

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mostapha Benboulaïd BATNA 2

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Organismes



# THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Option: Biologie Cellulaire et Physiologie Animale**

*Thème :*

---

**Etude des effets de micronutriments sur  
l'issue de la grossesse chez la femme  
algérienne**

---

**Présentée par**

**M<sup>me</sup> MOUFFOUK SARA**

Soutenue le 11 /10 / 2018

**Devant le jury :**

Pr. Laroui Salah.  
Pr .Yahia Mouloud  
Pr. Hambaba Leila  
Pr .Bennoune Omar  
Pr .Ayachi Ammar  
Pr .Aissi Adel

Président	Université Batna 2
Rapporteur	Université Batna 2
Examinatrice	Université Batna 2
Examineur	Université Batna 1
Examineur	Université Batna 1
Examineur	Université Batna 1



## *Remerciements*

*Avant tout, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, le courage et la patience. Sans lui, cette thèse et ce jour n'auraient pu exister.*

*Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, spécialité Biologie Cellulaire et Physiologie Animale, a été réalisé au sein du laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et Physiopathologie Cellulaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie université Mustapha Ben Boulaid Batna-2, et laboratoire de Biochimie du CHU (BATNA), sous la direction du Professeur YAHIA MOULOUD.*

*Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur YAHIA MOULOUD pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien illimité et sa grande générosité, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Chafaa Ismail maitre de conférences de l'université de Batna-2, pour son aide et pour avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat a la place de Mr Yahia mouloud (La miséricorde de Dieu sur lui).*

*Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur Laroui Salah de l'université de Batna-2 pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*J'aimerais également remercier vivement Madame le Professeur Hambaba Leila de l'université de Batna-2, Monsieur le Professeur Bennoune Omar de l'université de Batna-1, Monsieur le Professeur Ayachi Ammar, Monsieur le Professeur Aissi Adel de l'université de Batna-1, pour avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat.*

*Un grand respectueux remerciement va à Docteur **BOUKROUS Hanane**, Maitre de Assistante hospitalo-universitaire et responsable du laboratoire de biochimie (CHU de Batna), ainsi que toutes les techniciennes du laboratoire pour son aide afin de réaliser ma thèse.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **SENATOR Abderrahmane**, qui n'a pas hésité de venir humblement en aide, J'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement, son savoir et de sa grande expérience.*

*Un très précieux remerciement va à Mr le Professeur **Haba Hamada** enseignant au département de chimie à l'université de Batna-1, pour son aide constant.*

*Un très précieux remerciement va à Docteur **MOUFFOUK Soumia** enseignante au département de chimie à l'université de Batna-1, pour son aide constant, sa marque de sympathie et ses précieux conseils.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **MIRADESSI FOUAD** Maitre de conférences au département d'écologie à l'université de Batna-2, pour son aide.*

*Je n'oublie pas de remercier vivement les laborantines de la maternité Meriem Bouaatoura et CHU de Batna en particulier : **Mira, Samah, Sara, Ferial**.*

*Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation et auxquelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.*

# *Dédicaces*

*Avant tout je remercie mon DIEU tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

## *À ma chère mère*

*Merci de m'avoir mis au monde, de m'avoir enseigné tout ce qui est important pour y vivre et surtout de faire partie de mon univers.*

*Merci de m'avoir toujours soutenu durant mon enfance et pendant les années d'études, pendant les bons moments et les plus difficiles, merci de m'avoir toujours encouragé et cru en moi et merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté .*

## *À mon cher père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, ma formation et mon bien être.*



*A mon cher mari Samir*

*A ma chère petite belle fille Takwa Hibat errahmane*

*A mes chères sœurs et à mon cher frère Badreddine*

*A mes chères nièces et neveux,*

*A la mémoire de mon grand-père*

*Et*

*Aux autres membres de ma famille.*

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Ado</b>	Adénosine
<b>AS</b>	Avortements spontanés
<b>ATN</b>	anomalie du tube neural
<b>Cbl</b>	Cobalamine
<b>CBS</b>	cystathionine bêta-synthase
<b>DHEAS</b>	Dehydroepiandrosterone sulfate
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ETEP</b>	Euro-team Early Pregnancy Protocol for Miscarriage
<b>FBP</b>	folate-binding proteins
<b>FCP</b>	fausse couche précoce
<b>FCS</b>	Fausse couche spontanée
<b>FCSR</b>	Fausse couche spontanée précoce « à répétition »
<b>FCT</b>	Fausse couche tardive
<b>FNLT</b>	fer non lié à la transferrine
<b>FSH</b>	Follicle-stimulating Hormone
<b>GA</b>	Grossesse Arrêtée
<b>GEU</b>	Grossesses Extra-Utérines
<b>GLDH</b>	glutamate deshydrogénase
<b>GnRH</b>	Hormone de relâchement des gonadotrophines
<b>HPL</b>	Hormone lactogène placentaire
<b>IL</b>	Insuffisance lutéale
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>LH</b>	Hormone Lutéinique
<b>Mét</b>	méthionine
<b>MFIU</b>	Mort fœtale in utero
<b>MMA</b>	Acide Méthylmalonique
<b>MS</b>	méthionine-synthase
<b>MTHFR</b>	méthylène tétrahydrofolate réductase
<b>OMS</b>	Organisation mondial de la santé
<b>OPK</b>	Ovaires Polykystiques
<b>PCFT</b>	proton-coupled folate transporter
<b>PE</b>	Prééclampsie
<b>PLC</b>	Phospho Lipase C
<b>RFC</b>	Reduced folate carrier
<b>SA</b>	Semaines d'aménorrhée
<b>SAH</b>	S-adénosyl-L-homocysteine
<b>SAM</b>	S-adénosyl-méthionine
<b>TF</b>	La transferrine
<b>THF</b>	tétrahydrofolate
<b>TT</b>	Tumeurs Trophoblastiques
<b>uE3</b>	œstradiol
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor

# LISTE DES FIGURES

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Les étapes menant à une grossesse	01
02	Implantation du blastocyte	0 2
03	Structure de l'acide folique	15
04	Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques	16
05	Cycle des folates et métabolisme des monocarbones.	18
06	Mécanisme d'absorption de la vitamine B12	20
07	Fonctions métaboliques de la vitamine B <sub>12</sub>	21

