières décennies, le dosage cholinestérasique a connu un grand développement, en raison de la demande croissante en compréhension de l'effet de la modulation enzymatique. Les techniques les plus anciennes ont été développées principalement pour la détermination de l'activité globale des cholinestérases sans distinction entre AChE et BChE, cela rend les techniques antérieures peu pratiques pour des expériences avancées.

Les nouveaux protocoles font l'objet de nombreuses recherches. Cependant, les principales améliorations concernent l'optimisation et la sélection de nouvelles plateformes physiques plutôt que l'introduction de nouveaux substrats. Les kits de terrain commerciaux pour la mesure de l'activité cholinestérasique en routine dans le sang doivent être développés et optimisés. Un grand potentiel réside dans l'utilisation ultérieure de méthodes à base de puces, de microélectrodes et de nanotechnologies qui ouvrent de nouvelles possibilités dans ce domaine. [56]

**Tableau 16** : Résumé des méthodes examinées. [56]

<b>Objectif</b>	<b>Les approches commodes</b>
Études cinétiques d'inhibition / réactivation	<b>photométrie d'ELLMAN</b> <b>Fluorométrie</b> <b>Dosage en flux continu</b>
Diagnostic d'intoxication aux Organophosphorés et / ou carbamates	<b>Titrimétrie</b> <b>photométrie d'ELLMAN</b> <b>Photométrie</b> <b>Kits à utiliser sur le terrain</b>
Évaluation clinique de routine (outil de diagnostic)	<b>Manométrie</b> <b>Photométrie d'ELLMAN</b> <b>Photométrie</b>
Études environnementales	<b>Biocapteurs</b>

**Tableau 17:** Comparaison des différentes méthodes de dosage de l'activité cholinestérasique basée sur différents paramètres [56]

	ACHE	BChE	Sérum	Tissus	Appareils	Automatisation	Sensibilité	Applicabilité cinétique	Tarifification	Stabilité pH	Miniaturisation	Utilisation sur le terrain
Manométrie de Warburg,	+	+	+	+	Simple	---	++-	---	+	+	---	-
Manométrie d'Augustinsson	-	-	+	+	Simple	---	++-	---	+	+	---	+
Manométrie de Giacobini	-	-	-	+	Simple	---	+++	---	+	+	---	-
Electrométrie de Michel	+	+	+	+	Simple	---	+_-	---	+	-	---	-
Titrimétrie de Back, Nabb	+	+	+	+	Simple	+	+_-	+_-	+	+	---	-
Photométrie d'Hestrin	+	+	+	-	Simple	+_-	+_-	---	+	+	+_-	+
Photométrie d'Ellman	+	+	+	-	Simple	++-	+_-	+++	+	+	++-	-
Photométrie de Kalaw	-	+	+	-	Simple	++-	++-	+++	+	+	++-	-
Photométrie d'Abernethey	+	+	+	-	Simple	++-	+_-	+++	-	+	++-	-
Photométrie /fluorométrie, de Guibault	+	+	+	-	Simple	++-	+_-	+++	+	+	++-	-
Fluorométrie de Kramer	+	+	+	+	avancée	++-	+++	+++	-	+	++-	-
Fluorométrie polarographie	+	+	+	+	avancée	++-	+++	+++	-	+	++-	-
Radiométrie, Johnson et Russel	+	+	-	-	avancée	---	+++	+++	-	+	---	-
Biocapteurs	+	+	+	+	avancée	+_-	++-	---	-	+	+_-	-
						+++	++-	---	+	+	+++	+

## 2. Intérêt du dosage de l'activité cholinestérasique dans les intoxications aux organophosphorés et carbamates

### 2.1. Pour organophosphorés

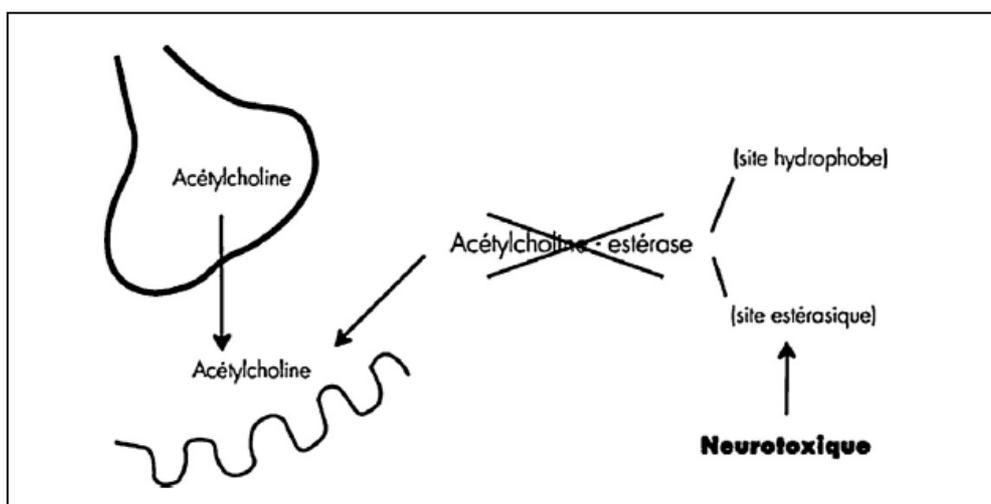
#### 2.1.1. Cholinestérasés et organophosphorés

Les OP se fixent de façon covalente sur le site estérasique des ChE (Figure 38) et phosphorylent ou phosphonylent (selon le toxique considéré) leur site actif.

Leur mécanisme d'action principal est le blocage de la dégradation de l'acétylcholine en choline et en acide acétique par inhibition essentiellement irréversible des cholinestérasés. Il en résulte une accumulation d'acétylcholine à l'origine d'une véritable intoxication de l'organisme plus connue sous le terme de crise cholinergique.

Quand elle est possible, l'hydrolyse spontanée de la liaison OP–enzyme est très lente et ne permet pas de retour à la normale sans un traitement réactivateur adapté (oxime). Après un temps variable selon l'OP en cause, la liaison avec l'AChE peut devenir insensible à l'action réactivatrice des oximes du fait d'une désalkylation de l'OP, entraînant une stabilisation du complexe enzyme-OP : c'est le phénomène dit du vieillissement.

Une fois les ChE inhibées de façon irréversible, voire vieilles, le retour à la normale de l'activité cholinestérasique est lent : 100 à 120 jours environ pour l'AChE (1 % par jour par renouvellement des érythrocytes) ; il est plus rapide pour la BChE (environ 3–7 % par jour par synthèse hépatique ; deux à trois semaines environ seraient nécessaires pour une récupération totale) [28]



**Figure 38.** Inhibition des cholinestérasés par les neurotoxiques de guerre (NOP). [28]

## 2. 1.2. Diagnostic de certitude de l'exposition aigue

La mesure de l'inhibition des ChE est le moyen de confirmation diagnostique le plus fiable de l'intoxication aux OP. Aucune méthode de dosage direct des OP dans le sérum ne permet en routine cette confirmation. [28]

### a. Diagnostic en urgence

Le diagnostic en urgence de l'intoxication aux OP repose sur les circonstances d'exposition et sur les signes cliniques. Il doit être confirmé au plus tôt par la biologie. L'effondrement massif et rapide de l'activité cholinestérasique signe une intoxication par un inhibiteur des ChE, généralement un OP. Une inhibition de l'activité de l'AChE érythrocytaire de plus de 50 % s'accompagne d'une symptomatologie clinique, et celle de plus de 90 % est rapidement mortelle.

La corrélation entre baisse de l'activité des ChE et effets toxiques n'est toutefois pas toujours bonne car ces derniers dépendent non seulement de l'importance de la chute des ChE mais aussi de sa rapidité. Le dosage de l'activité BChE surestime la sévérité de l'intoxication pour beaucoup d'OPP qui inhibent d'avantage la BChE que l'AChE. Les NOP ont une meilleure affinité pour l'AChE. Puisqu'il s'agit de la même enzyme, l'AChE érythrocytaire est classiquement un meilleur marqueur de l'inhibition synaptique et donc de la sévérité de l'intoxication même si l'état clinique du patient prime pour le diagnostic de gravité. [28] (voir annexe XI)

### b. Quelle activité cholinestérasique faut-il doser ?

Le dosage de l'activité BChE plasmatique est souvent préféré pour des raisons techniques. La conservation et le traitement des prélèvements plasmatiques sont plus faciles et le nombre de laboratoires capables de la doser en routine est plus élevé. L'activité BChE est donc généralement déterminée en première intention. Puisqu'elle n'est pas impliquée directement dans la toxicité des OP, l'inhibition de la BChE est un biomarqueur qui signe seulement l'exposition au toxique et sa présence dans la circulation. Lors des attentats de Matsumoto et de Tokyo, plusieurs études ont montré les limites du dosage de l'activité BChE par rapport à celui de l'activité AChE, plus sensible et meilleur marqueur de l'effet des NOP. Le dosage de l'activité AChE érythrocytaire est l'indicateur le plus simple et le plus fiable de l'inhibition de l'AChE synaptique, et donc le meilleur reflet des effets sur la santé. C'est le meilleur indicateur de l'exposition aux OP.

Si l'activité de base de l'individu n'est pas connue, le dosage de l'activité AChE doit être réalisé en complément du dosage de l'activité BChE plasmatique pour orienter le diagnostic vers l'exposition à un inhibiteur de cholinestérase (OP ou carbamate notamment). Plus que le toxique, c'est la voie de pénétration, et donc la nature des tissus touchés en premier, qui conditionne l'inhibition des ChE sanguines. Quand le passage systémique est faible, après exposition à des vapeurs par exemple, l'inhibition sanguine de BChE ou AChE est limitée malgré des signes locaux parfois sévères (myosis, rhinorrhée ou bronchoconstriction). Deux victimes de l'attentat de Tokyo ont par exemple été admises avec des troubles de la conscience et une détresse respiratoire aigue sans modification de l'activité BChE. Les intoxications ayant été majoritairement provoquées par exposition à des vapeurs de sarin lors des attaques terroristes de Matsumoto et Tokyo, le myosis a été un marqueur d'exposition plus sensible que l'activité ChE. [28]

### **c. Diagnostic de certitude a posteriori : le prélèvement conservatoire**

Pour la plupart des OP, la majorité de la dose absorbée est rapidement éliminée dans les urines, dans les 48 à 72 heures suivant l'exposition. Le dosage de leurs métabolites (acides methylphosphoniques alkylés) sanguins et urinaires est un outil complémentaire pour le diagnostic des intoxications. Les échantillons sanguins et urinaires à la prise en charge du patient, permettent de confirmer la nature du toxique, d'évaluer une exposition, l'importance d'une intoxication ou de détecter des intoxications aiguës ou chroniques à faibles doses au cours desquelles l'activité cholinestérasique peut rester normale. Ces techniques ne sont pas disponibles en routine et ne guideront pas le clinicien en phase aiguë. Elles pourront apporter des éléments contributifs dans le cadre de l'enquête a posteriori dans un objectif médico-légal, notamment pour prouver l'emploi d'arme chimique ou dans le cadre d'exposition professionnelle. [28]

#### **2.1.3. Marqueur de l'efficacité thérapeutique**

L'activité AChE est un bon marqueur du besoin en atropine chez le patient intoxiqué par un OP. Ce n'est pas le cas de l'activité BChE dont la récupération ne devrait pas être utilisée comme critère décisionnel pour l'arrêt du traitement par atropine.

L'administration précoce d'une oxime (methylsulfate de pralidoxime) peut corriger, voire normaliser l'activité AChE érythrocytaire, témoin de l'activité de l'AChE synaptique. La BChE est beaucoup moins bien réactivée par les oximes. Elle est donc inappropriée pour le

suivi direct de leur efficacité. Cependant, puisque son dosage permet la mise en évidence d'inhibiteurs circulants, il convient de traiter tant que le toxique circule.

Malgré l'aide apporté par la détermination des activités cholinestérasique, l'efficacité de l'atropine et de l'oxime sera principalement jugée sur l'efficacité clinique, en particulier sur le plan respiratoire. [28]

#### **2.1.4. Diagnostic des expositions professionnelles aux organophosphorés**

##### **a. Indication**

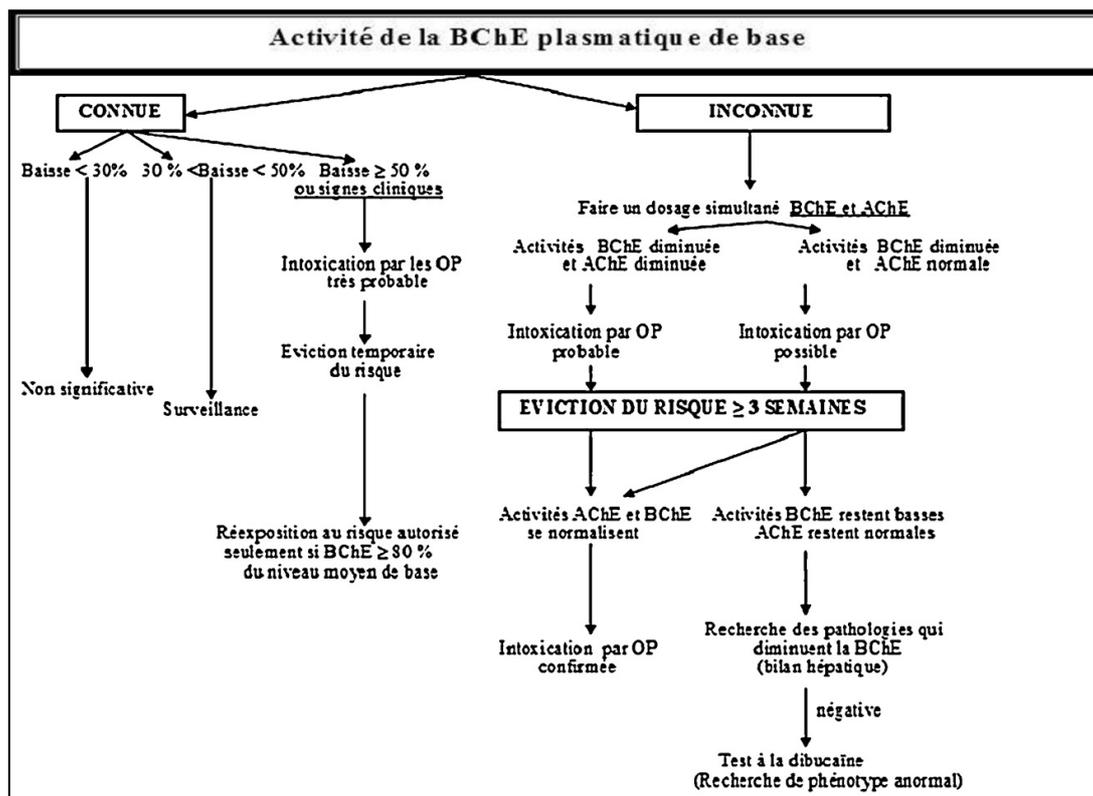
La mesure sanguine de l'activité BChE ou AChE est indiquée à l'embauche, régulièrement selon le post et à chaque fois qu'une intoxication accidentelle est suspectée. L'institut de recherche en santé et en sécurité du travail (IRSST) du Canada est en faveur du dosage de l'activité AChE, tandis qu'en France, l'Institut national de recherche en sécurité (INRS) préconise les deux types de dosage. La détermination périodique de l'activité BChE est recommandée chez les travailleurs exposés pour mettre en évidence une exposition infra clinique aux OP. Une exposition à faibles doses ne modifiera pas forcément l'activité enzymatique de façon détectable (compte tenu des variabilités intra individuelles et analytiques) et le dosage de produits du métabolisme des OP (acides phosphoniques urinaires et sanguins) peut être préférable. [28]

##### **b. Interprétation**

Lors de l'exposition chronique, l'activité de l'AChE peut atteindre des niveaux faibles sans symptômes apparents. Une faible exposition supplémentaire peut provoquer l'apparition des symptômes. Ils ne sont alors pas uniquement associés au niveau d'inhibition atteint, mais dépendent aussi de la rapidité avec laquelle la chute d'activité cholinestérasique s'est produite. L'indicateur biologique d'exposition en France est une activité AChE qui a chuté jusqu'à 70 % de la valeur de référence individuelle (soit 30 % d'inhibition). C'est le niveau d'alarme signifiant une exposition possible à un inhibiteur des ChE. Quand la chute de l'activité des ChE est rapide et massive, le dosage préalable de l'activité moyenne de base n'est pas indispensable pour le diagnostic de certitude d'une exposition. Il prend tout son intérêt dans les expositions à de faibles doses induisant des inhibitions comprises dans la variabilité des mesures.

En pratique, l'activité de la BChE plasmatique de base de chaque travailleur est déterminée avant toute exposition. Ensuite, il faut attendre trois à six semaines sans contact avec le toxique. Cette valeur est la moyenne d'au moins deux dosages. Un troisième dosage est proposé si la variation de l'activité entre les deux premiers dosages est supérieure à 20 % ; ces

deux premiers prélèvements sont effectués séparés de trois à quatorze jours. La conduite à tenir est résumée en (Figure 39).



**Figure 39.** Interprétation de la baisse de l'activité cholinestérasique dans le cadre du suivi des expositions professionnelles. [28]

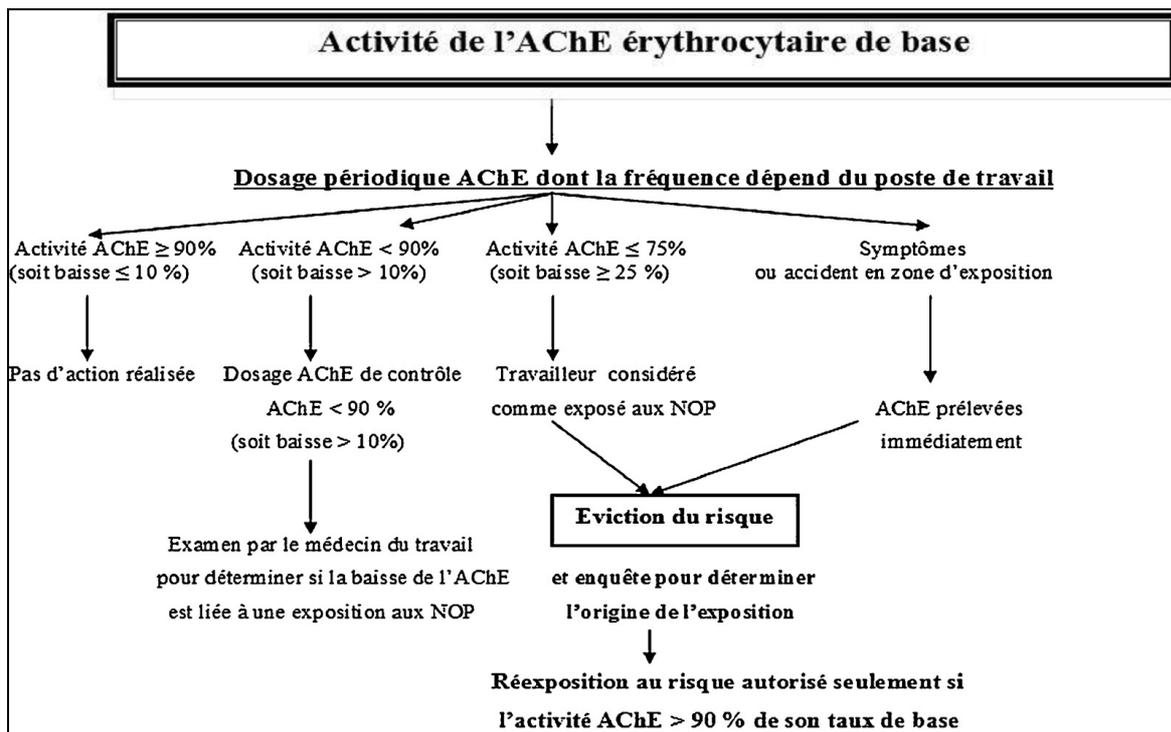
En l'absence de détermination antérieure de l'activité de la BChE de base, une faible activité peut, soit signer une intoxication par les OP à faibles doses, soit révéler une variante génétique de la BChE anormal. Le diagnostic différentiel peut être réalisé par le test à la dibucaïne :

- **Test à la dibucaïne**

Il s'agit d'un anesthésique local à fonction ester hydrolysé par la BChE. Au moins six variantes génétiques de la BChE ont été décrites (A, F, J, K, S, U). Le phénotype normal le plus courant est la forme U (usual), qui est sensible à l'inhibition par la dibucaïne. Les formes atypiques de la BChE, sont beaucoup plus rares (< 0,1 % des sérums). Elles ont une forte résistance à l'inhibition par la dibucaïne. Le résultat s'exprime en nombre de dibucaïne défini par le pourcentage d'inhibition de la dibucaïne. Il permet d'identifier trois génotypes : la BChE des individus normaux (UU), inhibée de 80 % environ, celle des homozygotes (AA) de 20 % et celle des hétérozygotes de 60 %. Un individu homozygote AA a une BChE inférieure à 50 % de la normale (généralement entre 10 et 30 %), et un individu hétérozygote UA a une

BChE à 75 % de la normale. Mais si les méthodes biochimiques différencient les phénotypes UU, UA, et AA, elles n'autorisent malheureusement pas une discrimination de tous les phénotypes. Pour de nombreuses variantes, seule l'analyse de l'ADN permet de déterminer le génotype précis de la BChE d'un patient. C'est l'apport de la biologie moléculaire, avec étude génétique de l'ADN du patient qui permet de dépister les mutations à l'origine des variantes génétiques, et par conséquent les patients qui présentent un déficit génétique en BChE. Si des formes atypiques de la BChE sont mises en évidence, silencieuses cliniquement, l'usage des curares tels que la succinylcholine et le mivacurium sont contre-indiqués. [29]

Dans l'armée américaine on préconise un dosage périodique de l'activité AChE pour les personnels potentiellement exposés aux NOP (ceux qui les manipulent sur le terrain ou les scientifiques en laboratoire). Il est obligatoire en Californie pour la surveillance des travailleurs exposés aux OPP. En pratique, la détermination de l'activité AChE individuelle de base est nécessaire avant toute exposition. Elle est obtenue par la moyenne de deux dosages réalisés à quelques jours d'écart (3 à 14 jours). La conduite à tenir est résumée par la Figure 40. [38]



**Figure 40.** Surveillance des travailleurs exposés aux neurotoxiques de guerre (NOP) [28].

## 2.2. Pour les carbamates

Comme les insecticides organophosphorés, les carbamates inhibent l'activité des cholinestérases dans le sang, le cerveau et la plupart des autres tissus, de sorte que l'acétylcholine s'accumule au niveau des synapses du système autonome, de certaines synapses du système nerveux central et des terminaisons nerveuses.