# LISTE DES TABLEAUX

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Protocoles d'investigation des avortements	<b>09</b>
02	Interprétation des valeurs de l'IMC selon la classification de l'OMS	<b>28</b>
03	Répartition des femmes enceintes au cours d'un avortement selon l'âge	<b>30</b>
04	Répartition des femmes enceintes en cours d'avortement par l'IMC avant et pendant la grossesse (Moyenne±SD).	<b>31</b>
05	La fréquence des avortements selon l'âge de grossesse	<b>33</b>
06	Répartition des femmes enceintes en cours d'avortement selon les antécédents gynéco-obstétriques	<b>34</b>
07	Variation du taux de l'acide folique chez les femmes enceintes	<b>35</b>
08	Variation du taux de la vitamine B12 chez les femmes enceintes	<b>36</b>
09	Variation du taux de l'hcy chez les femmes enceintes	<b>37</b>
10	Variation du taux de fer chez les femmes enceintes	<b>38</b>
11	Variation du taux de calcium chez les femmes enceintes	<b>40</b>
12	Variation du taux d'AFP sérique chez les femmes enceintes	<b>42</b>
13	Variation du taux de β-HCG sérique chez les femmes enceintes	<b>44</b>
14	Variation du taux d'uE3 sérique chez les femmes enceintes	<b>45</b>
15	Variation du taux de la progestérone chez les femmes enceintes	<b>46</b>
16	Fréquence des avortements selon le nombre des cas anémiques.	<b>47</b>
17	Nombre des femmes enceintes diabétique.	<b>49</b>
18	Nombre des femmes enceintes hypertendues.	<b>49</b>
19	Nombre des femmes enceintes présentant une infection.	<b>52</b>

# TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

## *Synthèse bibliographique*

### Chapitre I

#### Physiologie de la grossesse

I.1. Définition de la grossesse.....	01
I.2. Les étapes de la grossesse .....	01
I.2.1. La fécondation.....	01
I.2.2. La formation de la morula.....	02
I.2.3. Développement du blastocyte.....	02
I.2.4. La nidation .....	03
I.3. Les Phases de la grossesse .....	03
I.3.1. La phase maternelle.....	03
I.3.2. La phase fœtale.....	03
I.4. Modifications physiologiques de la grossesse.....	04
I.4.1. Hormones et grossesse.....	04
I.4.1.1 Hormones stéroïdiennes.....	04
I.4.1.2 Hormone lactogène placentaire (HPL) .....	04
I.4.1.3 l'Ocytocine .....	05
I.4.1.4 La Prolactine.....	05
I.4.2. Les Marqueurs sériques et la grossesse.....	05
I.4.2.1. L'Hormone chorionique gonadotrophine humaine (HCG).....	05
I.4.2.2. L'œstriol.....	06
I.4.2.3. L'alpha-foetoprotéine humaine (AFP) .....	07

## **Chapitre II**

### **Les avortements**

II.1.Définition .....	08
II.2.Prise en charge et les facteurs de risque.....	09
II.2.1.Les facteurs génétiques.....	10
II.2.1.1.Les anomalies parentales.....	10
II.2.1.2.Anomalies du caryotype embryonnaire.....	10
II.2.1.3.Les anomalies géniques.....	10
II.2.2. Les malformations utérines.....	10
II.2.3.Les anomalies endocriniennes.....	11
II.2.3.1. L'insuffisance lutéale (IL).....	11
II.2.3.2.Le diabète sucré.....	11
II.2.3.3. Les maladies thyroïdiennes.....	11
II.2.3.4.Les ovaires polykystiques OPK et hypersécrétion de LH.....	11
II.2.4. Facteurs de l'environnement et grossesse.....	12
II.2.5.Les Infections.....	12
II.2.6. Anomalies immunologiques.....	13

## **Chapitre III**

### **Effets des micronutriments sur l'issu de la grossesse**

III.1.Définition .....	14
III.2. Données sur les micronutriments .....	14
III.2.1.La vitamine B9 .....	14
III.2.1.1 Propriétés physicochimiques.....	15
III.2. 1.2. Métabolisme de L'acide folique.....	15
III.2.1.3. Fonctions biochimiques et rôles physiologiques.....	17
III.2.1.4. Cycles des folates et du métabolisme des monocarbones.....	18
III.2.1.4. 2. Cycle de l'homocystéine et réaction de transméthylation.....	19
III.2.2. La vitamine B12.....	19

III.2.2.1. Métabolisme .....	20
III.2.2.2. Fonctions biochimiques et rôles physiologiques.....	22
III.2.3. Le Fer.....	22
III.2.3.1. Métabolisme du fer.....	23
III.2.3.2. Rôles du fer.....	24
III.2.4. Le calcium .....	24

## *Partie expérimentale*

### **Chapitre I**

#### **Matériel et Méthodes**

I-1-Matériel.....	26
I.1.2 Population d'étude .....	26
I.1.2.1. Critères d'inclusion.....	26
I.1.2.2. Critères d'exclusion .....	26
I-1-2. Recueil des données.....	26
I-1-2-1 prélèvements sanguins .....	26
I-2-Méthodes.....	27
I.2.1. Dosage des micronutriments et des marqueurs sériques.....	27
1.2.2. Calcul de l'indice de la masse corporelle (IMC) .....	27
II. Analyses statistiques.....	28
Calcul de la MoM (Multiple de la médiane) .....	28
Résultats et discussion.....	30
Conclusion et perspectives	
Références Bibliographiques	
Annexes	

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

L'avortement est l'une des principales complications qui touchent la femme au début de la grossesse, il se traduit par une interruption et l'expulsion d'un embryon ou d'un fœtus avant 22 semaines d'aménorrhées (**Chayachinda et Thamkhantho, 2012**). Il n'existe pas de diagnostic systématique, mais un dépistage anténatal qui repose sur le dosage de quelques paramètres biologiques (Marqueurs nutritionnels et marqueurs sériques) semble être intéressant pour l'identification des grossesses à risque et participe au diagnostic des pathologies malformatives fœtales (**Abessolo et al., 2011 ; Geyl et al., 2014**) .