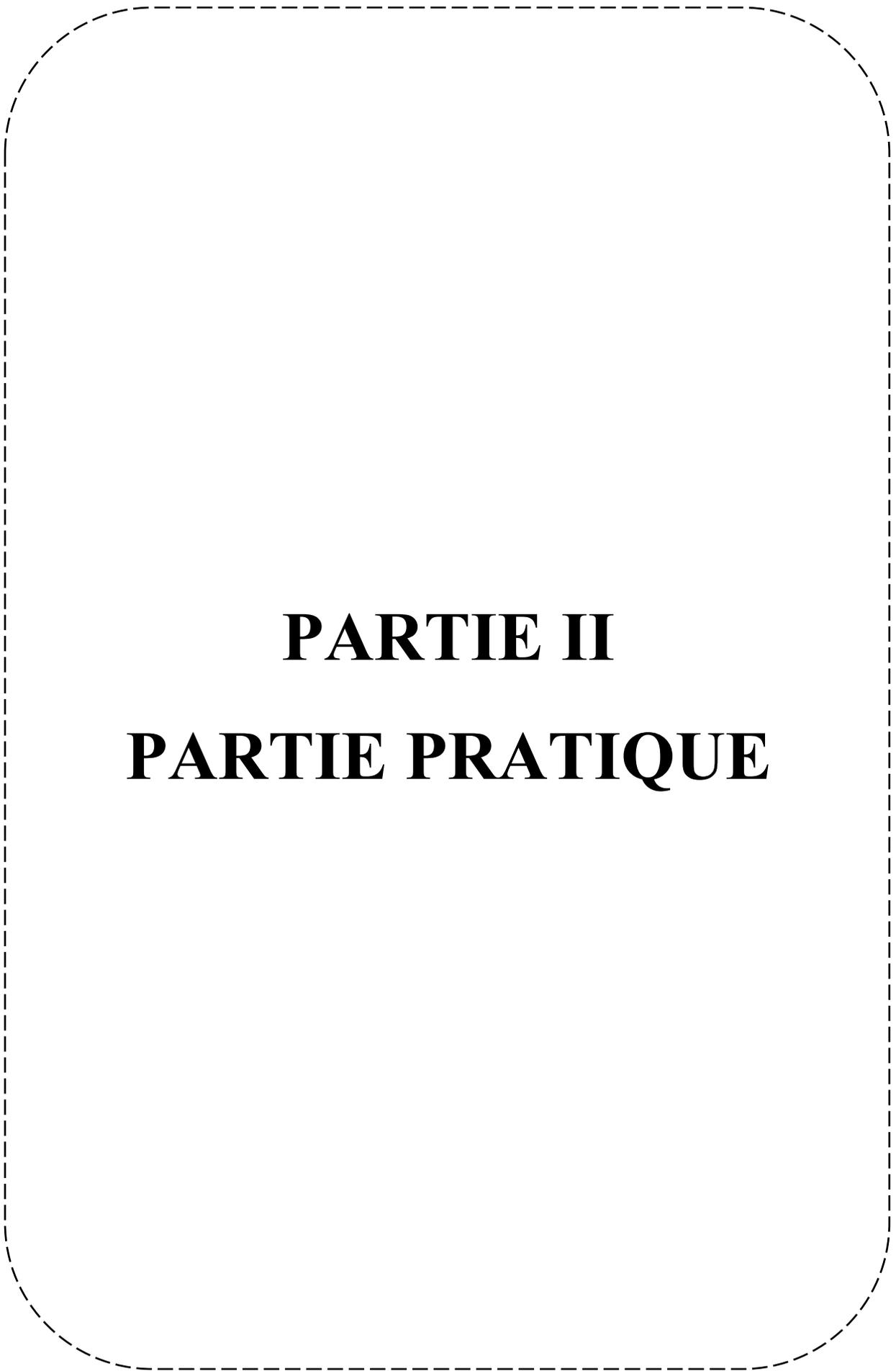
Inhibition des cholinestérases par les carbamates est réversible, c'est pourquoi l'intérêt du dosage des cholinestérases dans le diagnostic et le suivi des intoxications aux carbamates est discuté. Certains auteurs considèrent que ce dosage n'est pas utile et n'est pas contributif en raison de l'évolution rapide et favorable de l'intoxication, d'autres lui confèrent un intérêt diagnostique limité, car l'inhibition des cholinestérases n'est en général que transitoire et les estérases inhibées sont décarbamylées et régénérées pendant l'opération de dosage (in vitro), en particulier en cas de dilution de l'échantillon.

Par contre l'inhibition des cholinestérases plasmatiques s'est révélée, dans certains cas, prolongée d'où l'intérêt du dosage de ces enzymes dans le suivi des intoxications aiguës. Il faut garder à l'esprit que, bien que la vitesse de régénération de l'enzyme liée au carbamate soit relativement rapide en comparaison à celle de l'enzyme phosphorylée (en cas d'intoxication par les organophosphorés), elle serait plus lente avec certains carbamates comme c'est le cas de l'aldicarbe. De plus les AChE sont inhibées plus lentement par les carbamates méthylés ou diméthylés in vitro, et leur réactivation spontanée est également plus lente. [36]

Malgré des défauts de spécificité, la mesure de l'BChE, plus facile à réaliser et plus sensible que celle de l'AChE, est indiquée pour confirmer rapidement le diagnostic de l'intoxication aiguë et pour le suivi évolutif de l'intoxication. En revanche, ce dosage doit être interprété avec prudence dans ce type d'intoxication. Car la détection d'une baisse modérée de l'activité implique la connaissance préalable du taux basal de l'individu.

La mesure des AChE est un meilleur indicateur de l'activité cholinestérasique au niveau des synapses neuronales que celle des BChE. Ce test est plus fiable mais plus difficile à réaliser. La plupart des laboratoires ne maîtrisent pas la technique spéciale permettant de déterminer l'activité des cholinestérases globulaire en présence de carbamates car les conditions de prélèvement et de transport de l'échantillon sont particulièrement critiques et l'analyse doit être effectuée très rapidement après l'intoxication, le prélèvement analysé immédiatement (ou congelé immédiatement à -20C).

Il en ressort enfin que la mesure de l'activité des cholinestérases confirme rapidement l'intoxication aiguë aux carbamates d'abord évoquée par le tableau cholinergique, contribue à garantir une prise en charge spécifique de l'intoxication par l'instauration d'un traitement régénérateur afin de réactiver au plus vite les cholinestérases, et pourra permettre de juger de l'efficacité de ce traitement et de la rémission progressive de l'intoxiqué. [36]



**PARTIE II**  
**PARTIE PRATIQUE**

**CHAPITRE I :**  
**MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### 1. Type de l'étude

L'étude réalisée est une étude descriptive effectuée durant la période s'étalant du mois de décembre 2018 au mois de mars 2019. L'étude consiste en le dosage de l'activité cholinestérasique sur COBAS interga 400<sup>plus</sup>.

L'étude s'est déroulée au CHU NEDIR MOHAMED de TIZI OUZOU, en tant que structure sanitaire de référence de cette région et où se trouve plusieurs services cliniques et biologiques parmi lesquels, le laboratoire de biochimie et celui de toxicologie où l'environnement analytique offre un cadre de travail pour notre étude.

### 2. Population de l'étude

L'étude a été réalisée sur un groupe de 60 personnes en bonne santé provenant de la région centre comprenant les wilayas : TIZI OUZOU, BOUMERDES et BOUIRA, réparties en trois groupes de 20 personnes chacun.

- Le premier groupe est composé d'hommes donneurs de sang au niveau du centre de transfusion sanguin de Tizi Ouzou (CTS) ;
- Le deuxième groupe est composé de jeunes femmes : étudiantes, travaillant à l'hôpital ou venant à l'hôpital en tant que visiteuses âgées de 16 à 39 ans ;
- Le troisième groupe est composé de femmes enceintes venant consulter à l'établissement public de santé de proximité de Draa Ben Khedda Tizi-Ouzou et du personnel de l'hôpital.

### 3. Echantillonnage

Une méthode d'échantillonnage direct (recommandée par le comité IFCC /CLSI) avec une sélection a priori a été utilisée.

Une fiche de renseignement fixant les critères d'inclusion et de non inclusion a été établie et remplie avant chaque prélèvement et sur la base de laquelle une sélection d'individus en bonne santé a été effectuée (Annexes I et II)

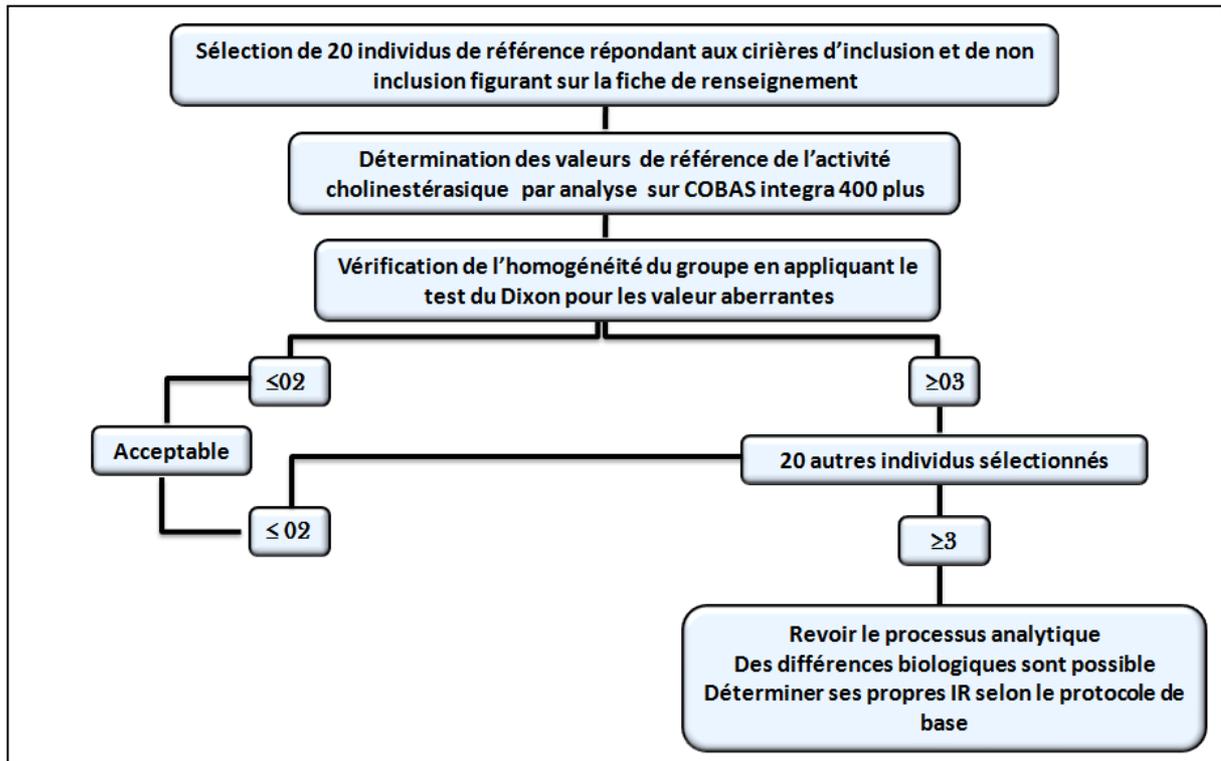


Figure 41 : Schéma de la validation des valeurs de référence

### 3.1 Critères d'inclusion

➤ Des critères communs ont été fixés pour les trois classes, ont été inclus dans l'étude des personnes :

- En bonne santé, ne présentant ni :
  - De maladies aiguës ;
  - De maladies chroniques;
  - Problèmes hépatiques et rénaux ;
  - Anémies ;
  - Troubles neuromusculaires ;
  - N'ayant pas été hospitalisé dans le mois précédent ;
  - N'ayant pas subi de curarisation ;
  - N'ayant pas pris de médicament 10 jours avant.

➤ En plus des critères cités précédemment, des critères d'inclusion ont été également fixés pour chaque classe :

- Pour la première classe, ont été inclus :
  - Les hommes adultes (âgé de plus de 18 ans) ;
- Pour la deuxième classe ont été incluses :

- Les femmes âgées entre 16 et 39 ans ;
- Les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.
- Pour la troisième classe ont été incluses :
  - Les femmes âgées entre 18 et 41 ans ;
  - Les femmes enceintes de plus de 3 mois.

### 3.2. Critères de non inclusion

Des critères de non inclusion communs aux trois classes ont été fixés

- Exposition aux pesticides (organophosphorés ou carbamates)

C'est ainsi que les 60 personnes constituant nos trois classes ont été retenues.

### 4. Analyse statistique

- Les résultats sont classés dans un fichier Excel en trois classes.
- Le test de Dixon est appliqué pour l'élimination des valeurs aberrantes ;
- Pour les variables quantitatives on a calculé les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types, valeur minimale, valeur maximale, la médiane, 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> quartile.
- Pour les variables qualitatives, on a calculé les pourcentages.
- Pour les calculs des moyennes, écarts-types, médiane, pourcentages, quartiles, on a utilisé le logiciel Microsoft EXCEL 2007.
- Pour la présentation des graphes on a utilisé l'EXCEL et le logiciel DISPLAYR en ligne.
- Étude de corrélation avec le logiciel : INSTAT3

### 5. Critères de jugement

#### 5.1. Pour les intervalles de référence de l'activité cholinestérasique

➤ Les intervalles de références à vérifier sont acceptés si le nombre de résultats en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.

➤ Une nouvelle sélection de 20 échantillons biologiques est analysée si le nombre de résultats en dehors des limites proposées est égal à 3 : le même protocole que précédemment est appliqué. Dans ces conditions, les intervalles de référence à vérifier sont acceptés si le nombre de résultats de la nouvelle sélection en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.

➤ Dans le cas où 4 résultats ou plus sont en dehors des limites proposées, il est conseillé de revoir la procédure analytique, d'envisager la présence de possibles différences biologiques

et/ou démographiques et de déterminer les intervalles de référence de la méthode utilisée suivant le protocole originel

➤ Intervalles de référence

- Femmes à partir de 40 ans, enfants, hommes : 5320-12 920 U/L (89-215 ukat/l)
- Femmes (de 16 à 39 ans) ne présentant pas de grossesse et ne prenant pas de contraceptifs oraux : 4260-11250 U/L (71-187 ukat/l)
- Femmes de (18 à 41 ans) enceintes ou sous contraceptifs oraux : 3650-9120 U/L (61-152 ukat/l)

### 5.2. Pour l'indice de masse corporelle (IMC)

Permet d'évaluer rapidement la corpulence simplement avec le poids et la taille, quel que soit le sexe.

C'est le seul indice validé par l'Organisation mondiale de la santé pour évaluer la corpulence d'un individu et donc les éventuels risques pour la santé. L'IMC permet de déterminer si l'on est en situation de maigreur, de surpoids ou d'obésité par exemple. Il se calcule simplement en divisant le poids (en kg) par le carré de la taille (m). Dans le tableau qui suit les 4 grandes classes selon la valeur calculé obtenue :

**Tableau 18** : L'interprétation de l'IMC selon l'OMS

<b>L'indice de masse corporelle (IMC)</b>	<b>Interprétation (d'après l'OMS)</b>
<b>Insuffisance pondérale</b>	<18,5
<b>Corpulence normale</b>	[18,5-24,9]
<b>Surpoids</b>	[25-29,9]
<b>Obésité</b>	≥30

## 6. Matériels

### 6.1. Matériels utilisés pour les prélèvements

- Tubes secs en plastique et héparinés (héparinate de lithium) de 4 ml ;
- Epicrâniennes de taille G20 ;
- Gants et garrots en plastique ;
- Alcool chirurgical à 90° et coton pour la désinfection ;
- Sparadrap ;

- Portoirs ;
- Une glacière

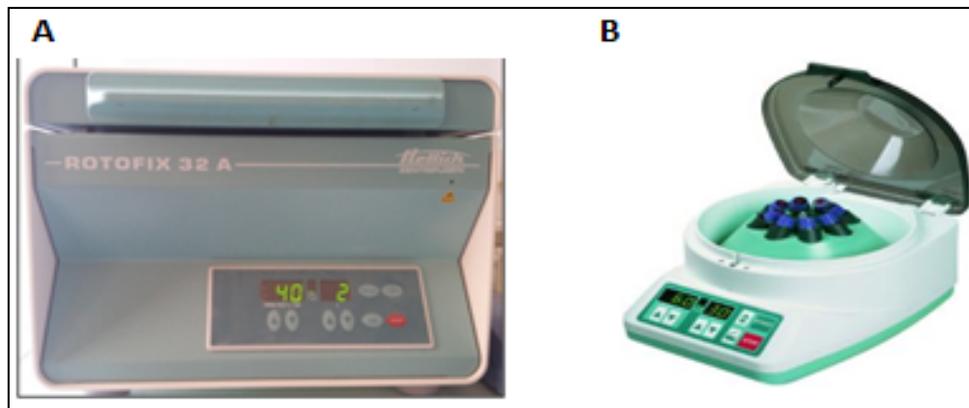
### 6.2. Matériels pour l'analyse

- Godets ;
- Un automate COBAS intégra 400<sup>plus</sup> de la marque « Roche » ;



**Figure 42:** Automate COBAS intégra 400<sup>plus</sup>[61]

- Centrifugeuses (ROTOFIX 32 A, EBA 20)



**Figure 43 :** A : Centrifugeuse ROTOFIX 32A. B : Centrifugeuse EBA 20.

- Des micropipettes (PIPETMAN GILSON réglable 1000 ul)



**Figure 44 :** Micropipette PIPETMAN GILSON

- Embouts de pipettes ;



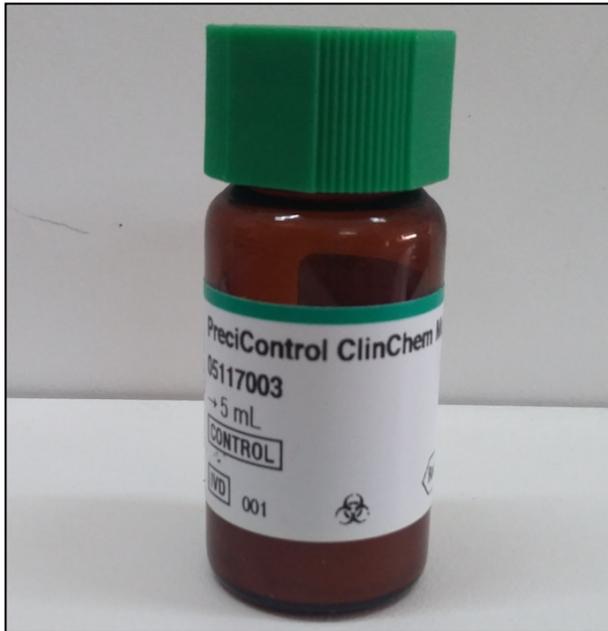
**Figure 45 :** Embouts de pipettes

- Un réactif chimique prêt à l'emploi : Cholinesterase Gen 2 (**CHE2**)
  - **Composition :** substrat butyrylthiocholine,
  - **Conservation :** conservé dans une chambre froide entre 2 et 8°C jusqu'à sa date de péremption.
  - **Préparation :** prêt à l'emploi.
  - **Référence :** 04498577 190
  - **Numéro de lot:**33812201
  - **Marque :** Roche



**Figure 46:** Réactif Cholinestérase Gen 2 (CHE2)

- Deux contrôles : PreciControl ClinChem Multi 1 (PCC1)  
PreciControl ClinChem Multi 2 (PCC2)
  - **Composition :** Lyophilisat à base de sérum humain
  - **Conservation :** Conservés dans une chambre froide entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution les constituants sont stables pendant :
    - 12h (15 à 25C°)
    - 5 jours (2 à 8)
    - 28 jours (-25 à -15)
  - **Préparation :** introduire 5 ml d'eau distillée ou désionisée et dissoudre le contenu dans un délai de 30 mn.



Référence : **05117003190**

Numéro de lot: **19110208**

Marque : **Roche**

**Figure 47:** PreciControl ClinChem Multi 1 (PCC1)



Référence : **05117216190**

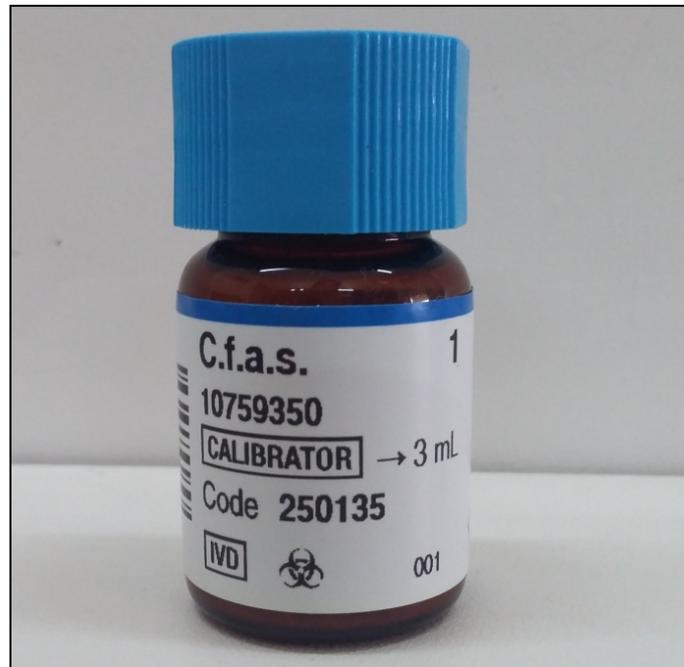
Numéro de lot: **19111101**

Marque : **Roche**

**Figure 48:** PreciControl ClinChem Multi 2 (PCC2)

- Calibrateur : Calibrator For Automated Systems (C .f. a .s)
  - **Composition** : Lyophilisat à base de sérum humain
  - **Conservation** : Conservé dans une chambre froide entre 2 et 8°C jusqu'à sa date de péremption

- **Préparation** : liquide prêt à l'emploi
- **Référence** : 10759350 190
- **Numéro de lot**: 25013501
- **Marque** : Roche



**Figure 49:** Calibrator For Automated Systems (C .f. a .s)

## 7. Protocole opératoire

### 7.1. Etape pré-analytique

Elle concerne la préparation du sujet pour le prélèvement, la collecte des échantillons, la centrifugation et la récupération des plasmas avant l'analyse.

L'étape pré analytique est très importante et déterminante, elle a été effectuée de la même manière pour tous les sujets et tous les échantillons afin de garantir la validité des résultats.

L'objectif étant d'uniformiser la procédure pour tous les prélèvements afin de minimiser les variations des résultats.

#### 7.1.1. Fiche de renseignements :

C'est un formulaire contenant des données relatives au sujet, présenté sous forme d'un questionnaire qui doit être remplie soigneusement avant le prélèvement sanguin et elle contient :

- Questions relatives aux critères d'inclusions et d'exclusions ;
- Identification de participant : Nom, prénom, âge, résidence ;

- Données anthropométriques : Taille, poids ;
- Date et l'heure du prélèvement.

### 7.1.2. Déroulement du prélèvement

- Les prélèvements se sont déroulés au niveau du CHU NEDIR MOHAMED de TIZI OUZOU, au sein de trois services à savoir le service de microbiologie, service de toxicologie et le centre de transfusion sanguin et au niveau de la clinique de la nouvelle ville de Tizi Ouzou le matin entre 9 heures et 11 heures ;
- Après la préparation du matériel de prélèvement, une vérification de l'identité du patient est effectuée et la fiche de renseignement est soigneusement remplie.
- Si la personne répond aux critères d'inclusion un prélèvement est réalisé par ponction veineuse pli du coude ;
- Cette analyse nécessite un prélèvement sur un tube hépariné, ce dernier est mélangé soigneusement après son remplissage ;
- L'étiquetage des tubes a été fait systématiquement après le prélèvement et l'heure du prélèvement a été mentionnée sur la fiche de renseignement.

### 7.1.3. Centrifugation

- Une fois les prélèvements réalisés, une centrifugation des échantillons est effectuée dans l'immédiat pendant 2 à 5 mn à 3460 tours par min ;
  - Pour les prélèvements effectués au niveau de CHU NEDIR de TIZI OUZOU (service microbiologie) la centrifugation est effectuée au laboratoire de biochimie ;
  - Pour les prélèvements effectués au service de toxicologie ou au CTS, la centrifugation est effectuée au laboratoire de toxicologie ;
  - Pour les prélèvements effectués à l'établissement public de santé de proximité de Draa Ben Khedda Tizi-Ouzou, la centrifugation est effectuée au laboratoire de biochimie de cet établissement.
- Après centrifugation le plasma est récupéré dans un tube sec.
- Les plasmas présentant une hémolyse à l'œil nu sont rejetés.

#### 7.1.4. Transport

L'objectif principal est d'acheminer les échantillons à analyser au laboratoire sans altération et dans les plus brefs délais. La durée de transport des tubes prélevés est la plus faible possible :

- Pour les prélèvements effectués au niveau de CHU NEDIR de TIZI OUZOU (service microbiologie), ils ont été acheminés au laboratoire de biochimie immédiatement.
- Pour les prélèvements effectués au service de toxicologie, CTS ou à l'EPSP DBK de Tizi Ouzou, ils ont été transportés dans une glacière dans un délai de moins d'une demi-heure, à l'abri de la lumière et en position verticale pour éviter toute altération possible au laboratoire de biochimie.

#### 7.2. Etape analytique

L'analyse des échantillons a été faite par COBAS intégra 400<sup>plus</sup> au niveau du laboratoire de biochimie du CHU NEDIR MOHAMED de TIZI OUZOU.

##### 7.2.1. Programmation

Une fois les prélèvements arrivés au laboratoire de biochimie, le contenu des tubes secs est transvasé dans des godets et mis dans les portoirs du COBAS INTEGRA 400<sup>plus</sup> et les échantillons sont programmés.

##### 7.2.2. Présentation de l'appareil :

Cet instrument permet de doser des enzymes, des substrats, des protéines spécifiques, des médicaments et des drogues. En fonction des paramètres, les dosages se réalisent sur du sérum, du plasma ou de l'urine.

Le COBAS Intégra est un appareil de chimie liquide, les réactifs sont contenus dans des cassettes à l'intérieur de l'automate dans un compartiment réfrigéré. Ce système possède de nombreux avantages : il est rapide ce qui permet de travailler en urgence mais il convient également très bien pour la routine. C'est un appareil autonome qui effectue lui-même la plupart de ses maintenances et les dilutions des échantillons.

**Tableau 19:** Quelques spécifications de système COBAS INTEGRA 400<sup>plus</sup>.

<b>Principe de mesure</b>	Intégration de quatre principes de mesure : Photométrie d'absorption, turbidimétrie, polarimétrie de fluorescence, potentiométrie directe et indirecte.
<b>Système</b>	Système d'analyse à accès aléatoire et sélection d'échantillons. 36 tests à bord.
<b>Types d'échantillon</b>	Sérum, plasma, urine, liquide céphalo-rachidien, hémolysat et sang total (HbA1c).
<b>Types de substance</b>	Enzymes, substrats, protéines spécifiques, drogues, médicaments et électrolytes.
<b>Volume d'échantillon</b>	Normalement 2 à 10 µl par test.
<b>Dimensions</b>	Largeur : 135 cm, Profondeur : 66 cm et Hauteur : 75 cm.
<b>Conditions d'utilisation</b>	Thermorégulation des calibrateurs, contrôles et échantillons dans le système, Compartiment pour réactifs réfrigéré de 10 à 15 °C.

### 7.2.3. Principe de mesure de l'automate

Les dosages effectués sur COBAS integra 400<sup>plus</sup> reposent sur plusieurs principes de mesure différents, il intègre quatre principes de mesure : Photométrie d'absorption, turbidimétrie, polarimétrie de fluorescence, potentiométrie directe et indirecte, nous détaillons la photométrie d'absorption utilisée pour la mesure des cholinestérases.

#### – Principe de la photométrie d'absorption :

La photométrie est une méthode d'analyse basée sur le fait que les substances colorées absorbent une partie du spectre lumineux. Lorsqu'un rayon lumineux traverse une substance, une partie de la lumière traverse la solution, une autre est absorbée par les particules en solution et une petite partie est dispersée. La photométrie va s'intéresser à la partie du spectre lumineux qui est absorbée par la substance. L'absorbance d'une solution est proportionnelle à l'épaisseur de la solution et à sa concentration. Lorsque la lumière passe à travers une substance colorée, l'intensité de la lumière est réduite et cette diminution se fait en fonction de la substance et de l'épaisseur traversée. Cette relation est définie par la loi de Beer-Lambert :

$$A = C \times d \times \varepsilon$$

Tel que :

- A= Absorbance,
- C= Concentration en mol/l,
- d= Trajet optique en cm,
- $\epsilon$ = Coefficient d'absorbance molaire).

Cette équation prend en compte le coefficient d'absorbance molaire. C'est une constante spécifique à chaque substance mesurée mais dépendant de la longueur d'onde utilisée. Si le coefficient est connu, on peut appliquer directement la formule de Beer -Lambert pour calculer la concentration d'une substance à partir de son absorbance. Sinon étant donné que la loi de Beer -Lambert démontre la linéarité de la relation entre l'absorbance et la concentration, on peut également calculer la concentration d'un échantillon en introduisant un calibrateur de concentration connue dans la série.

$$A_{\text{calibrateur}} / C_{\text{calibrateur}} = A_{\text{échantillon}} / C_{\text{échantillon}}.$$

Les calculs de concentration avec ou sans étalon sont possibles uniquement dans la zone de loi de Beer-Lambert, la zone où l'absorbance de la substance est proportionnelle à sa concentration. C'est ce qu'on définit comme la limite de linéarité qui est déterminée en effectuant une courbe de calibration.

Le photomètre est constitué de plusieurs éléments :

- Une source lumineuse : La stabilité est un élément primordial car l'énergie de la source ne doit pas varier au cours d'une mesure. Il existe plusieurs sortes de lampe. Sur l'Intégra, on retrouve une lampe halogène qui fournit un spectre dans le visible et dans le proche UV.
- Une fente d'entrée : Cette ouverture permet de concentrer le faisceau lumineux et de sélectionner sa largeur ou sa surface. Elle assure également le parallélisme du faisceau, ce qui donne un meilleur fonctionnement des filtres et des réseaux.
- Un monochromateur : Il permet de séparer une radiation de longueur d'onde définie à partir d'un mélange de radiations lumineuses, c'est-à-dire de décomposer la lumière.
- Une cuve : La qualité des cuves est un élément important. Les cuvettes sont classées par taille, matériaux ou encore selon leur principe de fonctionnement. Pour l'Integra,

on utilise des cuves en plastique acrylique à usage unique et faible coût, leur principal avantage est d'éviter la contamination entre les dosages.

- Le détecteur d'intensité lumineuse : Ce détecteur capte la lumière transmise et mesure l'absorbance. Sur l'Integra, les détecteurs sont des barrettes de diodes. Une barrette de diodes contient plusieurs centaines de diodes et chacune reçoit un rayonnement contenu dans un petit domaine spectral.

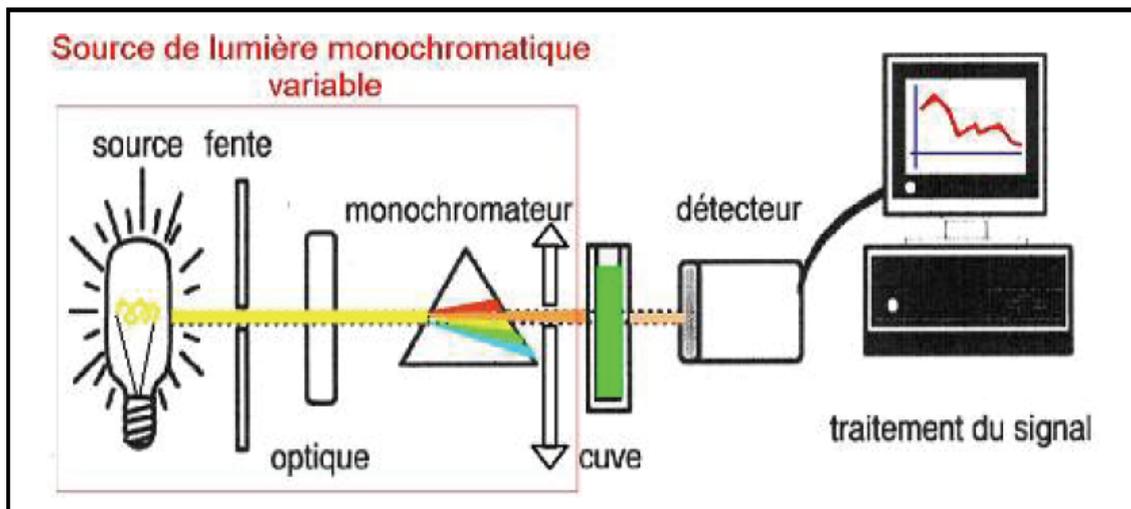
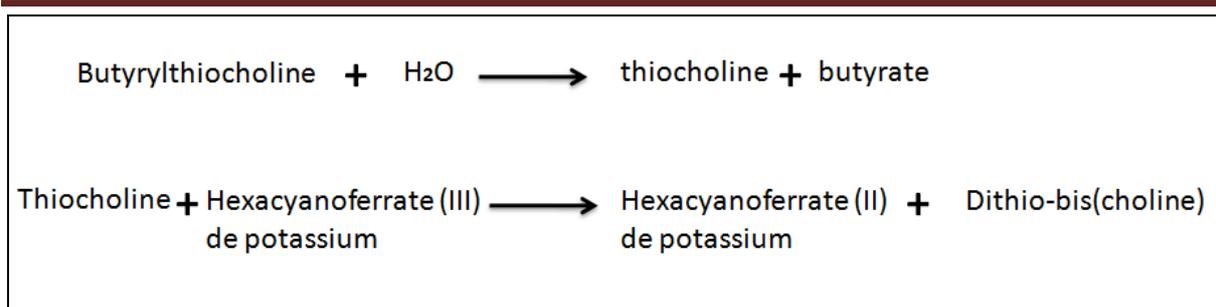


Figure 49: Principe de la Photométrie d'absorption [61]

- **Principe du dosage de l'activité cholinestérasique (BChE) sur COBAS intégra 400 plus :**

La détermination de l'activité des cholinestérasés sur le COBAS integra 400<sup>PLUS</sup> repose sur la réaction d'hydrolyse de la butyrylthiocholine puis quantification du produit de décomposition.

La butyrylcholinestérase hydrolyse la butyrylthiocholine en thiocholine et en butyrate, la thiocholine réduit instantanément l'hexacyanoferrate (III) de potassium de couleur jaune en un hexacyanoferrate (II) incolore. La diminution de la coloration peut être mesurée à des longueurs d'onde entre 405 et 415 nm.



**Figure 50** : Principe de dosage de l'activité cholinestérasique (BChE) sur COBAS intégra 400 plus [Annexe 06]

#### 7.2.4. Domaine de mesure

- Domaine de mesure : 200-14000 U /L (3,34-234 ukat /L)
- Domaine de mesure plus étendu (calculé), facteur de post dilution : 2 recommandé  
200-28000 U /L (3,34-468 ukat /L)
- Limite inférieure de détection : 200 U /L (3,34 ukat /L)
- La limite inférieure de détection correspond au plus faible taux d'analyse mesurable pouvant être distingué de zéro .Elle est obtenue par calcul et correspond au triple de l'écart-type du standards zéro (standard 0 +3s, précision intra – série : n=21)

#### 7.2.6. Précision

Selon le fournisseur, la reproductibilité à été déterminée à l'aide d'échantillons humains et de contrôles selon un protocole interne (précision intra-série n=21, inter-série n=21). Les résultats suivants ont été obtenus :

**Tableau 20**: Précisions de COBAS INTERGRA 400<sup>PLUS</sup>[Annexe 06]

Echantillon	Précision intra-série			Précision inter-série		
	Moyenne U/L	CV ukat /L	CV %	Moyenne U/L	CV ukat /L	CV %
Sérum humain	<b>6374</b>	<b>106</b>	<b>0,5</b>	<b>6675</b>	<b>111</b>	<b>1,4</b>
Precinorm U	<b>6263</b>	<b>105</b>	<b>0,6</b>	<b>6213</b>	<b>104</b>	<b>1,1</b>
Precipath U	<b>6015</b>	<b>100</b>	<b>0,6</b>	<b>5964</b>	<b>100</b>	<b>0,9</b>

### 7.2.7. Calibration

La calibration est un procédé permettant d'établir une relation entre l'absorbance et la concentration du calibre correspondant. En général, l'appareil demande une calibration à chaque nouveau lot de réactif mais ces exigences varient en fonction des paramètres.

Pour effectuer cette courbe, on passe sur l'appareil un standard de concentration connue. L'appareil va effectuer plusieurs dilutions avec le calibre. Chaque dilution est mesurée. Puis, l'automate représente les résultats à l'aide d'un graphique où les concentrations se trouvent sur l'axe des abscisses et les absorbances sur l'axe des ordonnées. Les points correspondants à nos dilutions sont reliés et la zone linéaire sera représentée par cette droite. La zone linéaire commence à la limite de détection et finit par la limite de linéarité. La limite de linéarité est très importante car en dehors de ces limites, la concentration n'est plus proportionnelle à l'absorbance et les résultats sont faux.

### 7.2.8. Contrôle

La validation d'un automate comprend une phase initiale avant son utilisation en routine, une phase de vérification continue et de confirmation des performances pour contrôler la qualité du processus analytique et donc des résultats lors du fonctionnement quotidien.

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent des contrôles normaux et pathologiques pour chaque test au moins quotidiennement afin de surveiller le processus analytique. Si le test est stable moins de 24 heures ou suite à une modification capable d'affecter potentiellement la stabilité du test, des contrôles doivent être passés plus fréquemment.

Des contrôles ont été effectués avant chaque analyse de l'activité cholinestérasique. Et l'analyse est effectuée uniquement si les valeurs retrouvées sont incluses dans l'intervalle fourni par Roche pour COBAS :

- Pour le PCC 1 :
  - Intervalle : **4710-6810 U/L**
  - Valeur cible : **5760U/L**
- Pour le PCC2 :
  - Intervalle : **7090-5450U/L**
  - Valeur cible : **8650U/L**

### **8. Ethique**

Avant tout recrutement d'individu, nous avons procédé à l'explication de l'objectif et l'intérêt de notre étude afin d'obtenir de sa part un consentement.

Une fois que le sujet marque son accord, nous procédons au questionnaire pour le remplissage de la fiche de renseignement et ensuite au prélèvement.

**CHAPITRE II :**  
**RÉSULTATS**

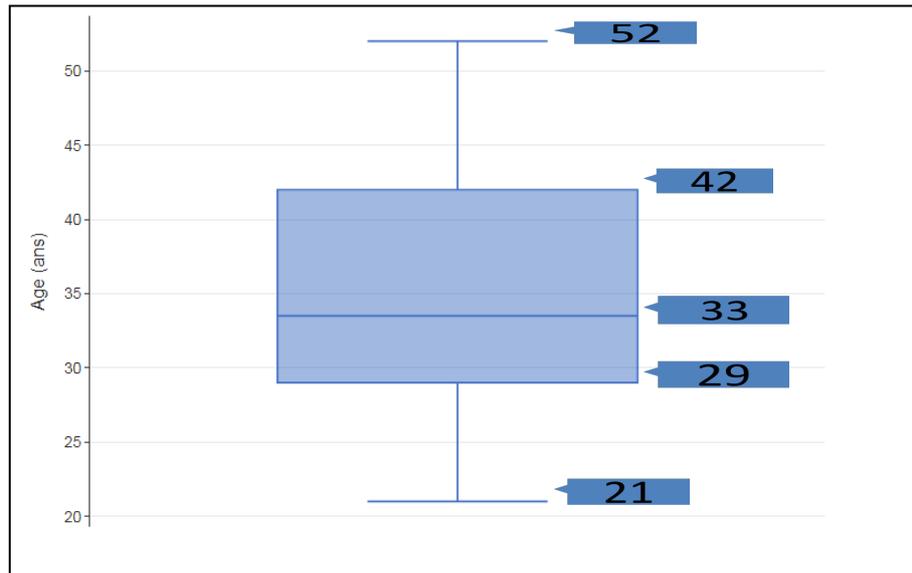
## 1 Caractéristiques de la population

### 1.1. Distribution selon l'âge

#### 1.1.1. Hommes

La moyenne d'âge chez les hommes est de  $35.3 \pm 10$  ans avec des extrêmes variantes de 21 à 52 ans.

75% des hommes de l'étude avaient un âge compris entre 21 et 42 ans. (Graphe 1)

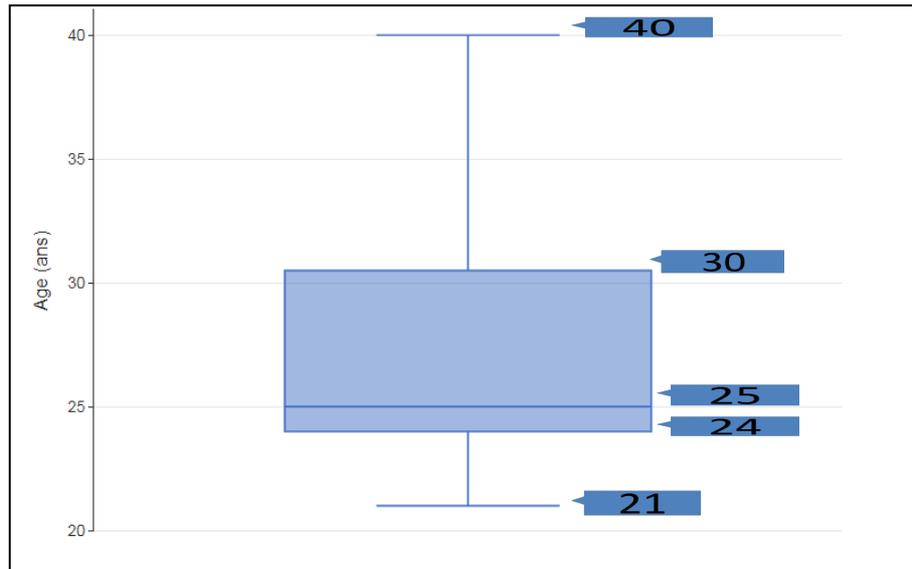


**Graphe 01:** Répartition du groupe des hommes selon l'âge.

#### 1.1 .2. Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

La moyenne d'âge chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux est de  $27.8 \pm 5$  ans avec des extrêmes variant de 21 à 40 ans.