En effet, les vitamines sont des micronutriments essentiels pour stimuler la croissance et le métabolisme de l'être humain. Certains sont importants à la synthèse des acides nucléiques et à la transcription des gènes (**Costello et Osrin, 2003**). Une augmentation accrue des besoins en vitamines B est remarquée au début de la grossesse et spécialement la B12 (cobalamine) et la B9 (folates) (**Ayoubi et al., 2012**). L'acide folique est très important pour le développement du fœtus, c'est un cofacteur essentiel dans la biosynthèse des nucléotides et dans la transformation de l'homocystéine en méthionine, utilisée dans la méthylation d'ADN, des protéines et des lipides. La carence en acide folique induit des modifications au niveau moléculaire conduisant à des divisions cellulaires anormales (**Scholl et Johnson, 2000**) et augmente la concentration de l'homocystéine. Ainsi que, les femmes avec des avortements à répétition ont une plus forte prévalence d'hyper-homocystéinémie (**Wouters et al., 1993, Nelen et al., 1998**). La diminution des taux de folates érythrocytaires au début de la grossesse, est responsable des anomalies de la fermeture du tube neural après la conception. En effet, la plupart des vitamines peuvent être des facteurs limitants la croissance fœtale (**Cabrol et al., 2003**).

De plus, le fer est un micronutriment qui intervient dans de nombreuses activités biologiques (**Beguin et al., 2002**), c'est un cofacteur qui joue un rôle critique dans les réactions enzymatiques liées à la synthèse de l'ADN (**Beaumont et Karim, 2013**). Les besoins en fer augmentent au cours de la grossesse car, il est nécessaire à la croissance fœtale, à l'élévation de la masse érythrocytaire et au fonctionnement placentaire (**Ayoubi et al., 2012**).

Autres minéraux peuvent jouer un rôle primordial dans la croissance fœtale, c'est

le calcium qui intervient dans la formation de l'os et les dents du fœtus. Cependant un apport insuffisant en calcium peut entraîner le développement d'une pré-éclampsie et accroître le risque de prématurité ou de fausses couches (**Bergel et Belizan, 2002**).

Par ailleurs, les marqueurs sériques sont des molécules biochimiques, produits d'origine fœtale ou placentaire secrétées dans le sérum maternel au cours de la grossesse (PAPP-A,  $\beta$ -HCG libre Alpha-fœto-protéine et œstriol) (**Geyl et al., 2014**). Ces marqueurs se différencient d'une femme à l'autre selon le nombre de semaines d'aménorrhées (SA) et l'état d'évolution de la grossesse. Plusieurs études ont démontré l'importance de ces paramètres dans le diagnostic des anomalies et des pathologies malformatives fœtales.

Ainsi, la progestérone est une stéroïde qui joue un rôle essentiel dans l'établissement de la gestation, elle prépare et maintient l'endomètre qui permettra l'implantation, elle supprime la réponse immunitaire maternelle et il n'existe pas chez la femme de chute de la progestéronémie avant l'accouchement.

Dans cet ordre d'idées, nous nous sommes intéressés à mesurer les paramètres suivants : le folate, la vitamine B12, l'Homocystéine, le Fer, le Calcium, la  $\beta$ -HCG, l'AFP, l'œstriol et la progestérone d'une façon rétrospective, chez des patientes hospitalisées aux cours du premier et deuxième trimestre à cause d'une complication de grossesse et des métrorragies afin de déterminer, si ces dosages contribuent à l'établissement d'un diagnostic précoce des grossesses pathologiques non évolutives. Ceci peut être une avancée dans les pratiques obstétricales et néonatales en raison de la forte incidence de ces complications.

Notre travail porte sur l'étude des effets de micronutriments sur l'issue de la grossesse chez la femme algérienne et sera divisé en deux grandes parties :

La première partie de cette thèse porte sur la synthèse bibliographique de la physiologie de la grossesse, les avortements et l'effet des micronutriments sur l'issue de la grossesse. La deuxième partie consiste à la description du matériel et des méthodes utilisées pour le dosage des différents paramètres biochimiques ainsi que la représentation des résultats obtenus et leur discussion.

*Synthèse*  
*bibliographique*

# *Chapitre I*

## *Physiologie de la grossesse*

## I.1. Définition de la grossesse

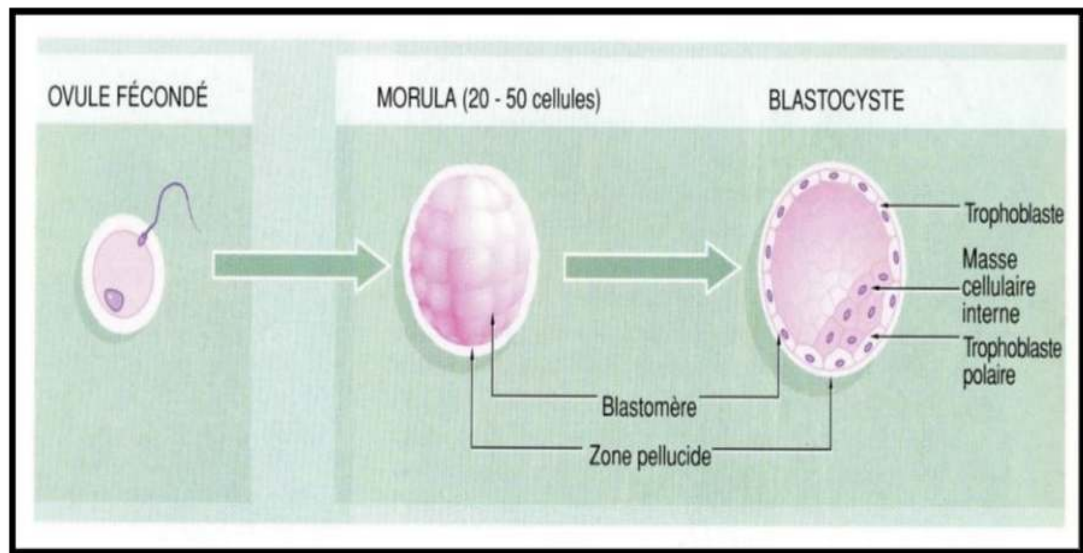
La grossesse est un ensemble de phénomènes physiologiques au cours desquels la progéniture d'une femme se développe dans son utérus, depuis la fécondation jusqu'à l'accouchement (Speroff *et al.*, 2005). Cet ensemble de phénomènes commence avec la fusion de l'ovocyte et du spermatozoïde qui engendrera un zygote qui subira une série de divisions cellulaires pour devenir embryon puis, fœtus (Levallois, 2003).