75% des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux de l'étude avaient un âge entre 21 et 30,5 ans.(Graphe 02)

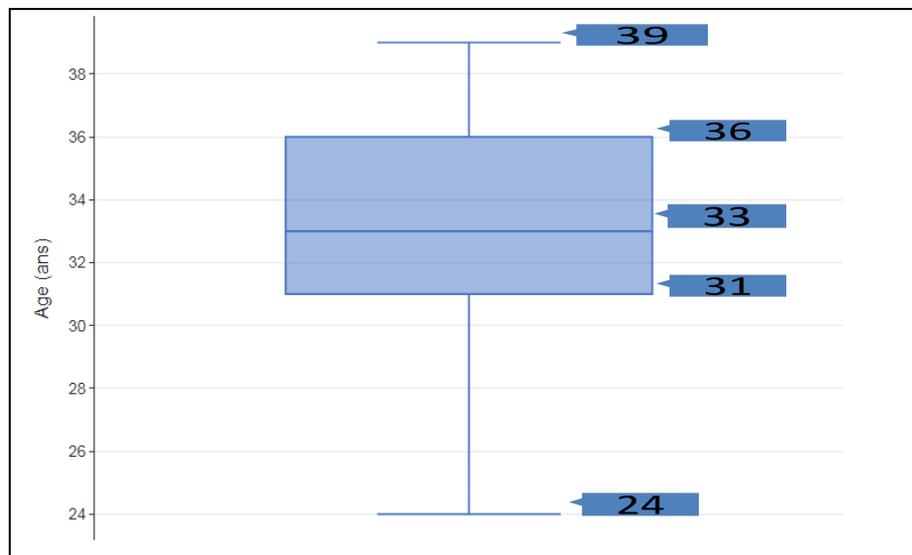


**Grphe 02:** Répartition du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux selon l'âge.

### 1.1.3. Femmes enceintes

La moyenne d'âge chez les femmes enceintes est de  $33.2 \pm 4$  ans avec des extrêmes variant de 24 à 39 ans.

75% des femmes enceintes de l'étude avaient un âge entre 24 et 36 ans. (Grphe 03)



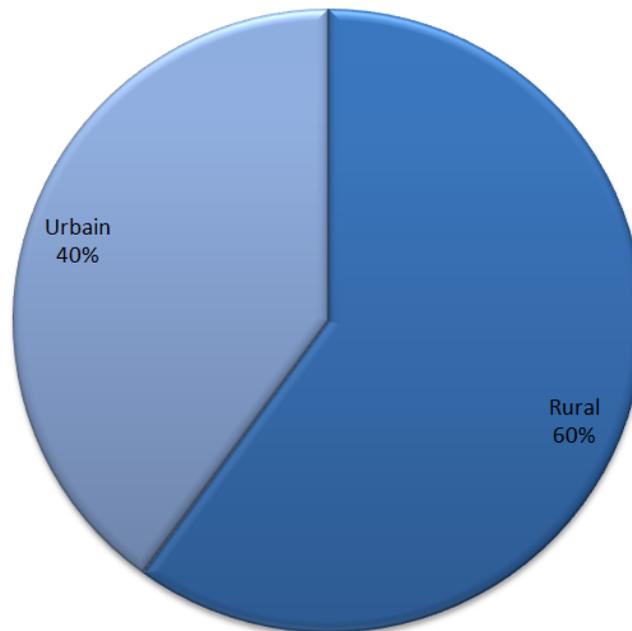
**Grphe 03 :** Répartition du groupe des femmes enceintes selon l'âge

## 1.2. Répartition géographique

Toutes les personnes de cette étude étaient originaires de TIZI OUZOU, BOUMERDES ou de BOUIRA.

### 1.2.1 .Hommes

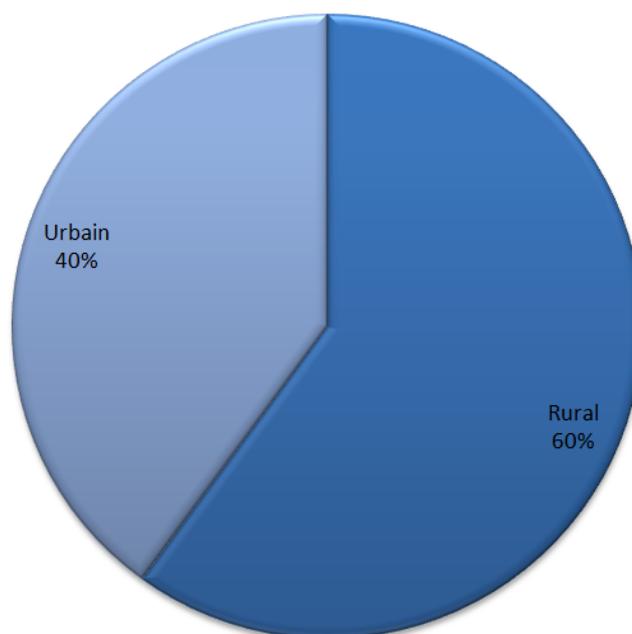
60% des hommes de l'étude habitaient en milieu rurale contre 40% qui habitaient en milieu urbain. (Graphe 04)



**Grappe 04** : Répartition géographique du groupe des hommes.

### 1.2 .2.Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

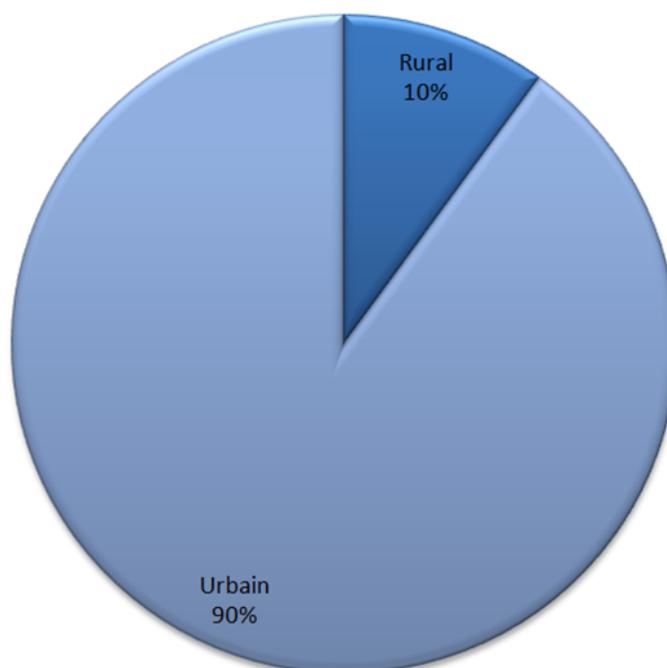
60% des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux de l'étude habitaient en milieu rurale contre 40% qui habitaient en milieu urbain.(Graphe 05)



**Graph 05:** Répartition géographique du groupe des femmes non enceintes non sous contraceptifs.

### 1.2.3 .Femmes enceintes

90% des femmes enceintes de l'étude habitaient en milieu urbain.



**Graph 06:** Répartition géographique du groupe des femmes enceintes.

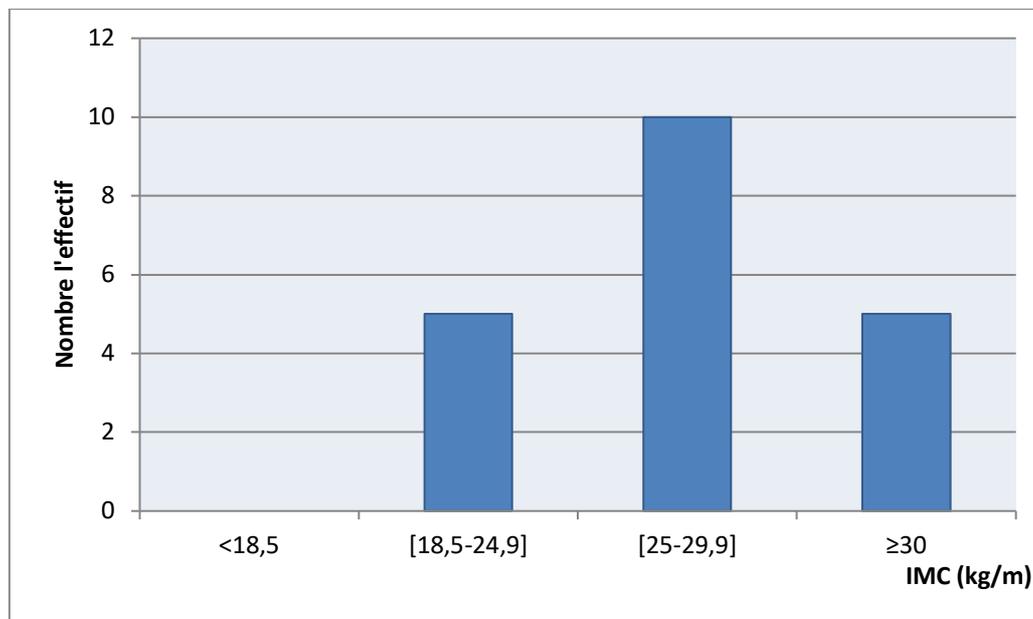
### 1.3. Distribution selon l'indice de masse corporelle (IMC)

#### 1.3.1. Hommes

La tranche « Surpoids » est la tranche dominante chez les hommes, 75 % du groupe sont en surpoids ou obèse. (Graphe 07, Tableau 21)

**Tableau 21** : Distribution du groupe des hommes selon l'IMC

L'interprétation (selon l'OMS)	IMC (kg /m)	Nombre d'effectif
Insuffisance pondérale	<18,5	0
Corpulence normale	[18,5-24,9]	5
Surpoids	[25-29,9]	10
Obésité	≥30	5



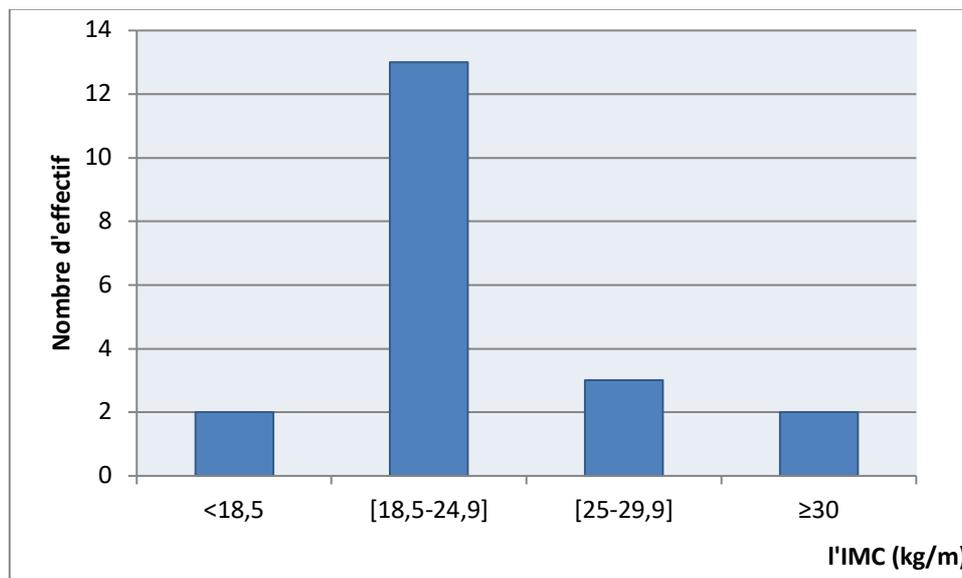
**Graphe 07** : Distribution du groupe des hommes selon l'IMC.

#### 1.3.2. Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

La tranche « corpulence normale » est la tranche dominante chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux, cette tranche représente 65% de l'effectif total.

**Tableau 22:** Distribution du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux des selon l'IMC

L'interprétation (selon l'OMS)	IMC (kg /m)	Nombre d'effectif
Insuffisance pondérale	<18,5	2
Corpulence normale	[18,5-24,9]	13
Surpoids	[25-29,9]	3
Obésité	≥30	2

**Graphe 08 :** Distribution du groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux selon l'IMC

## 2 .Résultats

### 2.1. Résultats de l'activité cholinestérasique

#### 2 .1.1. Hommes

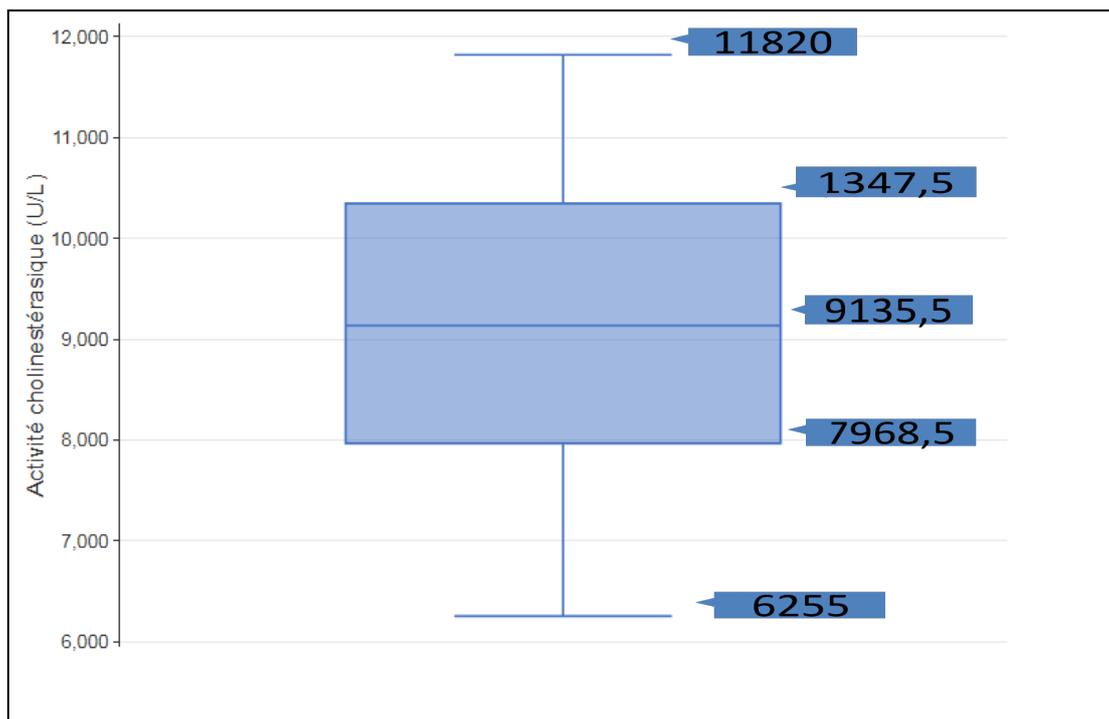
La moyenne des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique chez les hommes est de 9180,2 U /L± 1428,75 avec des extrêmes variantes de 6255 à 11820 U/L.(Tableau 23)

75% des hommes de l'étude ont une valeur comprise entre 6255 et 10347,5U /L.(Graphe 09)

Les valeurs de l'activité cholinestérasique retrouvées en annexe III.

**Tableau 23** : Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique pour le groupe des hommes

<b>Nombre de prélèvement</b>	20
<b>Valeur minimale</b>	6255
<b>1<sup>er</sup> quartile</b>	7968,5
<b>Médiane</b>	9135,5
<b>3<sup>ème</sup> quartile</b>	10347,5
<b>Valeur maximale</b>	11820
<b>Moyenne</b>	9180,2
<b>Ecart type</b>	1428,75
<b>Coefficient de variation %</b>	0,155%

**Graph 09** : Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des hommes

**2 .1.2. Femmes non enceintes ne prenant pas de contraceptifs oraux**

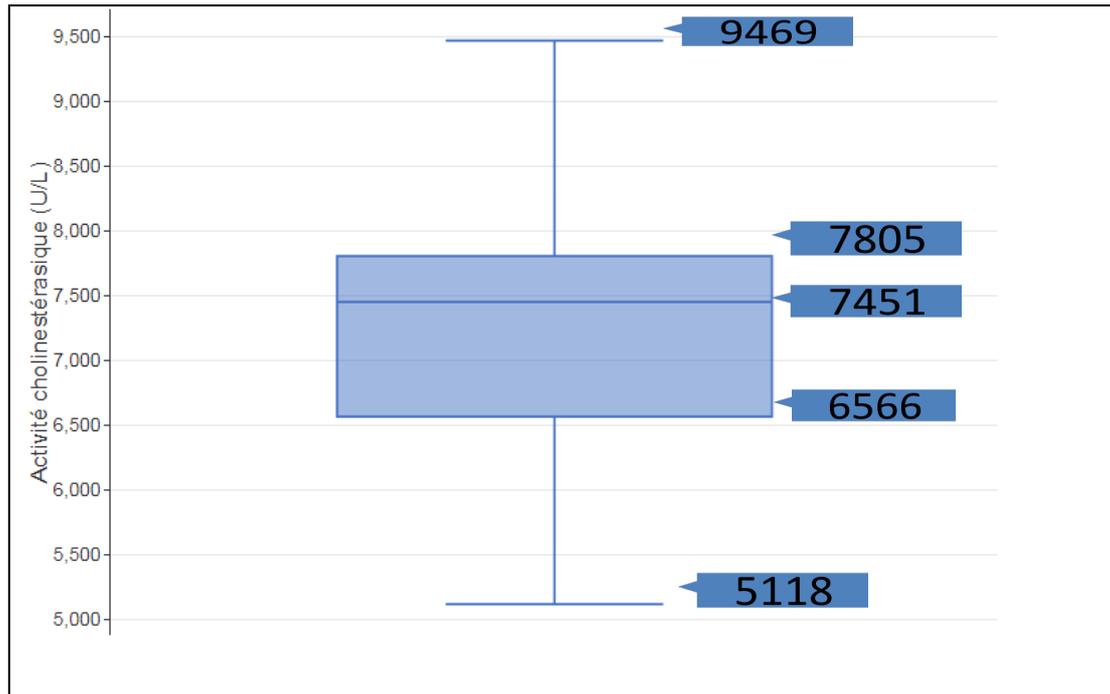
La moyenne des valeurs de l'activité cholinestérasique chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux est de 7349,75 U /L±1069,36 avec des extrêmes variantes de 5118 à 9469U/L. (Tableau 24)

75% des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux de l'étude avaient une valeur comprise entre 5118 et 7805U /L. (Graphe 11)

Les valeurs de l'activité cholinestérasique retrouvées en annexe IV.

**Tableau 24** : Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique pour groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.

<b>Nombre de prélèvement</b>	20
<b>Valeur minimale</b>	5118
<b>1<sup>er</sup> quartile</b>	6566
<b>Médiane</b>	7451
<b>3<sup>ème</sup> quartile</b>	7805
<b>Valeur maximale</b>	9469
<b>Moyenne</b>	7349,75
<b>Ecart type</b>	1069,36
<b>Coefficient de variation%</b>	0,14%



**Graphe 10 :** Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.

### 2.1 .3. Pour les femmes enceintes

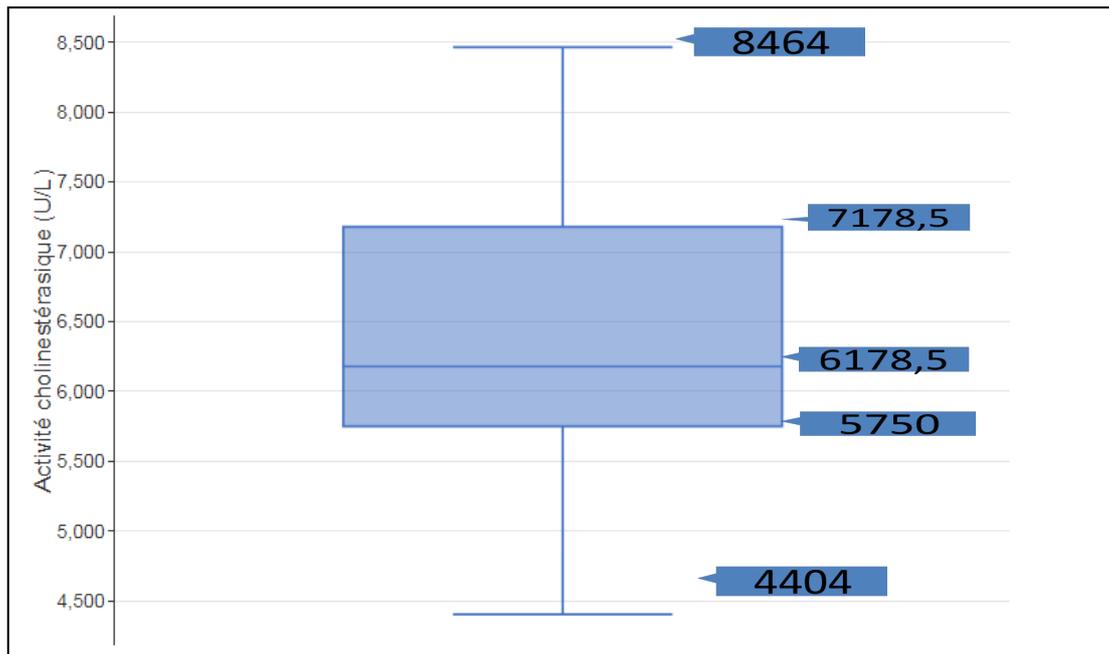
La moyenne des valeurs de l'activité cholinestérasique chez les femmes enceintes est de  $6383,6 \text{ U/L} \pm 1139,408$  avec des extrêmes variantes de 4404 à 8464U/L. (Tableau 25)

75% des femmes enceintes de l'étude ont une valeur comprise entre 4404 et 7178,5U /L (Graphe 11)

Les valeurs de l'activité cholinestérasique retrouvées en annexe V.