Chez l'espèce humaine, la grossesse dure environ 9 mois, répartis en 3 trimestres, soit environ 273 jours à partir de la date de la fécondation. Mais les obstétriciens comptent souvent en semaines d'aménorrhée (SA), ou en semaines d'absence de règles et, le début de la grossesse est alors fixé au 1<sup>er</sup> jour des dernières menstruations (Morin, 2002).

## I.2. Les étapes de la grossesse

### I.2.1. Fécondation

La fécondation consiste en la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule pour aboutir un zygote dont le développement aboutit à un embryon, un fœtus puis, un enfant. Elle s'effectue, normalement, dans la Trompe de Fallope au cours des 12 aux 24 heures qui suivent l'ovulation (Tortora *et al.*, 2001) (Figure.N°.1).



**Figure. N°. 1.** Les étapes menant à une grossesse (D'après Morel et Richard, 1992).

### 1.2.2. La formation de la morula

Après la fécondation, il se produit des divisions cellulaires mitotiques rapides du zygote. Ces premières divisions du zygote sont appelées segmentations qui augmentent le

nombre des cellules ne provoquant pas d'augmentation dans le volume de l'embryon. Les segmentations successives produisent une masse solide de cellules dite "la morula" et, qui est entourée par la zone pellucide (Tortora *et al.*, 2001) (Figure.N°.2).

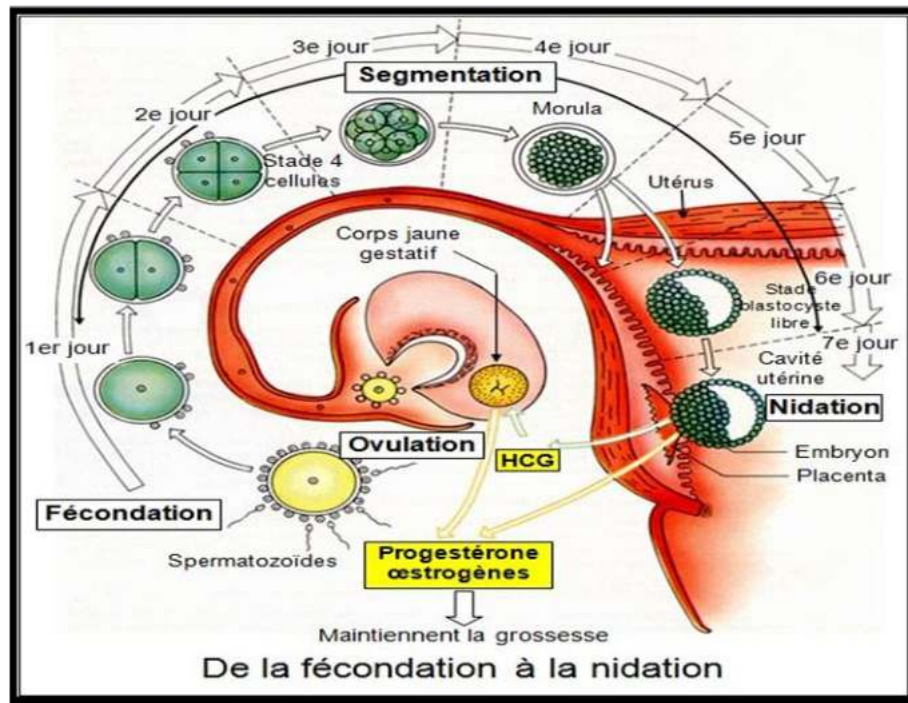


Figure. N° 2. Implantation du blastocyste (d'après Larsen, 2003)

### I.2.3. Développement du blastocyste

À la fin de la quatrième journée, le nombre de cellules de la morula augmente et, celle-ci continue à se déplacer dans la trompe de Fallope pour pénétrer dans la cavité utérine, quatre à cinq jours plus tard. L'amas dense de cellules est alors transformé en une sphère cellulaire creuse qui se logera dans la cavité utérine. Cette sphère prendra le nom de blastocyste composé d'un revêtement cellulaire externe ; le trophoblaste, d'une masse cellulaire interne ; l'embryoblaste et, d'une cavité interne remplie de liquide appelée blastocèle. Au cours du développement embryonnaire, le trophoblaste devient partie intégrante des membranes qui forment la partie fœtale du placenta tandis que la masse cellulaire interne (embryoblaste) formera l'embryon (Tortora *et al.*, 2001).

### I.2.4. La nidation

Le blastocyste reste libre dans la cavité utérine pendant une courte période avant de se fixer à la paroi utérine. Durant cette période, la zone pellucide se désintègre. Le blastocyste est nourri par les sécrétions riches en glycogène des glandes de l'endomètre, parfois appelées lait utérin. Le blastocyste s'attache à l'endomètre environ six jours après la fécondation ; ce processus est appelé nidation.

Durant le processus de nidation, le blastocyste s'implante généralement sur la paroi postérieure du fonds ou du corps de l'utérus et s'oriente de telle façon que la masse cellulaire interne est placée contre l'endomètre. A partir du trophoblaste, deux couches se développent au niveau de la région de contact entre le blastocyste et l'endomètre.

La couche externe appelée syncytiotrophoblaste ne comporte pas de limites cellulaires tandis que le cytotrophoblaste ou la couche interne est composée de cellules distinctes. Au cours de la nidation, le syncytiotrophoblaste sécrète des enzymes qui permettent au blastocyste de pénétrer dans la muqueuse utérine (**Tortora *et al.*, 2001**).

## I.3. Les phases de la grossesse

### I.3.1. Phase maternelle

La phase maternelle s'étend depuis la fécondation jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation. Cette phase est caractérisée par la mise en réserve des nutriments et de l'énergie par l'organisme maternel (**Frenot et Vierling, 2001**). Ces réserves seront transférées ultérieurement au fœtus après des ajustements métaboliques déterminés par les synthèses hormonales; la progestérone permet l'élaboration du système hormonal fœtal et les œstrogènes agissent sur le muscle utérin (**Lepercq *et al.*, 2007**).

### I.3.2. Phase fœtale

La phase fœtale s'étend de la 21<sup>ème</sup> à la 40<sup>ème</sup> semaine de la grossesse. C'est une phase de développement. Le fœtus utilise les réserves accumulées par la mère. Une augmentation exponentielle du poids des annexes et du fœtus est observée. Cette croissance, stimulée par les hormones de la gestation, dépend de l'état nutritionnel maternel avant la conception et des stocks accumulés au cours des premiers mois de la grossesse (**O' Rahilly et Müller, 2000**).

Pendant toute la gestation, le fœtus reçoit, à travers le placenta, un apport intraveineux continu de substrats énergétiques et d'oxygène. Les nutriments reçus couvrent les besoins relatifs à sa croissance et à son métabolisme oxydatif (**Girard, 1993**).

#### **I.4. Modifications physiologiques de la grossesse**

Les modifications physiologiques de la grossesse permettent le développement et la croissance du fœtus, ainsi que l'adaptation de la mère à l'état gravidique et la préparation à l'accouchement (**Descamps et al., 2000**). Il est donc important de connaître ces modifications physiologiques pour reconnaître ce qui relève du normal et de la pathologie, pour évaluer les répercussions potentielles de la grossesse sur la mère et le fœtus en cas de pathologie préexistante et, assurer un accompagnement pertinent (**Cabrol et al., 2003**).

##### **I.4.1. Hormones et grossesse**

###### **1 .4.1.1. Hormones stéroïdiennes**

Les hormones stéroïdiennes ont été largement étudiées dans la littérature en début de grossesse avec leur rôle dans la prévention des avortements, la perte de grossesse récurrente et le travail prématuré. Elles sont sécrétées par le corps jaune dans les ovaires, le placenta prendra le relais après la fécondation (**Lemus et al. ,1992**).

Pendant la gestation, l'action de la progestérone prédomine sur celle des œstrogènes. La progestérone augmente l'épaisseur de l'endomètre et favorise ainsi l'implantation de l'œuf. Elle stimule aussi le développement des glandes mammaires. Elle est la seule hormone qui peut maintenir le calme utérin. Cette hormone s'oppose aux contractions et surpasse toutes les hormones qui les favorisent (**Weissgerber, 2006**).

A l'approche du terme, il y a une diminution très nette de la progestérone et une forte augmentation du taux d'œstradiol (**Wright, 1980**).

###### **I.4.1.2. Hormone lactogène placentaire (HPL)**

Cette hormone est sécrétée par le placenta dès la cinquième semaine de gestation, elle prépare la femme enceinte à l'allaitement. Elle a une action mammothrophique et lactogénique. Elle est responsable des modifications de métabolismes glucidiques et lipidiques par la

mobilisation des acides gras libres, la rétention d'azote, de potassium, de phosphore et de l'augmentation de l'excrétion du calcium (**Ganong, 1973**).

#### **I.4.1.3. L'Ocytocine**

L'ocytocine permet le déclenchement des contractions ou leur maintien. L'ocytocine ne peut agir qu'en fin de gestation car, pour agir, il faut que les cellules présentent des récepteurs spécifiques qui n'apparaissent qu'en fin de gestation grâce à l'œstradiol et à la PGF2 (**Wright, 1980**).

L'ocytocine est produite par la stimulation des récepteurs situés au niveau du col de l'utérus. La pression exercée par l'enfant sur le col utérin augmente et entraîne l'accroissement de la stimulation des récepteurs qui vont stimuler l'hypothalamus et favoriser la sécrétion d'ocytocine qui se fixe sur les muscles et provoque l'activation de la Phospho Lipase C (PLC), l'augmentation du calcium intracellulaire et la diminution de l'efflux calcique ce qui provoquera la contraction (**Ganong, 1973**).

Le taux de prostaglandines dans le liquide amniotique augmente progressivement au cours de la grossesse. La distension de l'utérus et du col entraîne la libération des prostaglandines (PGF2 et PGE2) qui agissent en synergie avec l'ocytocine et entretiennent la contractilité utérine (**Ganong, 1973**).

#### **I.4.1.4. La Prolactine**

La prolactine est une hormone fabriquée par l'hypophyse. Sa sécrétion augmente au cours de la grossesse et notamment en fin de grossesse. Elle stimule la croissance des glandes mammaires et permet le déclenchement de la sécrétion du lait (**Weissgerber, 2006**).

### **I.4.2. Marqueurs sériques et grossesse**

#### **I.4.2.1. L'Hormone chorionique gonadotrophine humaine (HCG)**

L'hormone chorionique gonadotrophique (HCG) est une glycoprotéine formée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , sécrétées dès la fécondation. Cette hormone est sécrétée par le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste. Le seul gène qui code pour la sous-unité alpha est

situé sur le chromosome 6. La chaîne protéique ( $\alpha$  HCG) est composée de 92 acides aminés, elle est identique pour les sous unités  $\alpha$  de la LH, de la FSH et de la TSH (**Islami et al., 2003**).

Cependant, sur le chromosome 19, six gènes codent pour la sous-unité  $\beta$  de l'HCG dont deux sont actifs et sont, probablement, nécessaires à la haute production de cette hormone durant la grossesse (**Islami et al., 2003**).

La production d'HCG est régulée par différentes molécules dont la GnRH, les hormones stéroïdiennes (les oestrogènes qui stimulent la sécrétion de la GnRH et la progestérone l'inhibe), les cytokines et la leptine, l'inhibine (*via* la suppression de GnRH) et, d'autres facteurs de croissance comme l'EGF (*epidermal growth factor*) (**Islami et al., 2003**).

La principale fonction de l'HCG est la stimulation de la stéroïdogénèse maternelle et probablement aussi la stéroïdogénèse fœtale (**Gordon et al., 2002**). Elle maintient le corps jaune et elle assure une bonne évolution de la grossesse jusqu'à la septième semaine, grâce aux œstrogènes et à la progestérone nécessaire à l'évolution de la grossesse jusqu'à la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée; ensuite c'est le placenta qui assurera cette activité hormonale sécrétoire jusqu'à la fin de la grossesse (**Weissgerber, 2006**).

De plus, l'hCG joue un rôle dans l'augmentation de la fonction thyroïdienne du début de la grossesse et ce, avec une diminution de la TSH, comme elle joue le rôle de suppression partielle des réactions immunitaires.