**Tableau 25:** Paramètres de distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique de la classe des femmes enceintes

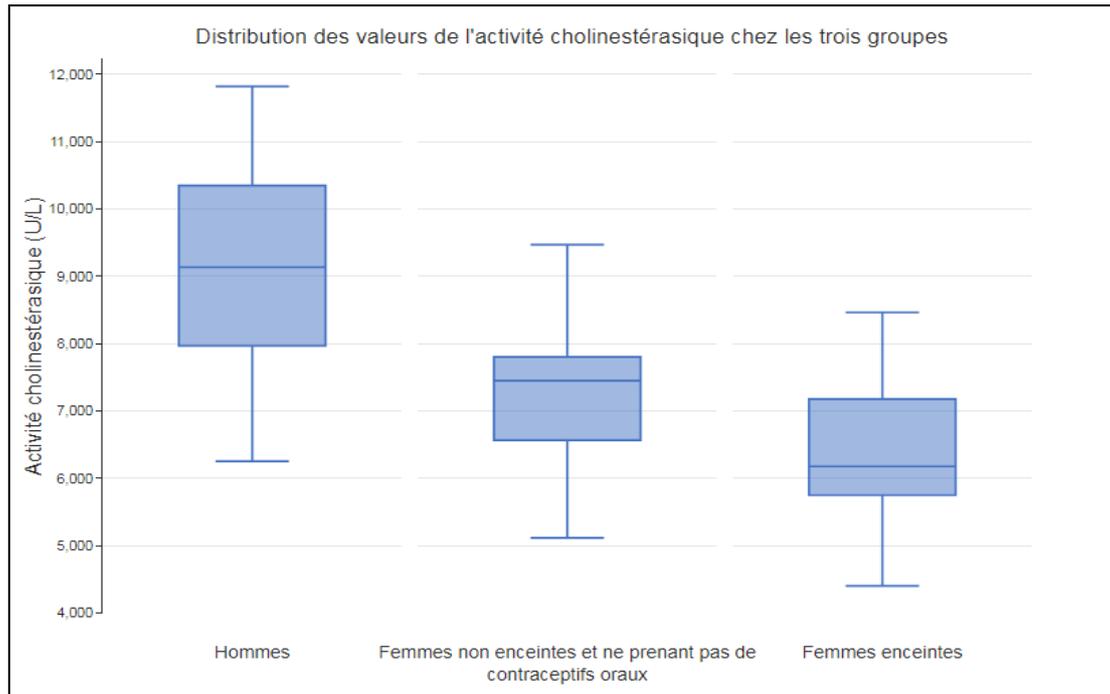
<b>Nombre de prélèvement</b>	20
<b>Valeur minimale</b>	4404
<b>1<sup>er</sup> quartile</b>	5750
<b>Médiane</b>	6178,5
<b>3<sup>ème</sup> quartile</b>	7178,5
<b>Valeur maximale</b>	8464
<b>Moyenne</b>	6383,6
<b>Ecart type</b>	1139,408
<b>Coefficient de variation</b>	0,178%



**Graphe 11 :** Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique pour le groupe des femmes enceintes.

#### 2.1 .4. Pour les trois groupes

Les valeurs de l'activité cholinestérasique de l'étude chez les trois groupes se distribuent d'une façon tel que : Celles retrouvées chez les hommes sont plus élevées (Min : 6255U/L, Max : 11820U/L) que celles retrouvées chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux (Min : 5118U/L, Max : 9469U/L) et ces dernières sont plus élevées que celles retrouvées chez les femmes enceintes (Min : 4404U/L, Max : 8464U/L).(graphe 12)



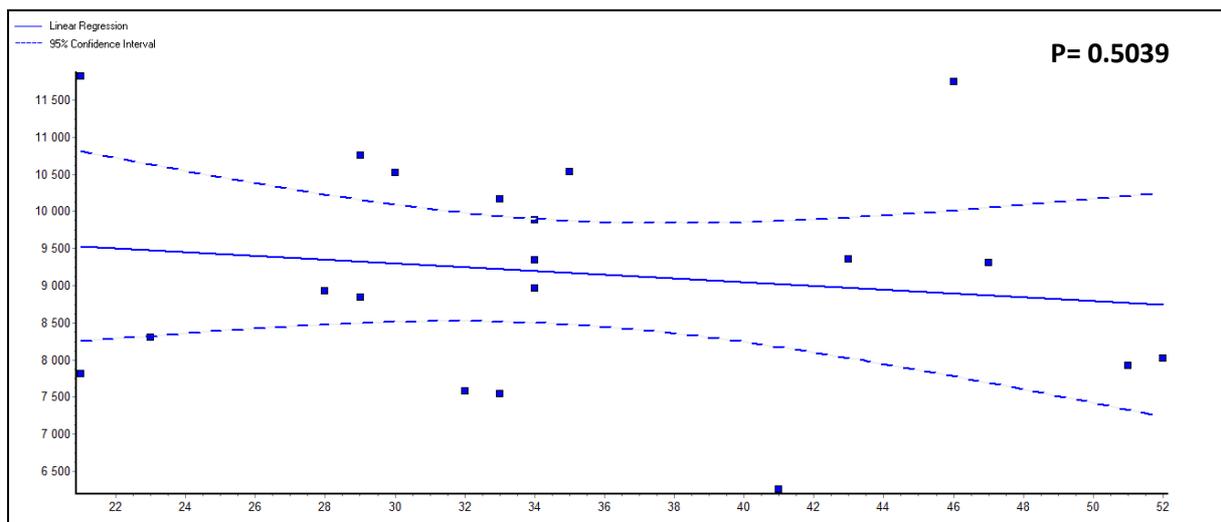
**Graph 12 :** Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique pour les trois groupes

## 2.2. Étude de corrélation

### 2.2.1. Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge

#### a. Hommes

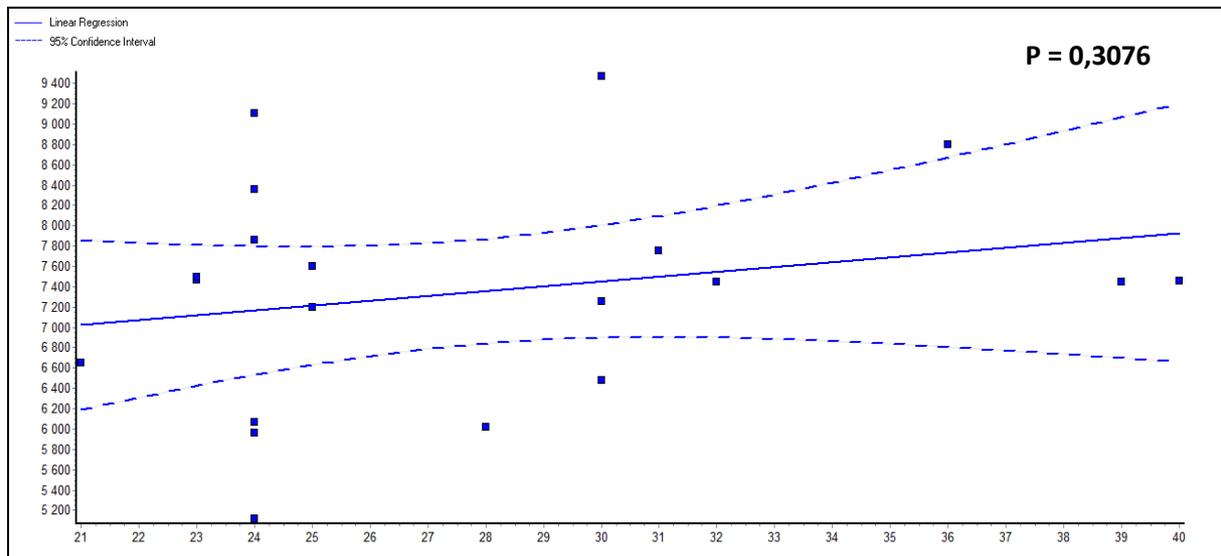
La corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge pour le groupe des hommes est non significative ( $P=0.5039$ ) (Graph 13) (Voir résultats statistiques en annexe VII)



**Graph 13 :** Étude de corrélation de l'âge avec l'activité cholinestérasique chez le groupe des hommes

### b. Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

La corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge pour le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux est non significative. ( $P=0.3096$ ) (Graphe 14)(Voir résultats statistiques en annexe VIII)

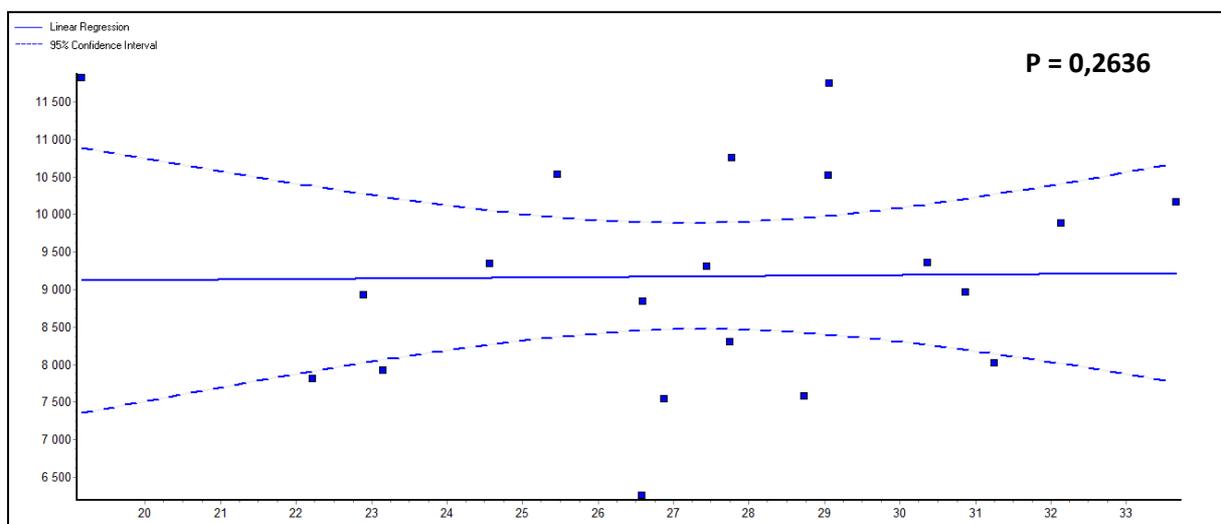


**Grappe 14 :** Étude de corrélation de l'âge avec l'activité cholinestérasique chez le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

### 2.2.2. Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC

#### a. Hommes

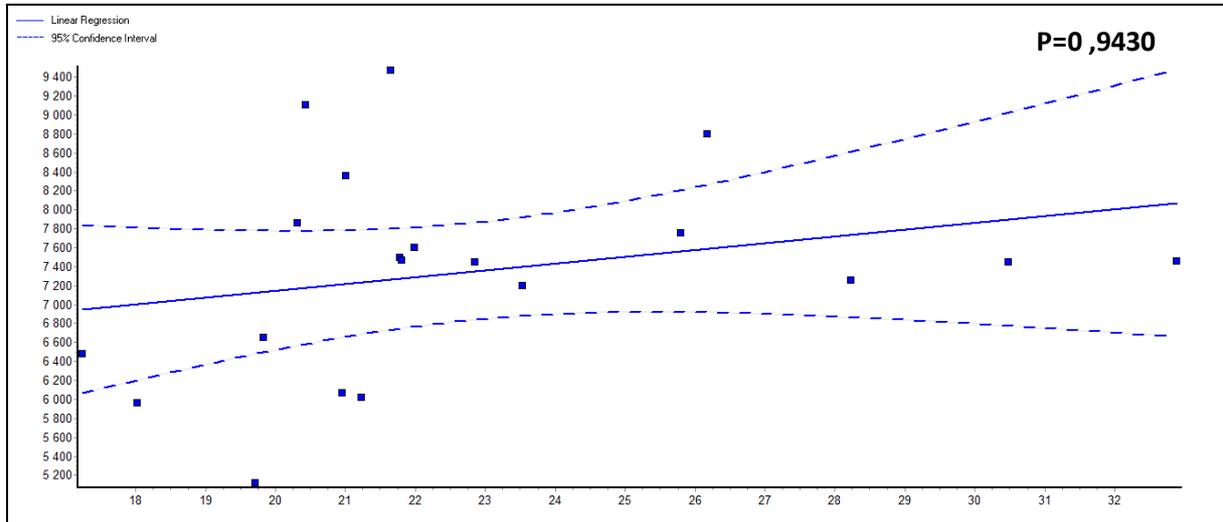
La corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC pour le groupe des hommes est non significative. ( $P=0.2636$ ) (Graphe 15) (Voir résultats statistiques en annexe IX)



**Grappe 15 :** Étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC chez le groupe des hommes

**b. Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux**

La corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC pour le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux est non significative. ( $P=0.9430$ ) (Graphe 16) (Voir résultats statistiques en annexe X)



**Grappe 16:** Étude de corrélation de l'IMC avec l'activité cholinestérasique chez le groupe des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

# **DISCUSSIONS**

---

L'étude consiste en la validation de l'IR de l'activité cholinestérasique chez les hommes adultes, les femmes enceintes ainsi que les femmes non enceintes ne prenant pas de contraception orale sur COBAS intégra 400<sup>plus</sup>. Pour cela un procédé de sélection d'un nombre de 20 personnes pour chaque groupe a été réalisé, ce dernier est le nombre qu'exige le protocole de validation des intervalles de référence au laboratoire de biologie médicale selon les recommandations internationales de l'IFCC LM et du CLSI.

### 1. Contraintes

- Le manque de sources pour la recherche bibliographique a empêché l'accès à des articles qui aurait été d'une grande utilité.
- La sélection d'un groupe de référence constitue la tâche la plus difficile lors de l'établissement et de la validation des intervalles de référence car la définition de l'état de « bonne santé » est particulièrement complexe à établir et suppose qu'une multitude de conditions soient réunies. Une sélection faite par l'anamnèse ne permet pas de trancher sur l'état de bonne santé des individus sélectionnés vu que les examens complémentaires n'ont pas été faits ;
- Il est difficile de sélectionner sur un nombre forcément restreint un groupe d'individus représentatif, un déplacement vers plusieurs unités a été nécessaire pour pouvoir faire une sélection des personnes exigées à savoir le centre de transfusion sanguin (CTS), à l'établissement public de santé de proximité de Draa Ben Khedda Tizi-Ouzou particulièrement pour les femmes enceintes ainsi que le laboratoire de microbiologie ;
- Il n'y pas de salle de prélèvement prévue pour les prélèvements au niveau de l'hôpital, ce qui a vraiment ralenti le déroulement des prélèvements.
- Des pannes techniques rencontrées au cours de l'étape pré-analytique du dosage (calibration) ont eu pour conséquence l'altération des prélèvements (délai de dosage dépassé) de la première sélection de groupe des hommes. Une nouvelle sélection pour ce groupe a été nécessaire ;
- L'étude de corrélation des résultats de l'activité cholinestérasique avec l'IMC et avec l'âge chez la femme enceinte n'ont pas été fait car l'interprétation des corrélations dans de ce cas est délicate vu que :
  - La grossesse est un état physiologique particulier durant laquelle il y a une augmentation physiologique du poids de la femme en fonction de l'âge de la grossesse ;

- Toutes les femmes de l'étude appartiennent à une seule classe d'âge « en âge de procréer »

## 2. Validation des intervalles de référence.

Les intervalles de références à vérifier sont acceptés si le nombre de résultats en dehors des limites de référence est inférieur ou égal à 2 comme décrit précédemment dans le chapitre 1.

Pour tous les groupes étudiés, toutes les valeurs (100 %) observées sont incluses dans les intervalles de référence fournis par le fournisseur à savoir Roche sur le COBAS INTEGRA 400<sup>PLUS</sup> ce qui permet d'accepter le transfert des intervalles de référence du COBAS INTEGRA 400<sup>PLUS</sup> au laboratoire de toxicologie du CHU NEDIR MAHAMED de Tizi Ouzou.

**Tableau 26** : Résultats de la validation des intervalles de référence sur COBAS INTEGRA 400 PLUS fournis par ROCHE

Le groupe	Les intervalles de référence fournis par ROCHE	Résultats
<b>Hommes</b>	5320 à 12 920 U/l	<b>validé</b>
<b>Femmes enceintes (18 à 41 ans)</b>	3 650 à 9 120 U/l	<b>validé</b>
<b>Femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux (16 à 39 ans)</b>	4 260 à 11 250 U/l	<b>validé</b>

## 3 .Distribution des valeurs de l'activité cholinestérasique

Les valeurs de l'activité cholinestérasique plasmatique de l'étude chez les trois groupes se distribuent d'une façon tel que : Celles retrouvées chez les hommes sont plus élevées (Min : 6255U/L, Max : 11820U/L) que celles retrouvées chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux (Min : 5118U/L, Max : 9469U/L) et ces dernières sont plus élevées que celles retrouvées chez les femmes enceintes (Min : 4404U/L, Max : 8464U/L). Et ces résultats sont en concordance avec les résultats de :

- De Lepage L, Schiele F, Gueguen R, Siest G. dans leur étude intitulée « l'activité des cholinestérase totale dans le plasma : Variation biologique et limites de référence » réalisée sur une population de 3372 sujets en bonne santé au moins pour quatre ans publié en 1985 ou ils ont rapporté que les valeurs de l'activité cholinestérasique sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes ;
- Et de R.T. EVANS et J.M. WROE dans une étude intitulée « Plasma cholinesterase changes during pregnancy » réalisée sur 941 femmes enceintes publié en 1980 ou ils ont rapporté qu'il y a une baisse des valeurs de l'activité cholinestérasique chez les femmes enceintes comparées à celles non enceintes.

#### 4. Étude de corrélation

L'étude de corrélation réalisée sur le groupe des hommes et des femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux a montré que la corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge et l'IMC est non significative pour les deux groupes contrairement à ce qui est rapporté dans les études de :

- M. Jalady dans son article «Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés » publié en 2013 que l'activité cholinestérasique est soumise à des variations avec l'âge et qu'elle augmente avec le poids et la taille des individus.
- Et de Lepage L, Schiele F, Gueguen R, Siest G. intitulé « l'activité des cholinestérase totale dans le plasma : Variation biologique et limites de référence » réalisée sur une population de 3372 sujets en bonne santé au moins pour quatre ans publié en 1985 ou ils ont rapporté que :
  - L'activité cholinestérasique n'est pas significativement corrélée avec l'âge chez les hommes, tandis qu'il y a une corrélation significative avec l'âge chez les femmes ;
  - Il y a une diminution significativement de l'activité cholinestérasique d'environ 14% de 10-15 et de 15-25 ans et atteignant une valeur minimale de 25 à 35 ans ;
  - À l'âge adulte, entre 35 et 45 ans, il y a aucune variation substantielle des valeurs plasmatiques de la cholinestérase, mais ces valeurs sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes d'environ 18% ; Ceci peut être du au statut hormonal chez les femmes.

- 
- Après 45 ans, les valeurs de la cholinestérase augmentent chez les hommes et plus encore chez les femmes atteignant les valeurs observées chez les hommes. Cette augmentation de l'activité de la cholinestérase peut être due à une diminution des hormones sexuelles, ce qui pourrait entraîner une réduction de la synthèse hépatique ou la libération d'enzymes.
  - Les femmes prenant des contraceptifs oraux avaient des activités enzymatiques significativement plus faibles. Cette variation est réversible lorsque ces médicaments ne sont plus pris et peut être provoquée par une inhibition de la synthèse hépatique.
  - L'influence du poids corporel sur l'activité des cholinestérases a été étudiée dans la même étude que précédemment en utilisant comme index le degré de surcharge pondérale et le pli cutané sous-scapulaire. L'excès du poids a été calculé et exprimée en pourcentage d'écart par rapport au poids idéal. Dans ces conditions, l'indice de pondération et pli cutané sous-scapulaire sont en corrélation significative avec l'activité des cholinestérases chez l'homme. En revanche, les coefficients de corrélation n'étaient pas significatifs chez les femmes. Ceci est peut être du au rôle suspecté biologique des cholinestérases dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines.

Cette discordance entre nos résultats et ces études est probablement due à l'effectif réduit qu'on a utilisé (20 personnes) et aux tranches d'âge précises qu'on était conditionné à sélectionner en vue de la réalisation de l'objectif principale de l'étude qui est la validation des intervalles de référence de l'activité cholinestérasique, étant donné que l'étude de corrélation en est un objectif secondaire.