#### I.4.2.2 L'œstriol

L'œstriol libre ou non-conjugué est l'un des marqueurs sériques de la grossesse. C'est une hormone stéroïdienne strictement fœtale synthétisée par l'unité fœto-placentaire. Elle provient du cholestérol fœtal (**Canick et al., 1988**). Une sulfatase, la 16-hydroxylase, et des enzymes placentaires sont impliquées dans la transformation du cholestérol fœtal en œstriol (**Canick et al., 1988**).

L'œstriol reflète le bon fonctionnement de l'activité stéroïdogène des surrénales fœtales (**Pelissier, 2005**). En cas d'anomalie échographique, l'œstriol constitue une aide au diagnostic (**Gagnon, 2008**).

### I.4.2.3. L'alpha-foetoprotéine humaine (AFP)

L'alpha-foetoprotéine humaine (AFP) est une protéine fœtale associée aux tumeurs (protéine oncofœtale) composée de 3% de glycanes glucidiques, de 509 acides aminés et d'une masse moléculaire de 69kD, découverte par **Bergstrand et Czar** en 1957 (**Mizejewski, 2001 et Mizejewski 2004**).

Au cours du développement, l'AFP est synthétisée d'abord dans le sac vitellin, puis dans le foie du fœtus et dans le tractus gastro-intestinal. Chez les adultes normaux, la synthèse de l'AFP dans les cellules hépatiques est fortement réprimée en raison de la méthylation du gène néonatal entraînant seulement la sécrétion de très faibles quantités d'AFP dans la circulation (**Kuo et al., 1984 & Sell et Skelly, 1976**). En revanche, les adultes présentant divers troubles et dysfonctionnements hépatiques tels que la cirrhose, la dégénérescence, les infections virales et les cancers sécrètent des quantités très élevées d'AFP dans le sang (**Sell, 1980**). À la clinique, l'AFP a été utilisée comme biomarqueur pour divers cancers tels que le cancer du foie, des cellules germinales et les tumeurs gastro-intestinales, en plus d'un marqueur de défaut fœtal pendant la grossesse (**Mizejewski, 2004 et Mizejewski, 2002**). Cette protéine exerce différentes activités physiologiques comme un transporteur intravasculaire des protéines et des hormones stéroïdiennes et maintient la pression oncotique et elle pourrait moduler la prolifération cellulaire agissant ainsi de concours avec les facteurs de croissance cellulaire. Elle joue un rôle important pendant la vie embryonnaire comme transporteur d'ions, de la bilirubine, et des acides gras polyinsaturés. Elle pourrait aussi avoir un rôle immunosuppresseur en protégeant les antigènes paternels du fœtus des anticorps circulants maternels et elle jouerait un rôle dans la différenciation sexuelle du cerveau (**De Mees et al., 2005**).

Chez la femme enceinte, la concentration sérique d'AFP augmente à partir de la 12<sup>e</sup> semaine de grossesse et elle varie selon différentes circonstances normales ou pathologique, le poids de la mère, la présence associée d'un diabète de type 1, les troubles rénaux du fœtus et/ou la présence de malformations fœtales.

Après l'accouchement, les valeurs reviennent rapidement à la normale. Chez le nouveau-né : la concentration sérique est élevée pendant les premiers mois de vie, en particulier chez le prématuré, puis diminue progressivement pour atteindre les valeurs de l'adulte vers l'âge de 8 mois (**Kohlwes et al., 2003**).

# *Chapitre II*

## *Les avortements*

### II.1. Définition

Les avortements spontanés (AS) aussi appelés interruptions spontanées ou fausses couches sont très fréquents et représentent une grande part de l'activité des urgences d'un service de gynécologie-obstétrique (Vinatier *et al.*, 1994). Un avortement spontané précoce complique 10 à 20 % des grossesses cliniques (Blohm *et al.*, 2008) et il se traduit par l'expulsion d'un produit de conception avant 22 semaines d'aménorrhée révolues ou l'expulsion d'un embryon ou d'un fœtus de poids inférieur à 500 grammes.

Les pertes avant 20 semaines sont décrites sous le vocable d'avortements et les pertes fœtales plus tardives sont qualifiées de mort fœtale (Beucher *et al.*, 2009).

Les avortements sont pris en considération en fonction des périodes de développement suivantes:

- La période pré-embryonnaire, de la fécondation jusqu'à 5 semaines de gestation ;
- La période embryonnaire, de 5 à 9 semaines de grossesse ;
- La période fœtale, au-delà de 10 semaines.

D'après Goldstein (1994), 13,4 % des grossesses échouent, 87% des échecs ont lieu durant les deux premières périodes (pré-embryonnaire et embryonnaire) et 13% des interruptions se produisent en période fœtale.

Donc, il est important de définir les différents concepts cliniques que recouvrent les termes de fausses couches précoces (FCS). En effet, chaque concept correspond à une situation clinique spécifique et à une prise en charge particulière.

- Fausse couche en cours:** se caractérise par la présence de métrorragies avec expulsion en cours (Ankum *et al.*, 2001).
- Grossesse arrêtée:** est une grossesse du premier trimestre avec un embryon sans activité cardiaque (*embryonic demise*) ou un œuf clair (*anembryonic pregnancy*) (Creinin *et al.*, 2001).
- Fausse couche complète:** c'est la disparition des signes d'avortement comme les douleurs et les saignements avec la présence d'une vacuité utérine à l'échographie (Condous, 2004).
- Fausse couche incomplète:** c'est la persistance de douleurs et/ou de saignements secondaires à la persistance d'une rétention retrouvée à l'échographie (présence de débris ovulaires) (Agostini *et al.*, 2005).

- e. **Fausse couche précoce (FCP)**: est l'expulsion spontanée d'une grossesse intra-utérine de moins de 14 SA (**Beucher et al., 2009**).
- f. **Fausse couche tardive (FCT)**: est l'expulsion spontanée d'une grossesse entre 14 SA et 22 SA. Elle complique moins de 1% des grossesses (**Carcopino et al., 2009**).
- g. **Mort fœtale *in utero* (MFIU)**: est l'arrêt spontané de l'activité cardiaque à partir de 14 SA ou à partir d'un terme de 28 SA ou d'un poids fœtal de plus de 1kg, elles surviennent dans près de 2 % des grossesses (**Capmas et al., 2009**).
- h. **Fausses couches spontanées précoces « à répétition » (FCR)** : elles sont définies par trois FCP consécutives. Elles concernent 1 à 5 % des couples fertiles (**Beucher et al., 2009**).

## II.2. Prise en charge et les facteurs de risque

La prise en charge des avortements repose sur la recherche des facteurs de risque à distinguer des variables confondantes (gravidité, âge, issue de la grossesse précédente et Nutrition). Ainsi, le tableau suivant présente les éléments d'investigation des avortements:

**Tableau.1.** Protocoles d'investigation des avortements (**D'après d'ETEP 1995**).

Antécédents	âge, stérilité et avortements
<b>Facteurs génétiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• caryotype des parents</li> <li>• caryotype du produit d'avortement ou diagnostic anténatal lors de la grossesse suivante.</li> </ul>
<b>Facteurs utérins</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hystérosonographie,</li> <li>• échographie parfois hystérogographie, cœlioscopie,</li> <li>• échographie pelvienne,</li> </ul>
<b>Causes endocriniennes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dosage de LH et FSH.</li> </ul>
<b>Causes auto-immunes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac anticoagulants circulants,</li> <li>• Ac anticardiolipine (IgM et IgG),</li> <li>• Ac antinucléaires, taux de prothrombine, temps de céphaline-kaolin Ac antithyroïdiens.</li> </ul>
<b>Causes infectieuses</b>	sérologie : listériose, chlamydiae, mycoplasme.
<b>Causes allo- immunes</b>	Anticorps anti-paternels, numération des cellules NK.

**II.2.1. Facteurs génétiques****II.2.1.1. Anomalies parentales**

D'après **Israel et al., 1996**, 3 % à 6 % des couples souffrant d'avortement ont une anomalie chromosomique, avec prévalence de 10 à 20 fois supérieure à celle de la population générale. Par ordre de fréquence, il peut s'agir d'une translocation équilibrée, d'une mosaïque et plus rarement d'une délétion ou d'une inversion. La probabilité qu'un des membres du couple ait une anomalie chromosomique augmente avec le nombre d'avortements spontanés et les femmes sont les plus affectées.

**II.2.1.2. Anomalies du caryotype embryonnaire**

La fréquence des anomalies du caryotype des produits d'avortement est d'au moins 50 % au cours du premier trimestre et 20 % durant le second. La découverte d'une monosomie, d'une triploïdie et même d'une trisomie lors d'un avortement n'augmente pas le risque d'un nouvel avortement avec une anomalie identique. La proportion des avortements aneuploïdes varie de 6 à 60%. L'anomalie chromosomique la plus fréquemment diagnostiquée chez l'embryon dans les avortements est la translocation déséquilibrée transmise par l'un des parents (**Israel et al., 1996**).

**II.2.1.3. Anomalies géniques**

Des mutations géniques peuvent être responsables d'avortement même avec un caryotype embryonnaire normal. Elles entraînent :

- Mutations d'un gène codant une protéine critique pour le développement.
- Mutations aboutissant à une anomalie métabolique létale.
- Anomalies des oncogènes (**Chee et al., 1996**).

**II.2.2. Malformations utérines**

Une malformation utérine est signalée dans 15 à 30% des cas. La prévalence des malformations utérines congénitales dans la population générale est estimée entre 0,1 et 10 %. Une enquête auprès de 680 femmes ayant une histoire gynécologique normale a décelé 3,2 % d'anomalies mullériennes dont 90 % sont des utérus cloisonnés, 5 % des utérus unicornes et 5 % des utérus bicornes. Malgré de nombreuses controverses concernant la responsabilité des malformations, les travaux les plus récents semblent confirmer l'association causale (**Patton, 1994**).

**II.2.3. Anomalies endocriniennes**

De toutes les étiologies proposées pour expliquer les avortements, les anomalies endocriniennes sont les plus controversées (**Jean-Claude ,1990**).

**II.2.3.1. L'insuffisance lutéale (IL)**

L'insuffisance lutéale est caractérisée par une production insuffisante de progestérone retentissant sur la qualité de l'endomètre nuisant à l'implantation. Le dysfonctionnement du corps jaune pourrait trouver son origine dans une anomalie de la folliculo-genèse. Un retard dans la sécrétion de l'HCG pourrait induire un mauvais corps jaune (**Kupesic et Kurjak ,1997**).

Un embryon défectueux peut sécréter trop peu d'HCG pour stimuler le corps jaune. Il est impossible de différencier une insuffisance lutéale maladie du corps jaune et une insuffisance lutéale secondaire à un défaut embryonnaire. La phase lutéale est évaluée sur sa durée, sur les dosages de progestérone et de protéines endométriales et sur le développement de l'endomètre (**Glock et Brumsted, 1995**).

**II.2.3.2. Diabète sucré**

Les femmes souffrant de diabète insulino dépendant correctement équilibré n'ont pas d'excès d'avortement. Mais un mauvais contrôle de la glycémie augmente le risque à 15% lorsque l'hémoglobine glycosylée est normale contre 45%, en cas d'anomalie (**Mills et al., 1988**).

**II.2.3.3. Maladies thyroïdiennes**

Les hormones thyroïdiennes interviennent dans la croissance trophoblastique et le développement embryonnaire au premier trimestre. L'hyperthyroïdie pourrait être responsable d'avortement. C'est surtout l'hypothyroïdie qui est à l'origine des avortements par l'intermédiaire des anticorps antithyroïdiens mais il est à noter que le taux de ces anticorps diminue au cours de la grossesse lorsque celle-ci évolue correctement (**Glinoe et al., 1991**).

**II.2.3.4. Les ovaires polykystiques OPK et hypersécrétion de LH**

L'étiologie endocrinienne des avortements se focalise sur les ovaires polykystiques et sur l'hypersécrétion d'LH. Les premières observations suggèrent que chez les femmes incluses dans un protocole de fécondation *in vitro*, une sécrétion élevée de LH en phase folliculaire aboutit à moins de fécondations et à plus d'avortements. Ceci a été confirmé chez les femmes concevant spontanément ou après induction de l'ovulation. Une hypersécrétion d'LH est à la fois un marqueur d'infertilité et de risque d'avortement (**Balen et al., 1993**). Trois mécanismes sont proposés pour expliquer l'effet délétère:

- LH agirait sur l'ovocyte en induisant prématurément la seconde méiose, donc œuf âgé
- LH stimule la sécrétion thécale stimulante de testostérone: les ovaires polykystiques sont plus fréquents en cas d'avortement à répétition, mais cet aspect n'est pas prédictif d'un avortement ultérieur, contrairement aux concentrations plus élevées de testostérone totale, libre et de sulfate de DHEA;
- LH aurait des effets néfastes directement sur l'endomètre.