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

---

Cette étude a permis de valider les intervalles de références chez trois groupes : les hommes, les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs âgées de 18 à 39 ans et les femmes enceintes âgées de 18 à 41 ans au niveau du laboratoire de toxicologie.

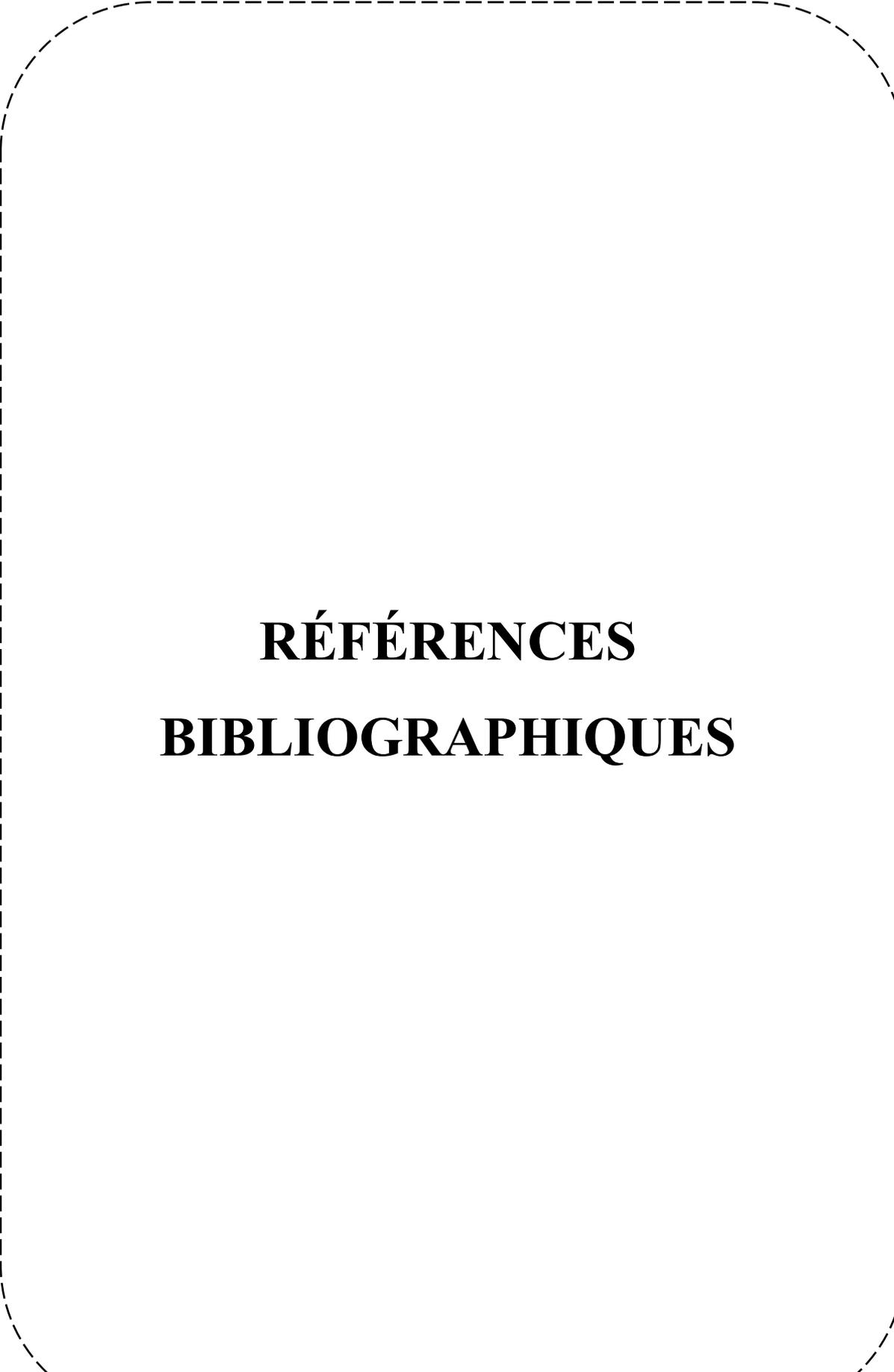
Quelle que soit l'origine des limites de référence qui figurent sur les comptes rendus des résultats de biologie médicale, il importe que leur signification et les limites de celles-ci soient bien comprises par l'utilisateur final, prescripteur clinicien ou patient :

- Les limites de référence sont descriptives d'une population donnée ;
- Les limites de référence ne seront pas confondues avec les limites de décision induisant une décision clinique ;
- La source et l'origine des limites de référence doivent être documentées ;
- Les limites de référence et/ou les limites de décision seront en cohérence avec le système analytique et le recrutement du laboratoire [5]

Dans le cas des cholinestérases l'interprétation par rapport aux intervalles de référence reste limité vu l'étendu de ces intervalles et la grande la variabilité intra et interindividuelle. Il serait plus approprié de définir la valeur de base de chaque individu et de déceler d'éventuelle variation par rapport à cette valeur basale au lieu d'interpréter par rapport aux intervalles de référence.

Dans les perspectives d' :

- Etendre la validation à d'autres groupes : enfants, les femmes sous contraceptif ;
- Étude de la variabilité intra-individuelle sur un effectif plus grand.



**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1]. Henny J. Etablissement et validation des intervalles de référence au laboratoire de biologie médicale. Inserm U1018-CETAF, Hôpital Paul Brousse, Villejuif Centre de médecine préventive, Vandœuvre-lès-Nancy. *Ann Biol Clin.* 2011 ;69 (2) : 229-37
- [2]. Libbey J. Réviser le concept de valeurs de référence : une nécessité. Volume 59, numéro 4, Juillet Août. 2001
- [3]. Henny J, Vassault A, Boursier G, Vucassovic I, Brguljan Point M, Lohmander M et al. au nom du groupe de travail Accréditation et ISO / CEN normes (WG-A / ISO) de l'EFLM. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(12)
- [4]. Coulibaly JL. Contribution à l'établissement des valeurs de paramètres biologiques de référence chez le burkinabè adulte : Evaluation des paramètres témoins du profil lipidique au service de chimie biologique du centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo (C.H.N.Y.O) à Ouagadougou [thèse]. Ouagadougou : Université de Ouagadougou ; 2003.
- [5]. Henny J, Arnaud J, Giroud C, Vassault A. Intervalles de référence: détermination et vérification. *Ann Biol Clin.* 2010. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 (Hors série no 1) : 305-313
- [6]. Perrin A, Vaubourdolle A, Vassault A, Szymanowicz A, Giannoli JM, Suiro A et al. Recommandations pour la validation des résultats d'examen de biologie médicale. *Ann Biol Clin.* *Ann Biol Clin* 2012 ; 70 (Hors série no 1) : 23-46
- [7]. Henny J. L'interprétation d'un examen de biologie médicale : forces et limites du concept de «valeurs de référence». Journée des Académies nationales de médecine, pharmacie et de la Société française de biologie clinique Paris, Académie de médecine, 24 janvier 2018.
- [8]. Allali M, Benhmida R. Étude sur les valeurs de référence biochimique chez l'homme adulte de la population de Tizi Ouzou. [mémoire] Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou ; 2017-2018.
- [9]. Balde FK. Valeurs de référence de l'hémogramme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans à Ouelessebougo [thèse de pharmacie]. Mali: Université des sciences techniques et technologiques de Bamako Faculté de Pharmacie ; 2014-2015.
- [10]. Hanot CC. Détermination de valeurs de référence des bilans d'hémostase de routine chez le chien sain déterminés avec un analyseur sta-satellite (diagnostica stago) : Étude expérimentale. [Thèse]. Université de Toulouse ; 2012.
- [11]. Jung B, Adeli K. intervalles de référence de laboratoire clinique en pédiatrie : L'initiative ETRIER. Biochimie clinique, Département de médecine de laboratoire pédiatrique, The Hospital for Sick Children, Université de Toronto, Toronto, Ontario, Canada ; 2009 ; Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [12]. Njikeutchi FN. Contribution à l'établissement des valeurs de référence de paramètres biologiques chez le Burkinabè adulte : Evaluations de cinq constituants biochimiques au

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

service de chimie biologie du Centre Hospitalier National Yalgado Ouédraogo (C.H.N.Y.O) à Ouagadougou [thèse]. Ouagadougou : Université d'Ouagadougou ; 2003.

[13]. Bounid D, Haouach K. Estimation des valeurs normales de l'hémogramme à Marrakech : étude préliminaire au CHU Med VI de Marrakech.2018.

[14]. Bouabre EA. Contribution a l'établissement des valeurs de référence de paramètres biologiques chez le Burkinab adulte : Evaluation de cinq paramètres représentatifs de l'activité enzymatique au service de Chimie Biologie du Centre Hospitalier National Yalgado Ouédraogo (C.H.N.Y.O) à Ouagadougou [thèse] .Ouagadougou : Université de Ouagadougou ; 2003.

[15]. Geffre A. Nouvelles approches de la production d'intervalles de référence de populations [thèse].Université de Toulouse ; 1er juillet 2011.

[16]. Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation: The theory of reference values. Part 4.Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values.Journal oh Automatic chemistry.Sep- oct 1991;vol. 13, No. 5:pp.231-234.

[17]. Siest G, Henny J. La théorie des valeurs de référence: une symphonie inachevée. Med Clin.2013; 51 (1): 47-64

[18]. Henny J. Multicenter reference intervals studies: a promising perspective for the future.Clin Chem Lab Med .2013; 51(7): 1335–1338

[19]. US EPA archive document .A science policy on a common mechanism of toxicity: the carbonates pesticides and the grouping of carbamate with the organophosphorus pesticides. 1999

[20]. Colletier JP. Étude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Université Joseph-fourier-Grenoble .2006.

[21]. Chibat F, Guechiri A. Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire [mémoire], Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire .Constantine : Université des frères Mentouri Constantine ; 2015.

[22]. Nachon F, Mason P. Structure tridimensionnelle de la butyrylcholinestérase : hypothèses mécanistiques et ingénierie de mutéine dégradant les composés organophosphorés.Ann Pharm Fr . 2005 ; 63 : 194-206

[23]. Biominis .Précis de Biopathologie analyses médicales spécialisés. 2012.

[24]. Konstantin M ,Timur N, Yury M, Sofya V, Michael H, Petr V et al. La structure 3D de la forme tétramère naturelle de la butyrylcholinestérase humaine révélée par cryoEM, SAXS ET MD.2019.

[25]. Libbey J. Étude de l'activité de la cholinestérase plasmatique au cours des atteintes hépatiques. Ann Biol Clin .2013 ; 71 (3) : 293-8

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [26]. Libbey J. Curarisation prolongée après injection succinylcholine sur déficit congénital en butyrylcholinestérase et potentialisée par un traitement au lithium : à propos d'un cas. *Ann Biol Clin* .2013 ;71 (4) : 485-8
- [27]. Mabboux I, Harry B, Courcelle S, Ceppa F, Delacour H. Curarisation prolongée liée à un déficit en butyrylcholinestérase.2016. Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [28]. Jalady M, Dorandeu F. Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés.*Anales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* .2013 : 856–862
- [29]. Ratnam A, Freymond D, Chabanel D. Réveil difficile après une anesthésie générale.*Forum Med Suisse*. 2014 ; 14(20) :p410–412
- [30]. Neşe Çokuğraş A .Butyrylcholinesterase: Structure et importance Physiologique Université Hacettepe, Faculté de médecine, Département de biochimie, Ankara, Turquie.2003
- [31]. Libbey J. Intoxications aiguës aux pesticides anticholinestérasiques de type carbamate : methomyllannate. *Ann Biol Clin* .2014.
- [32]. Libbey J, and al. Signes cliniques et variations de l'activité de la cholinestérase plasmatique chez des travailleurs agricoles exposés aux pesticides.*Environ Risque Sante*. jan-fév. 2014 ; 13(8 1)
- [33]. Cardon N, Vaillant C, Cren P, Grufatt B, Rappold JP, Corbé H. Intoxication aiguë au pesticides organophosphorés et activités des cholinestérases.*AnnBiol Clin* .2005
- [34]. Ophélie K. Étude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010
- [35]. Base de données Biotox, sur le site web de l'INRS : [www.inrs.fr/biotox](http://www.inrs.fr/biotox) - 05/2018
- [36]. Bulletin d'information toxicologique, Québec. janv. 2013 ; Volume 29, numéro 1
- [37]. Testud F, Grillet JP. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides de synthèse et divers. 2007.
- [38]. Groupe de travail Piratox/Piratome. Fiche Piratox n° 4 : « Organophosphorés : neurotoxiques de guerre et pesticides».afsapss. Edition du 30 nov 2010.
- [39]. Saissy JM, Ruttimann M. Intoxication par les organophosphorés. Consensus d'actualisation SFAR-Médecine d'urgence Paris France .1999.
- [40]. BENSAXHRIAA.Pesticides Organophosphorés. [en ligne] 23 févr. 2018 .Disponible sur : <https://www.analyticaltoxicology.com/pesticides-organophosphores/>

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [41]. Benziane AB. Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifors chez le rat Wistar : étude de l'activité enzymatique des cholinestérasés comme indicateur biologique. [mémoire] TLEMCEN : Université ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN. 2014.
- [42]. El Kettani S, El Mostapha A, Ouafaâ F, El Haimouti A. Exposition aux insecticides en milieu rural marocain : étude de l'activité enzymatique sérique des cholinestérasés comme biomarqueurs, Cahiers Santé. juil.-août-sept 2006 ; 16(3)
- [43]. Robertson GS. Serum cholinesterase deficiency II: Pregnancy. Department of Anaesthetics, Royal Infirmary, Aberdeen, Scotland. Brit. J. Anaesth. 1966
- [44]. Evans RT, Wroe JM. Plasma cholinesterase changes during pregnancy. Anaesthesia, 1980 ; 35 : p651-654.
- [45]. Antoine D. Etat des lieux des intoxications aiguës graves aux organophosphorés dans la région hauts de France [thèse]. Lille : Université du droit et de la santé Lille 2 Faculté de médecine Henri Warembourg. 2016.
- [46]. Lepage L, Schiele F, Gueguen R, Siest G. Total Cholinesterase in Plasma: Biological Variations and Reference Limits. CLIN. CHEM. 1985.
- [47]. Richard I, Wang H, Buffalo MD. Determining Cholinesterase Activity in Human Plasma Simple Test-Strip Method, Jama. 1963.
- [48]. Rey A, Hanss M. Détermination rapide de l'activité cholinestérasique du sérum par une ultramicrométhode conductimétrique. Clinica chimica acta. 1970.
- [49]. Khalil KA, Abass KS. The measurements of the Cholinesterase Activity of Brain and Plasma in Rabbits by Using Modified Michel and Ellman Assays. 2017; 1( 2)
- [50]. Jensen-Holm J, Lausen HH, Milthers K and Knud O Moller. Determination of Cholinesterase Activity in Blood and Organs by Automatic Titration. With some Observations on Serious Errors of the Method and Remarks of the Photometric Determination. Acta pharmacol. et toxicol. 1959; 15 : 384-394.
- [51]. Barenghi L, Ceriotti F, Luzzana M, Ripamonti M, Mosca A, Bonini PA. Measurement of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activity by a differential pH technique. Ann Clin Biochem. 1986; 23: 538-545.
- [52]. Mohammad FK, BVMS, MS, PhDa, A. S. Alias, BVMS et al. Electrometric measurement of Plasma, Erythrocyte and Whole Blood Cholinesterase Activities in Healthy Human. Journal of medical toxicology. 2007; 3(1)
- [53]. Chianea D, Adam F, Capron JL, Cobré H. Adaptation of a colorimetric method automated measurement of cholinesterase activity in plasma and whole blood hemolysate. Annales de Toxicologie Analytique. 2001 ;(1)

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [54]. Sido S. Mesure de l'activité cholinestérasique chez les ruminants .Application au diagnostic de l'intoxication par les insecticides organophosphorés. [thèse]. Dakar : Université Cheikh Anta Diop ; 1987.
- [55]. Diop AB. Mesure de l'activité cholinestérasique chez les animaux domestiques au Sénégal. [thèse].Dakar : Université Cheikh Anta Diop ; 1992.
- [56]. Holas O, Musilek K, Pohanka M, Kuca K. The progress in the cholinesterase quantification methods. University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Centre of Advanced Studies, Hradec Kralove, Czech Republic.Expert Opin. Drug Discov.2012
- [57]. Knechtges P. An Evaluation of Blood Cholinesterase Testing Methods for Military Health. USACEHR technical report 0801.may 2008.
- [58]. Loïc R, SaoudIA, Zeghnoun A, Deureumaux C, FilloI C. Santé publique France. Élaboration de valeurs de référence d'exposition à partir de données de biosurveillance, Santé publique France. déc 2017.
- [59]. BarenghiL, Measurement of erythrocyte acetylcholinesterase and Plasma cholinesterase activity by a differential pH technique, Ann Clin Biochem. 1986; 23: 538-545 .
- [60]. Emery M, Edith R. Spectrophotometric methods for determination of cholinesterase activity Clinica Chimica Acta .1957;2
- [61]. Aymon J.Comparaison de méthodes pour le dosage sérique du sodium, potassium, chlore, glucose et lactate sur le Cobas Integra 400 plus et le Gazomètre ABL700. Ecole supérieure de la santé, 47<sup>ème</sup> Travail de diplôme à l'ICHV de Monthey, Mr Airiau François. Nov. 2007 à Avril 2008
- [62]. Wandhammer M. Étude structurale de l'inhibition des cholinestérasés par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. Autre. [Thèse] Strasbourg. Université de Strasbourg, 2012.
- [63]. Tate Jr, Yen T, Jones GRD. Transference and validation of reference intervals [Editorial]. Clin Chem 2015;61:1012-1015.
- [64]. Tate JR, Koerbin G, Adeli K. Opinion Paper: Deriving Harmonised Reference Intervals - Global Activities. The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2016; 27(1):48- Published 2016 Feb 9.
- [65]. Chatonnet A, Lockridgetl O .Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase . Biochem. J. 1989 ; 260 : 625-634
- [66]. Aligon D, Bonneau J, Garcia J, Gomez D, Le Goff D. Projet d'Estimation des Risques Sanitaires, Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : les Organochlorés, les Organophosphorés et les Pyréthrinoïdes.Avril 2018.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

[67]. Samuel O, Carrier G et Lefebvre L. ATTEINTE DE SYSTÈMES CONSÉCUTIVE A UNE EXPOSITION AUX INSECTICIDES ORGANOPHOSPORÉS OU CARBAMATES. Mars 2007.

[68]. Merrouche N, Maazi H et Benkara A. Étude de la toxicité d'insecticides organophosphorés. Université des Frères Mentouri Constantine [thèse]. 15/06/2016.

[69]. Med Leg CHU Oran. Intoxications par les organophosphorés [en ligne]. 23 Juin 2013. Disponible sur : <http://medecinelegalechuoran.over-blog.com/intoxications-par-les-organophosphor%C3%A9s>

# **ANNEXES**

# ANNEXES

## Annexe I : Fiche de renseignements (hommes)

<b>Les valeurs de référence de l'activité cholinestérasique</b> Fiche de renseignement (hommes)	
Date : .....	Fiche remplie par : .....
Heure: .....	
<hr/>	
Avez-vous une maladie chronique? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous une maladie aiguë ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous un problème hépatique? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous un problème rénal? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Etes vous anémique ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous des troubles neuromusculaires ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous subi une curarisation? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous pris des médicaments les 10 jours passés? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous été hospitalisée avant 1mois? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Etes vous en contact ou exposé à des pesticides (OP , carbamates)? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Profession : .....	
<b>Informations personnelles du sujet prélevé:</b> .....	
Nom : .....	
Prénom : .....	
Date et lieu de naissance : .....	
Age : .....	
Poids ( Kg): .....	
Taille (cm): .....	
Résidence : .....	
Environnement : Ville <input type="checkbox"/> Village <input type="checkbox"/>	

# ANNEXES

## Annexe II : Fiche de renseignements (femmes)

<b>Les valeurs de référence de l'activité cholinestérasique</b>	
<b>Fiche de renseignement (femmes)</b>	
Date : .....	Fiche remplie par : .....
Heure: .....	
<hr/>	
Avez-vous une maladie chronique? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous une maladie aiguë ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous un problème hépatique? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous un problème rénal? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Etes vous anémique ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous des troubles neuromusculaires ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous pris des médicaments les 10 jours passés? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Avez-vous été hospitalisée avant 1mois? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Etes vous en contact ou exposé à des pesticides (OP , carbamates)? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Profession:.....	
Etes vous enceinte : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
Prenez vous de contraceptifs oraux Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	
<hr/>	
<b>Informations personnelles du sujet prélevé:</b>	
Nom : .....	
Prénom : .....	
Date et lieu de naissance : .....	
Age : .....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Poids ( Kg):.....	
Taille (cm):.....	
Résidence : .....	
Environnement : Ville	Village

## ANNEXES

---

### Annexe III : Résultats de dosage de l'activité cholinestérasique chez les hommes

Hommes	Age(ans)	IMC	Milieu géographique	Activité cholinestérasique (U/L)
P1	52	31,25	Rural	8017
P2	30	29,05	Urbain	10524
P3	32	28,73	Urbain	7575
P4	41	26,58	Urbain	6255
P5	23	27,74	Urbain	8304
P6	33	26,87	Rural	7544
P7	33	33,65	Rural	10171
P8	29	26,59	Rural	8846
P9	35	25,46	Urbain	10538
P10	34	32,14	Rural	9881
P11	21	19,15	Rural	11820
P12	29	27,77	Rural	10757
P13	21	22,22	Rural	7810
P14	47	27,44	Urbain	9302
P15	34	30,86	Rural	8969
P16	34	24,56	Rural	9346
P17	43	30,36	Rural	9352
P18	46	29,06	Urbain	11742
P19	51	23,14	Rural	7920
P20	28	22,89	Urbain	8931

## ANNEXES

---

**Annexe IV** : Résultats de dosage de l'activité cholinestérasique chez les femmes enceintes

Femmes	Age (ans)	IMC	Milieu géographique	Activité cholinestérasique (U/L)
P1	36	25,39	Urbain	5891
P2	24	23,18	Rural	8054
P3	32	24,22	Urbain	5259
P4	34	25,09	Urbain	5854
P5	29	22,20	Urbain	8464
P6	36	31,14	Urbain	6954
P7	28	24,24	Urbain	7136
P8	31	28,44	Urbain	4638
P9	37	39,41	Urbain	6085
P10	31	28,37	Urbain	6272
P11	32	30,48	Urbain	5844
P12	37	45,26	Urbain	7970
P13	39	30,07	Urbain	7221
P14	32	23,71	Rural	4779
P15	35	28,12	Urbain	6563
P16	39	22,03	Urbain	5920
P17	32	24,60	Urbain	7776
P18	35	33,98	Urbain	6932
P19	36	30,85	Urbain	4404
P20	29	30,86	Urbain	5656

## ANNEXES

---

**Annexe V:** Résultats de dosage de l'activité cholinestérasique chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux.

Femmes	Age (ans)	IMC	Milieu géographique	Activité cholinestérasique (U/L)
P1	23	21,79	Rural	7470
P2	32	30,48	Rural	7443
P3	36	26,17	Rural	8802
P4	21	19,83	Rural	6654
P5	24	21,00	Rural	8361
P6	30	21,64	Urbain	9469
P7	28	21,23	Rural	6016
P8	24	20,95	Urbain	6063
P9	40	32,88	Urbain	7459
P10	24	20,42	Rural	9104
P11	23	21,77	Urbain	7490
P12	25	23,52	Urbain	7200
P13	39	22,85	Rural	7443
P14	24	19,71	Rural	5118
P15	30	28,22	Rural	7251
P16	24	18,02	Urbain	5960
P17	24	20,31	Rural	7856
P18	31	25,79	Rural	7754
P19	30	17,23	Rural	6478
P20	25	21,98	Rural	7604

## Annexe VI : La fiche technique du COBAS Integra 400 plus pour le dosage de l'activité cholinestérasique. (1/3)

**COBAS**  
*INTEGRA 400/700/800*



Diagnostics

### Cholinestérase Gen.2 Cholinestérase 2<sup>e</sup> génération

**Références des réactifs**

COBAS INTEGRA Cholinestérase Gen.2	200 tests	Réf. 04498577 190 System-ID 07 6842 1	
Calibrator f.a.s.	12 x 3 mL	Réf. 10759350 190 System-ID 07 3718 6	
Precinorm U	20 x 5 mL	Réf. 10171743 122 System-ID 07 7997 0	
Precipath U	20 x 5 mL	Réf. 10171778 122 System-ID 07 7998 9	
Precinorm U plus	10 x 3 mL	Réf. 12149435 122 System-ID 07 7999 7	
Precipath U plus	10 x 3 mL	Réf. 12149443 122 System-ID 07 8000 6	
COBAS INTEGRA Cleaner Cassette	150 tests	Réf. 20764337 322 System-ID 07 6433 7	

**Codes d'application**  
COBAS INTEGRA Cholinestérase Gen.2 (CHE2)  
Test CHE2, test ID 0-021

**Domaine d'utilisation**  
Test *in vitro* pour la détermination quantitative de l'activité catalytique de la cholinestérase (EC 3.1.1.8 ; acylcholine acylhydrolase) dans le sérum et le plasma.

**Caractéristiques<sup>1,2,3</sup>**  
La cholinestérase (pseudocholinestérase ou cholinestérase II) existe dans le foie, le pancréas, le cœur, la substance blanche du cerveau et le sérum. Elle ne doit pas être confondue avec l'acétylcholinestérase que l'on trouve dans les globules rouges (EC 3.1.1.7, encore appelée cholinestérase I).  
La fonction biologique de la cholinestérase n'est pas connue. La cholinestérase sert d'indicateur d'une éventuelle intoxication par des insecticides. Son dosage est effectué pour apprécier la fonction hépatique. Le dosage pré-opératoire de la cholinestérase permet de dépister les patients présentant des formes atypiques de la cholinestérase et d'éviter ainsi une apnée prolongée due à une dégradation lente du myorelaxant.  
De faibles taux de cholinestérase se rencontrent en cas d'intoxication par des composés organophosphorés, en cas d'hépatite, de cirrhose, d'infarctus du myocarde, d'infections aiguës ainsi que chez les sujets présentant des formes atypiques de la cholinestérase.  
La méthode de dosage de la cholinestérase décrite ci-après repose sur la méthode de Schmidt E. et coll. de 1992.<sup>7</sup>

**Principe**  
Méthode à la butyrylthiocholine<sup>3</sup>  
La cholinestérase hydrolyse la butyrylthiocholine en thiocholine et en butyrate. La thiocholine réduit instantanément le hexacyanoferrate (III) de potassium de couleur jaune en un hexacyanoferrate (II) quasi incolore. La diminution de la coloration peut être mesurée à des longueurs d'onde situées entre 405 et 415 nm.

butyrylthiocholine + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{CHE}}$  thiocholine + butyrate

● cobas c pack utilisable sur les analyseurs suivants :

COBAS INTEGRA 400/400 plus	COBAS INTEGRA 700	COBAS INTEGRA 800
●	●	●

thiocholine + hexacyanoferrate (III) de potassium  $\longrightarrow$   
dithio-bis-(choline) + hexacyanoferrate (II) de potassium

**Réactifs - composition et concentrations**

Composants	Concentrations		
	R1	R2 (SR)	Test
Pyrophosphate	92	73	mmol/L
Hexacyanoferrate de potassium	2,4	1,9	mmol/L
Tampon de GOOD		10	1,6 mmol/L
Butyrylthiocholine	46	7,3	nmol/L
pH	7,7	4,0	7,7

Le réactif R2 contient des stabilisateurs.

**Précautions d'emploi et mises en garde**  
Il est impératif d'observer toutes les précautions d'emploi et mises en garde figurant dans le Recueil de méthodologies, Chapitre 1, Introduction.

**Préparation des réactifs**  
Les réactifs sont prêts à l'emploi.

**Conservation et stabilité**  
Conservation entre 2 et 8°C : voir date de péremption sur l'étiquette du cobas c pack.  
Analyseurs COBAS INTEGRA 400/400 plus  
Sur l'analyseur, entre 10 et 15°C : 4 semaines  
Analyseurs COBAS INTEGRA 700/800  
Sur l'analyseur, à 8°C : 4 semaines

**Prélèvement et préparation des échantillons**  
Pour le prélèvement et la préparation des échantillons, utiliser uniquement des tubes ou récipients de recueil appropriés. Seuls les types d'échantillons suivants ont été testés et peuvent être utilisés.  
Sérum : prélever le sérum sur des tubes standard.  
Plasma : recueilli sur l'héparinate de lithium, EDTA dipotassique/tripotassique.  
Ne pas utiliser de plasma recueilli sur citrate ou fluorure.

2006-06, V 2 FR
1 / 3
**CHE2**

# ANNEXES

## Annexe VI : La fiche technique du COBAS Integra 400 plus pour le dosage de l'activité cholinestérasique.2/3

<b>COBAS</b>		Enzymes
<i>INTEGRA 400/700/800</i>		
<p>Les différents types d'échantillons 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.</p>		
Stabilité : <sup>2</sup>	6 heures entre 15 et 25°C 7 jours entre 2 et 8°C 6 mois à -70°C	
<p>Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.</p>		
<p><b>Matériel fourni</b> Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».</p>		
<p><b>Matériel auxiliaire nécessaire</b> COBAS INTEGRA Cleaner Cassette, Réf. 20764337, System-ID 07 6433 7. Il est recommandé de programmer des cycles de lavage supplémentaires pour l'analyse simultanée de certains tests sur les analyseurs COBAS INTEGRA. Pour plus d'informations sur les combinaisons de tests nécessitant des cycles de lavage supplémentaires, se référer au Manuel de l'opérateur, Chapitre 1, Introduction, Partie III.</p>		
<p><b>Réalisation du test</b> 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.</p>		
<p><b>Application pour le sérum et le plasma</b></p>		
<p><b>Analyseurs COBAS INTEGRA 400/400 plus Définition du test</b></p>		
Mode de mesure	Absorbance	
Mode de calcul	Cinétique	
Mode réactionnel	R1-S-SR	
Sens de la réaction	Diminution	
Longueur d'onde A/B	409/659 nm	
Calc. premier/dernier	43/52	
Unité	U/L	
<p><b>Paramètres de pipetage</b></p>		
		Diluant (H <sub>2</sub> O)
R1	120 µL	
Echantillon	2 µL	5 µL
SR	24 µL	
Volume total	151 µL	
<p><b>Analyseurs COBAS INTEGRA 700/800 Définition du test</b></p>		
Mode de mesure	Absorbance	
Mode de calcul	Cinétique	
Mode réactionnel	R1-S-SR	
Sens de la réaction	Diminution	
Longueur d'onde A/B	409/659 nm	
Calc. premier/dernier	60/75	
Unité	U/L	
<p><b>Paramètres de pipetage</b></p>		
		Diluant (H <sub>2</sub> O)
R1	120 µL	
Echantillon	2 µL	5 µL
SR	24 µL	
Volume total	151 µL	
<p><b>SR</b> 24 µL <b>Volume total</b> 151 µL</p>		
<p><b>Calibration</b></p>		
Calibrateur	Calibrator f.a.s. Utiliser de l'eau désionisée pour le calibrateur zéro.	
Type calibration	Régression linéaire	
Nombre de répliques	Duplication recommandée	
Fréquence des calibrations	A chaque lot	
<p><b>Traçabilité</b> : le test a été standardisé par rapport à une méthode de référence utilisant une application manuelle de la méthode butyrylthiocholine/hexacyanoferrate (III) sur un photomètre<sup>4</sup> et l'absorptivité molaire publiée pour le hexacyanoferrate (III).<sup>5</sup></p>		
<p><b>Contrôle de qualité</b></p>		
Valeurs de référence	Precinorm U ou Precinorm U plus	
Limites pathologiques	Precipath U ou Precipath U plus	
Fréquence des contrôles	24 h recommandé	
Séquence de contrôle	Au choix de l'utilisateur	
Contrôle après calibration	Recommandé	
<p>Pour le contrôle de qualité, utiliser les matériaux de contrôle indiqués dans la section Références des réactifs. D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés. 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 la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors de ces limites.</p>		
<p><b>Calcul des résultats</b> Les analyseurs COBAS INTEGRA calculent automatiquement l'activité enzymatique de chaque échantillon. Pour plus de détails, se référer au Chapitre 7, Données analytiques, Manuel d'utilisation (pour l'analyseur COBAS INTEGRA 700), ou à la partie Données analytiques de l'Aide en ligne (pour les analyseurs COBAS INTEGRA 400/400 plus/800). Facteur de conversion : U/L × 0,0167 = µkat/L</p>		
<p><b>Limites d'utilisation - interférences<sup>4,5</sup></b> Critère d'acceptabilité : recouvrement ± 10% par rapport à la valeur initiale. <i>Sérum, plasma</i></p>		
Hémolyse	Pas d'interférence significative jusqu'à un indice H de 350 (concentration approximative d'hémoglobine : 217 µmol/L ou 350 mg/dL).	
Ictère	Pas d'interférence significative.	
Lipémie	Pas d'interférence significative jusqu'à un indice L de 1000. Il n'y a pas de concordance satisfaisante entre la turbidité et la concentration en triglycérides.	
Anticoagulants	Le citrate et le fluorure inhibent la réaction et ne doivent donc pas être utilisés.	
Médicaments	Pas d'interférence significative. Une liste des médicaments testés avec leur concentration figure dans le Manuel de l'opérateur, Chapitre 1, Introduction.	
Autres	Dans de très rares cas, la gammopathie, en particulier de type IgM (macroglobulinémie de Waldenström), peut conduire à des résultats erronés.	
<p>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.</p>		
<b>CHE2</b>		2006-06, V 2 FR

## Annexe VI : La fiche technique du COBAS Integra 400 plus pour le dosage de l'activité cholinestérasique.3/3

Enzymes

**COBAS**  
*INTEGRA 400/700/800*

**Domaine de mesure**  
 200-14 000 U/L (3,34-234 µkat/L)  
*Domaine de mesure plus étendu (calculé)*  
 Facteur de postdilution : 2 recommandé  
 200-28 000 U/L (3,34-468 µkat/L)

**Limite inférieure de détection**  
 200 U/L (3,34 µkat/L)  
 La limite inférieure de détection correspond au plus faible taux d'analyte mesurable pouvant être distingué de zéro. Elle est obtenue par le calcul et correspond au triple de l'écart-type du standard zéro (standard 0 + 3s, précision intra-série : n = 21).

**Valeurs de référence<sup>6,7</sup>**  
 Femmes à partir de 40 ans, enfants, hommes :  
 5320-12 920 U/L (89-215 µkat/L)  
 Femmes (de 16 à 39 ans) ne présentant pas de grossesse et ne prenant pas de contraceptifs oraux :  
 4260-11 250 U/L (71-187 µkat/L)  
 Femmes (de 18 à 41 ans) enceintes ou sous contraceptifs oraux : 3650-9120 U/L (61-152 µkat/L)  
 Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs et établir au besoin ses propres domaines de référence selon la population examinée.  
 a) Calculé avec le facteur de conversion de température de 1,52 (25 → 37°C)<sup>7</sup>

**Performances analytiques**  
 Les résultats indiqués ci-dessous ont été obtenus avec des analyseurs COBAS INTEGRA. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

**Précision**  
 La reproductibilité a été déterminée à l'aide d'échantillons humains et de contrôles selon un protocole interne (précision intra-série n = 21, inter-série n = 21). Les résultats suivants ont été obtenus :

Echantillon	Précision intra-série			Précision inter-série		
	Moyenne U/L	CV µkat/L	%	Moyenne U/L	CV µkat/L	%
Sérum humain	6374	106	0,5	6675	111	1,4
Precinorm U	6263	105	0,6	6213	104	1,1
Precipath U	6015	100	0,6	5964	100	0,9

**Comparaison de méthodes**  
 Une comparaison entre le réactif Roche CHE2 (y) avec le réactif Roche CHE précédent (x) sur un analyseur COBAS INTEGRA 800, effectuée sur des échantillons de sérum humain, a donné les résultats suivants (U/L) :

Passing/Bablok<sup>8</sup>      Régression linéaire  
 $y = 0,970x + 128$        $y = 0,965x + 153$   
 $r = 0,997$                    $r = 0,999$   
 $s(md95) = 125$                $Sy.x = 37,1$   
 Nombre d'échantillons analysés : 51

Les activités des échantillons étaient situées entre 1192 et 14 411 U/L (19,9 et 241 µkat/L).

**Bibliographie**

- Moss DW, Henderson AR, Kachmar JF. Enzymes. Dans: Tietz NW, éd. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3<sup>e</sup> édition. Philadelphie: WB Saunders 1987:346-421.
- Tietz NW, éd. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3<sup>e</sup> édition. Philadelphie, PA: WB Saunders 1995:132-133.
- Schmidt E et al. Proposal of Standard Methods for the Determination of Enzyme Catalytic Concentrations in Serum and Plasma at 37°C. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992;30:163-170.
- Documentation de Roche Diagnostics
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-474.
- den Blaauwen DH, Poppe WA, Tritschler W. Cholinesterase (EC 3.1.1.8) mit Butyrylthiocholin-iodid als Substrat: Referenzwerte in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht unter Berücksichtigung hormonaler Einflüsse und Schwangerschaft. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:381-386.
- Zawta B, Klein G, Bablok W. Temperature conversion in clinical enzymology. Klin Lab 1994;40:33-42.
- Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

Les modifications importantes par rapport à la version précédente sont signalées par une barre verticale dans la marge.  
 ©2006 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

CE

2006-06, V 2 FR
3 / 3
CHE2

## ANNEXES

**Annexe VII :** Résultats statistique de l'étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge chez les hommes

Linear Regression				
Number of points = 20				
Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	-25.268	37.044	-103.10	52.562
Y intercept	10060	1331.3	7262.4	12857
X intercept	398.11			
Correlation coefficient (r) = -0.1587. r squared = 0.02520				
Standard deviation of residuals from line (Sy.x) = 1486.9				
<u>Test: Is the slope significantly different from zero?</u>				
The P value is 0.5039, considered not significant.				
This result was obtained from the following ANOVA table.				
Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	
Linear regression (Model)	1	1028726	1028726	
Deviations from linearity (Residual)	18	3.980E+07	2211018	
Total	19	4.083E+07		
F = 0.4653				

## ANNEXES

**Annexe VIII** : Résultats statistique de l'étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC chez les hommes

Linear Regression				
Number of points = 20				
Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	6.895	95.049	-192.80	206.59
Y intercept	8992.1	2614.8	3498.4	14486
X intercept	-1304.2			
Correlation coefficient (r) = 0.01709. r squared = 0.0002922				
Standard deviation of residuals from line (Sy.x) = 1505.8				
<u>Test: Is the slope significantly different from zero?</u>				
The P value is 0.9430, considered not significant.				
This result was obtained from the following ANOVA table.				
Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	
Linear regression (Model)	1	11931	11931	
Deviations from linearity (Residual)	18	4.082E+07	2267506	
-----		-----		
Total	19	4.083E+07		
F = 0.005262				

## ANNEXES

**Annexe IX :** Résultats statistique de l'étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'âge chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

Linear Regression				
Number of points = 20				
Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	47.772	45.491	-47.805	143.35
Y intercept	6019.3	1290.3	3308.3	8730.3
X intercept	-126.00			
Correlation coefficient (r) = 0.2403. r squared = 0.05773				
Standard deviation of residuals from line (Sy.x) = 1094.2				
<u>Test: Is the slope significantly different from zero?</u>				
The P value is 0.3076, considered not significant.				
This result was obtained from the following ANOVA table.				
Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	
Linear regression (Model)	1	1320323	1320323	
Deviations from linearity (Residual)	18	2.155E+07	1197260	
Total	19	2.287E+07		
F = 1.103				

## ANNEXES

**Annexe X :** Résultats statistique de l'étude de corrélation de l'activité cholinestérasique avec l'IMC chez les femmes non enceintes et ne prenant pas de contraceptifs oraux

Linear Regression				
Number of points = 20				
Parameter	Best-fit Value	Standard Error	95% confidence interval	
			from	to
Slope	71.502	61.959	-58.674	201.68
Y intercept	5719.8	1433.2	2708.7	8731.0
X intercept	-79.995			
Correlation coefficient (r) = 0.2625. r squared = 0.06889				
Standard deviation of residuals from line (Sy.x) = 1087.7				
<u>Test: Is the slope significantly different from zero?</u>				
The P value is 0.2636, considered not significant.				
This result was obtained from the following ANOVA table.				
Source of variation		Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Linear regression (Model)		1	1575567	1575567
Deviations from linearity (Residual)		18	2.130E+07	1183079
-----				
Total		19	2.287E+07	
F = 1.332				

# ANNEXES

## Annexe XI : Principales caractéristiques des organophosphorés (OP) employés en agriculture en France en 2007

	Classement (OMS)	DL <sub>50</sub> chez le rat par voie orale (mg/kg)	Caractéristiques particulières	Persistance d'action	Teneurs maximales en résidus (mg/kg)	DJA (µg/kg/jour)	VME (mg/m <sup>3</sup> )
Azaméthiphos (S)	Xn (classe III)	1 180				25	–
Azinphos-méthyl	T+ (classe Ib)	16	Activation métabolique	15 jours	0,5 à 1	5	0,2
Cadusafos	T+ (classe Ib)	37	Rémanent ; activation métabolique		–	0,3	–
Chlorfenvinphos	T+ (classe Ib)	10 à 39	Inhibition préférentielle de la BuChE	2 à 3 semaines (feuilles) ; 2 à 4 mois (sol)	0,02 à 1	0,5	–
Chlorpyrifos-éthyl	T (classe II)	135 à 163	Très légèrement volatil ; activation métabolique ; inhibition préférentielle de la BuChE ; inhibition de la NTE	3 mois (sol)	0,05 à 3	10	0,2
Diazinon ou dimpylate	Xn (classe II)	300 à 850	Activation métabolique ; inhibition préférentielle de la BuChE	8 jours (feuilles)	0,02 à 1	2	0,1
Dichlorvos ou DDVP	T+ (classe Ib)	80	Volatil ; inhibition préférentielle de la BuChE ; inhibition de la NTE	4 à 5 jours	0,1 à 2	4	1
Diéthion	T (–)	208		3 à 4 semaines	0,05 à 3	2	0,4
Diméthoate (S)	Xn (classe II)	320 à 380	Hydrosoluble (25 g/l)	2 à 3 semaines	0,02 à 2	2	–
Ethoprophos	T+ (classe Ia)	62			0,01	0,3	–
Fénitrothion	Xn (classe II)	250 à 500	Activation métabolique ; stocké dans les graisses ; inhibition préférentielle de la BuChE	10 à 15 jours	0,01 à 2	5	–
Malathion	Xn (classe III)	480 à 1 150	Activation métabolique ; inhibition préférentielle de la BuChE ; inhibition de la NTE	8 jours	0,5 à 8	30	10
Méthamidophos (S)	T+ (classe Ib)	30	Très hydrosoluble (2 000 g/l) ; inhibition de la NTE	2 à 3 semaines	0,01 à 2	4	–
Méthidathion	T+ (classe Ib)	25 à 54		2 à 3 semaines	0,02 à 3	1	–
Naled (*)	Xn (classe II)	430			0,2	–	3
Oxydéméton-méthyl (S)	T (classe Ib)	65 à 80	Miscible avec l'eau		0,05 à 0,1	0,3	–
Parathion-éthyl (**)	T+ (classe Ia)	3,6 à 13	Activation métabolique ; inhibition préférentielle de l'AChE		0,05 à 0,5	4	0,1
Phosalone	T (classe II)	120	Rémanent ; activation métabolique	15 à 18 j	0,1 à 2	10	–
Phosmet	Xn (classe II)	230			0,1 à 10	10	–
Phoxime	Xn (classe II)	2170	Activation métabolique	3 mois (sol)	0,1	1	–
Pyrimiphos-méthyl (S)	Xn (classe III)	2050	Très légèrement volatil	Plusieurs mois (grains)	0,05 à 10	30	–
Téméphos ou abate (u.h.)	– (u.h.)	3100	Activation métabolique ; inhibition préférentielle de l'AChE (animal)		–	–	10

S : systémique ; \* : retrait courant 2006 ; \*\* : plus commercialisé ; T : toxique ; T+ : très toxique ; Xn : nocif ; classe Ia : *extremely hazardous* ; classe Ib : *highly hazardous* ; classe II : *moderately hazardous* ; classe III : *slightly hazardous* ; u.h. : *unlikely to present acute hazard in normal use* ; AChE : acétylcholinestérase ; BuChE : butyrylcholinestérase ; DJA : dt journalière admissible ; NTE : *neuropathy target esterase* ; VME : valeur limite de moyenne d'exposition.

## ANNEXES

### Annexe XII : Principales caractéristiques des carbamates anticholinestérasiques à usage phytosanitaire commercialisés en France en 2007.

	Classement (OMS)	DL <sub>50</sub> chez le rat par voie orale (mg/kg)	Persistance d'action	Délai d'emploi avant récolte	Teneurs maximales en résidus (mg/kg)	DJA (µg/kg/jour)	VME (mg/m <sup>3</sup> )
Aldicarbe (S)	T+ (classe Ia)	1	50 jours (sol)	–	0,05 à 0,5	1	–
Benfuracarbe (S)	T (classe II)	138	1,5 à 2 mois (sol)	1 à 3 mois	0,05 à 5		–
Carbaryl ou sévin	Xn - R 40 (classe II)	850	15 à 21 jours	7 jours	0,5 à 3	8	5
Carbofuran (S)	T+ (classe Ib)	8 à 14	50 jours (sol)	1 à 2 mois	0,1 à 10	2	0,1
Carbosulfan (S)	T (classe II)	182	50 à 700 jours (selon formulation)		0,05 à 1	10	–
Formétanate	T+ (classe Ib)	21		3 à 21 jours	0,2 à 5		–
Méthiocarbe ou mercaptodiméthur	T (classe Ib)	87 à 135		15 jours	0,1 à 0,2	20	–
Méthomyl	T+ (classe Ib)	17		3 à 28 jours	0,05 à 10	30	2,5
Pyrimicarbe	T (classe II)	147		3 à 200 jours	0,02 à 1	20	–
Thiodicarbe	T (classe II)	66		14 jours	0,05 à 10	30	–

S : systémique ; classe Ia : *extremely hazardous* ; classe Ib : *highly hazardous* ; classe II : *moderately hazardous* ; T+ : très toxique ; T : toxique ; Xn : nocif ; R40 : « effet cancérogène suspecté, preuves insuffisantes » ; DJA : dose journalière admissible ; VME : valeur limite de moyenne d'exposition.

## Transference and Validation of Reference Intervals

Jillian R. Tate,<sup>1\*</sup> Tina Yen,<sup>2</sup> and Graham R.D. Jones<sup>3</sup>

Reference intervals are the most widely used decision-making tool in laboratory medicine and serve as the basis for many of the interpretations of pathology results. Although laboratories are well versed in method verification and validation to assess if methods are fit-for-purpose, less importance is commonly put on selecting the most appropriate reference interval to determine whether an individual is healthy.

#### What Are the Sources of Reference Intervals Used by Routine Clinical Laboratories?

Sources of reference intervals can vary from the lowest level of current publications on methodology, e.g., manufacturers' package inserts, to published professional recommendations by national or international expert bodies, expert local groups, or individuals, to the more robust reference interval derived from apparently healthy populations. Health-associated reference intervals including shared (i.e., common or harmonized) reference intervals can be determined by formal (direct) studies using a local population and specified preanalytical conditions or by (indirect) data mining drawn from a local population in which specified preanalytical conditions are used.

The advantage of large, well-conducted direct studies is the well-defined reference population with exclusion of diseased subjects, optimum control of preanalytical variables, robust statistical analysis to remove outlier values, and narrow confidence limits around the obtained reference limits. Such is the case with the joint collaboration of the Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals (CALIPER)<sup>4</sup> and the Canadian Health Measures Survey (CHMS), which collected 11 999 biospecimens representative of 96% of Canada's household population covering the ages 3–79 years and supported by other physical measures and general health

information (1). Before the calculation of intervals, subjects were first excluded according to various parameters including increased body mass index, history of chronic or metabolic disease, acute illness, or use of prescribed medication a month before sample collection. Next there was statistical removal of outlier values followed by non-parametric ranking analysis to calculate pediatric (3–18 years), adult (19–59 years), and geriatric (60–79 years) reference intervals. Generally data from >500 females and >500 males were collected for most of the partitioned age groups, resulting in very robust data with narrow 90% CIs.

Adeli and colleagues present data from the CHMS-CALIPER formal reference interval study in 3 separate articles in this issue of *Clinical Chemistry* (2–4). Partitioned reference intervals are described for 24 routine biochemistry analytes measured by Vitros 5600 FS (Ortho Clinical Diagnostics) (2); 13 immunoassay-based biomarkers measured by Immulite 2000 (Siemens Healthcare), Advia Centaur XP (Siemens Healthcare), and Vitros 5600 FS or Liaison (DiaSorin) (3); and 16 hematological parameters measured by Coulter Hm-X (Beckman Coulter) and Sysmex CA-500 Series (Siemens Healthcare) (4). The authors note that further transference and validation studies for other assays/platforms are required before these reference intervals can be used to support clinical interpretation of patient test results generated on other platforms.

It is the responsibility of individual laboratories or laboratory networks to use reference intervals that are appropriate for their methodologies and the population they serve, as specified by International Organization for Standardization (ISO) standard 15189 (5). Advice on how to do this is found in guidelines from the CLSI. The key question is, "Is this reference interval suitable for my collection processes, my method, and my population?" Thus there is a need to demonstrate similar preanalytical processes (e.g., specimen collection, transportation, and handling); method comparability including precision, bias, and analytical specificity according to predefined acceptance criteria; and no relevant population differences. When transferring reference intervals from formal studies, the results from the assays/platforms used in the study need to be shown to be equivalent to those produced in the local laboratory, or the interval needs to be transformed as though it had been performed by the local method. These comparisons must be performed using patient samples to ensure a valid comparison. Validation

<sup>1</sup> Pathology Queensland, Department of Chemical Pathology, Royal Brisbane and Women's Hospital, Herston, QLD, Australia; <sup>2</sup> Department of Chemical Pathology, The Royal Children's Hospital, Parkville, VIC, Australia; <sup>3</sup> Department of Chemical Pathology, SydPath, St Vincent's Hospital, Sydney, NSW, Australia.

\* Address correspondence to this author at: Department of Chemical Pathology, Block 7 Floor 3, Royal Brisbane and Women's Hospital, Herston, 4029, Queensland, Australia. Fax +617 3646 3617; e-mail jill.tate@health.qld.gov.au. Received May 31, 2015; accepted June 1, 2015.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2015.243055

© 2015 American Association for Clinical Chemistry

<sup>4</sup> Nonstandard abbreviations: CALIPER, Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals; CHMS, Canadian Health Measures Survey; ISO, International Organization for Standardization; EQA, external quality assurance.

Annexe XIII : L'article publié par CLSI : Transference and validation of Reference Intervals  
2/4

## Editorials

of the transferred reference interval is then required using individual samples from healthy individuals from the local population served by the laboratory or other techniques (Table 1).

An initial assessment of whether methodology and calibration traceability of the laboratory's assays are similar to those used to establish the reference interval will prevent wasted efforts. Where a laboratory uses a method known to be biased compared with the method used to set the reference interval, this interval cannot be used. Rather, for assays with established traceability, traceable assays should be used to both set and use the interval (6). Therefore, preliminary information gathered from the manufacturer, external quality assurance (EQA) programs, and other published data is a first step to determining an assay's traceability claims and suitability for transfer of the reference interval.

The next step is to perform a method comparison study with another laboratory that has the setup assays, according to CLSI EP09-A3 (7), to determine the statistical validity of a reference interval transfer. Samples from healthy individuals with concentrations spanning the reference interval should be tested. In the transference of CALIPER pediatric reference intervals from the Abbott Architect assays/platforms to 4 other commonly used chemistry platforms, Estey et al. (8) performed method comparisons using 200 pediatric pooled serum specimens obtained from leftover pediatric sera that covered most age and sex partitions. Lower and upper reference limits were determined for the 4 platforms from slope and y-intercept values determined by either least squares or Deming regression analysis. However, if the correlation coefficient was  $<0.70$ , the data were considered inadequately correlated and could not reliably transfer the Abbott Architect reference intervals. It should of course be remembered that correlation coefficients are highly dependent on the concentration range of the samples. EQA samples were measured at the same time and mimicked the similarities and differences in reference intervals among the 5 assays (8).

Koerbin et al. (9) did a similar method comparison in the Australasian harmonized reference interval study, in which aliquots of biobanked sera from healthy individuals were used to determine the bias between 8 major chemistry platforms in use throughout Australia and New Zealand. Frozen aliquots from 33 healthy individuals who participated in the "Aussie Normals" direct reference interval study (10) were distributed to 24 public and private laboratories throughout Australasia. By use of this approach, the effect was determined of methodological differences on bias and the sharing of a common reference interval. When the data were analyzed, the average result for each analyte was compared with the mean of all results. Specified performance limits based on biological variation were then applied to determine whether

bias would prevent the use of a common reference interval by assessing whether all results fell within the allowable limits of agreement and whether regression lines were all within allowable limits for the 8 measurement procedures. Of 27 tested analytes, 19 gave acceptable bias for a common reference interval (11).

The next step in the transference process and potential adoption of an interval is validation of the proposed reference interval, which takes into account preanalytical, analytical, and population differences. Many biomarkers are under tight biological regulation and have little population variation, whereas other analytes may be affected by diet, infection, and local factors. The CLSI guideline C28-A3 (12) allows for subjective validation of a reference interval by laboratory assessment of population demographics and preanalytical and analytical parameters. A more formal validation recommends using 20 (60 for a more robust analysis) samples from local healthy individuals. If  $\leq 2$  of 20 values ( $\leq 10\%$ ) fall outside the reference interval then the interval can be accepted. If  $>2$  of 20 samples ( $>10\%$ ) fall outside the interval, then the comparison is repeated with an additional 20 samples. If  $\leq 2$  values then fall outside the interval, accept the reference interval. If this fails, an investigation is required to assess the cause. When an analyte requires age or sex partitioning, CLSI suggests that validation of 1 partition may lead to accepting the validity of other partitions. However, this may depend on various factors such as analyte concentrations, different forms, or matrix issues, in particular for pediatric partitions (13). Such statistical tests are not a replacement for considered judgment of the available data.

An alternate approach for validation of a proposed reference interval against the local method and population is to mine your laboratory's existing data. This method has advantages over the direct reference interval validation process by providing large amounts of data on the local population being tested and reflects the actual analytical and preanalytical conditions for the tested population. This approach is valid only if there is a majority of unaffected results from the general practice population such that the healthy distribution of values can be clearly identified in the midst of a smaller number of the non-healthy. The most useful parameter is the midpoint of the extracted data, which can be used to assess analytical or population bias by comparison with the corresponding midpoint of the data used to set the reference interval. At a more complex level, Bhattacharya analysis can be used to assess the proposed intervals (14).

Any significant bias will result in misclassification of too many patients. The expected information derived from the combination of assay and reference interval must meet the appropriate clinical sensitivity and specificity for each test. The use of data mining also allows for an assessment of the expected number of results outside

## Editorials

Table 1. Procedures for transfer and validation of reference intervals.

Procedure	Suggested Do's	Suggested Don't's
1. Do initial investigation of local laboratory assay to assess its suitability to transfer proposed reference interval obtained in formal study	Assess assay for compatible methodology and same calibration traceability as used to establish reference interval, and for bias; Gather information from manufacturer, EOA programs, and other published sources [Koorbin et al. (11)]; or Do a method comparison study	If biases exist between methods, owing to analytical specificity or calibration differences, do not use proposed reference interval
2. Use method comparison study to assess whether: Methods are similar enough to use proposed reference interval as is; Methods are similar enough to develop a transfer equation; or Bias will prevent reference interval transfer	a) Perform method comparison with same assay used to establish reference interval as the comparator according to CLSI EP09-A3 [CLSI (7)]; Use leftover samples from individuals or produce pools with concentrations across reference interval, and consider the data collection and, if appropriate, use regression to determine the best fit; b) Perform a multisite (multiple platforms and multiple laboratories) method comparison when considering transfer to a common (shared) reference interval; Use frozen aliquots from healthy individuals; Assess data by applying allowable performance limits to detect any bias [Koorbin et al. (11)]; and If values are within acceptable performance limits for multiple assays/platforms, consider other evidence for use of a shared reference interval [Late et al. (15)]	a) An inadequate correlation across reference interval concentrations ( $r^2 < 0.7$ ) usually reflects a poor reference interval  b) Do not share a common reference interval for analytes with values outside the specified allowable limits of performance
3. Perform a validation of proposed reference interval to demonstrate: Similar preanalytical processes and method comparability, including precision, bias, and analytical specificity according to predefined acceptance criteria; and No relevant population differences; Also consider use of a common reference interval across multiple assays/platforms for analytes with acceptable bias	a) Perform reference interval validation according to CLSI 28-A3 [CLSI (12)]; Analyze $\geq 20$ samples obtained from healthy individuals; Accept proposed reference interval if $\leq 2$ values fall outside reference interval  b) Mine existing laboratory data if these consist of mostly unaffected results from a general practice population [Jones (14)]; Compare midpoint of extracted data with corresponding midpoint of data used to set reference interval; and Assess expected flagging rates of proposed upper and lower reference limits with current rates [Late et al. (15)]	a) Do not use proposed reference interval if: Sample collection, transport, and sample handling conditions are different from original study; Method precision and bias are outside acceptance criteria (QC and EOA criteria); Significant population differences exist; or $>Z$ values are outside reference interval on 2 occasions. b) Do not use data mining of laboratory data if: Healthy distribution of values cannot be clearly distinguished from the non-healthy values; or There is significant method bias resulting in falsely high or low flagging rates

Annexe XIII : L'article publié par CLSI : Transference and validation of Reference Intervals  
4/4

## Editorials

the interval (14). The laboratory can then compare the expected flagging rates with their current rates (15). Where a reference interval is shared, the analytical variation for more analyzers in more laboratories using more methods will be larger than a singly derived interval, resulting in a wider reference interval (14).

The CHMS-CALIPER collaboration for adult, paediatric, and geriatric reference intervals provides statistically the most robust data to date for a total of 53 different chemistry, immunoassay-based, and hematology analytes and parameters in a Canadian population. The strength of the data lies in the large numbers per age and sex partition and the stringent exclusion of diseased individuals. The comprehensiveness of the population analyzed (ages 3–79 years) means the authors provide a considerably more meaningful account of biological changes to every analyte by age and sex, a feat rarely achieved in reference interval examination.

The advantage of the collaboration is the potential to harmonize reference intervals across Canada and, no doubt, further afield globally. As noted by the authors (4), the chemistry analytes are largely standardized and have calibration traceability to reference materials and measurement procedures. By contrast, the hematology parameters lack certified reference materials, although several are traceable to reference measurement procedures, which has resulted in acceptable equivalence of measurement results between different platforms. To maximize use of this database of reference intervals, laboratories are encouraged to do transference and local validations to demonstrate the validity of intervals.

**Author Contributions:** *All authors confirmed they have contributed to the intellectual contents of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual contents; and (c) final approval of the published article.*

**Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest:** *No authors declared any potential conflicts of interest.*

## References

1. Tremblay M, Wolfson M, Connor GS. Canadian Health Measures Survey: rationale, background and overview. *Health Rep* 2007;18(Suppl):7-20.
2. Adeli K, Higgins V, Neuwesteeg M, Raizman JE, Chen Y, Wong SL, Blais D. Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem* 2015;61:1049-62.
3. Adeli K, Higgins V, Neuwesteeg M, Raizman JE, Chen Y, Wong SL, Blais D. Complex reference values for endocrine and special chemistry biomarkers across pediatric, adult and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem* 2015;61:1063-74.
4. Adeli K, Raizman JE, Chen Y, Higgins V, Neuwesteeg M, Abdelhaleem M, et al. Complex biological profile of hematologic markers across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem* 2015;61:1075-86.
5. ISO. Medical laboratories-particular requirements for quality and competence. Geneva:ISO; 2012. ISO 15189.
6. Parteghini M, Ceriotti F. Obtaining reference intervals traceable to reference measurement systems: is it possible, who is responsible, what is the strategy? *Clin Chem Lab Med* 2012;50:813-7.
7. CLSI. Method procedure comparison and bias estimation using patients samples: approved guideline-third edition. Wayne (PA): CLSI; 2013. CLSI document EP09-A3.
8. Estey MP, Cohen NH, Colantonio DA, Chan MK, Binesh Marvasti T, Randell E, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and Siemens Clinical Chemistry Assays: direct validation using reference samples from the CALIPER cohort. *Clin Biochem* 2013;46:1197-219.
9. Koerbin G, Sikaris KA, Jones GRD, Ryan J, Reed M, Tate J, on behalf of the AACB Committee for Common Reference Intervals. Evidence-based approach to harmonised reference intervals. *Clin Chim Acta* 2014;432:99-107.
10. Koerbin G, Cavanaugh JA, Potter JM, Abhayasthra WP, West NP, Glasgow N, et al. 'Aussie normals': an a priori study to develop clinical chemistry reference intervals in a healthy Australian population. *Pathology* 2015;47:13B-44.
11. Koerbin G, Tate JR, Ryan J, Jones GRD, Sikaris KA, Kanowski D, et al. Bias assessment of general chemistry analytes using commutable samples. *Clin Biochem Rev* 2014; 35:203-11.
12. CLS. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline-third edition. Wayne (PA): CLS; 2008. CLS document C28-A3.
13. Sikaris KA, Yen T. CALIPER: supporting the steps forward in paediatric laboratory measurement (editorial). *Clin Biochem* 2013;46:1195-6.
14. Jones GRD. Validating common reference intervals in routine laboratories. *Clin Chim Acta* 2014;432:119-21.
15. Tate JR, Sikaris KA, Jones GRD, Yen T, Koerbin G, Ryan J, et al. on behalf of the AACB Committee for Common Reference Intervals. Harmonising adult and paediatric reference intervals in Australia and New Zealand: an evidence-based approach to establishing a first panel of chemistry analytes. *Clin Biochem Rev* 2014;35:213-35.

## Résumé

Les intervalles de référence décrivent les variations des paramètres biologiques en fonction de la population de référence et de la méthode analytique, leur détermination au laboratoire de biologie médicale reste un outil précieux pour guider l'interprétation des examens biologiques et elle constitue une des composantes de la décision médicale.

Dans la pratique, les laboratoires de biologie médicale utilisent le transfert pour valider la majorité des intervalles de référence qu'ils mettent en œuvre, et établissent rarement un intervalle de référence à nouveau, compte tenu de la considérable complexité du processus d'établissement d'intervalle de référence précis et fiable.

Notre étude est réalisée au niveau de laboratoire de toxicologie CHU de TIZI OUZOU dans le but de vérifier la transférabilité des IR de l'activité cholinestérasique sur COBAS INTEGRA 400 <sup>plus</sup> de 3 groupes de 20 personnes chacun supposés en bonne santé venants de la même région kabyle.

**Mots clés :** *Intervalle de référence, transférabilité, activité cholinestérasique.*

## Summary

The reference ranges describe changes in biological parameters according to the reference population and the analytical method, their determination in the laboratory of medical biology remains a valuable tool to guide the interpretation of biological tests and it is one of the components of the medical decision.

In practice, medical biology laboratories use the transfer to validate most of the reference ranges they implement, and rarely establish a referral interval again, given the considerable complexity of the accurate and reliable reference interval establishment process.

Our study is carried out at TIZI OUZOU toxicology laboratory level in order to verify the transferability of IR of cholinesterase activity on COBAS INTEGRA 400 more than 3 groups of 20 people each supposed healthy coming from the same Kabyle region.

Key words: Reference interval, transferability, cholinesterase activity.