82% des patientes souffrant d'avortement présentent des ovaires polykystiques en échographie contre 18% des femmes d'un groupe témoin (**Balen et al., 1993**).

### II.2.4. Facteurs de l'environnement et grossesse

Le tabagisme et l'alcoolisme maternels pourraient avoir un rôle dans les avortements. Ainsi, les champs magnétiques (écrans vidéo, couvertures et matelas chauffants) ont été accusés, mais leur responsabilité ne pourra être retenue qu'après évaluation des doses et des fréquences des champs magnétiques environnants. Des expositions à certains polluants (gaz anesthésiques, formaldéhyde, plomb, oxyde d'éthylène) ont été impliqués dans les avortements sporadiques (**Wisborg et al., 2003 & Andersen et al., 2012**).

### II.2.5. Les Infections

Divers agents infectieux peuvent induire des avortements sporadiques (*Herpes simplex virus*, virus de la rubéole, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma hominis*). Plusieurs conditions doivent être remplies pour retenir la responsabilité d'un agent infectieux dans les avortements à répétition:

- Longue persistance;
- Infestation peu symptomatique pour échapper au diagnostic et au traitement ;
- Avoir accès au fœtus soit pour infecter les tissus fœtaux, soit pour y entre tenir une réponse inflammatoire. Peu d'agents infectieux répondent à ces exigences. L'intérêt s'est récemment déplacé vers les infections vaginales qui pourraient intervenir dans les avortements tardifs et les accouchements prématurés (**Osser et al., 1996**).

**II.2.6. Anomalies immunologiques**

Le rôle du système immunitaire est de défendre un organisme contre les antigènes étrangers. Au cours de la grossesse, le fœtus, antigeniquement étranger à sa mère, doit échapper aux réactions de rejet grâce à l'adaptation du système immunitaire maternel, le fœtus étant considéré comme une allogreffe. Des données sur les interactions immunologiques se déroulant à l'interface materno-foetale ont permis de situer les défaillances immunologiques potentiellement responsables des échecs de grossesse à trois niveaux: réaction pathologique auto-immune, réaction allo-immune maternelle et immunité naturelle (**Sargent *et al.*, 1988**).

## *Chapitre III*

# *Effet des micronutriments sur l'issue de la grossesse*

### III.1. Définition

Les micronutriments sont les vitamines et les minéraux indispensables pour l'organisme, mais en petites quantités. Ils jouent un rôle essentiel dans la division cellulaire, la croissance, le développement du fœtus et dans de nombreuses fonctions biologiques, y compris la synthèse des protéines aidant à réguler le fonctionnement du système immunitaire et reproducteur, ainsi que le métabolisme des acides nucléiques (**Ayoubi et al.,2012**).

Plusieurs études suggèrent que les carences gestationnelles en micronutriments peuvent affecter négativement l'issue de la grossesse et causer des malformations fœtales par des troubles neuronales, un retard mental, une diminution de l'immunité et la mort prématurée (**Ayoubi et al.,2012**).

### III.2. Données sur les micronutriments

#### III.2.1. La vitamine B9

La vitamine B9 est représentée par le groupe des folates (du mot latin "*Folium*", "feuille" à cause de l'abondance de la vitamine B9 dans les végétaux foliacés (**Guéant et al., 2007**). C'est une vitamine du groupe B, hydrosoluble, appartenant au groupe des folates, composés organiques synthétisés par les plantes et les micro-organismes et non pas par l'homme (**Guéant et al., 2007**).

Sous le terme « vitamine B<sub>9</sub> » sont incluses toutes les substances dont la formule dérive de celle de l'acide folique ou acide ptéroylglutamique. L'acide ptéroylglutamique est constitué d'un noyau ptéridine, d'une molécule d'acide para-aminobenzoïque et d'une molécule d'acide glutamique. L'acide folique est une forme synthétique et le précurseur de la forme active, le tétrahydrofolate (THF) (**Rebeille et al., 2006**).

La majorité des folates se trouve sous forme de polyglutamates, comportant d'un à neuf résidus glutamates. Les polyglutamates constituent 90% des folates normalement présents dans le foie, les érythrocytes et les plantes (**Guilland, 2013**).

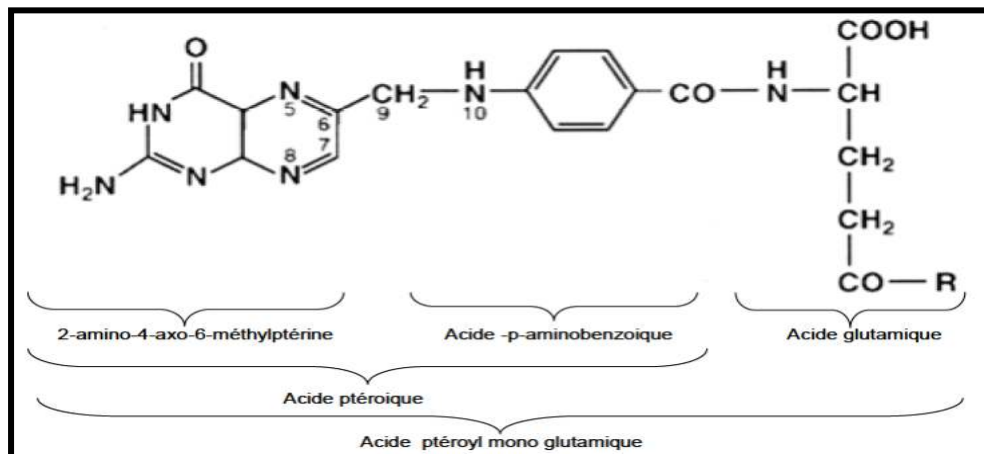


Figure. N°. 3. Structure de l'acide folique (D'après, Lucock *et al.*, 2000)

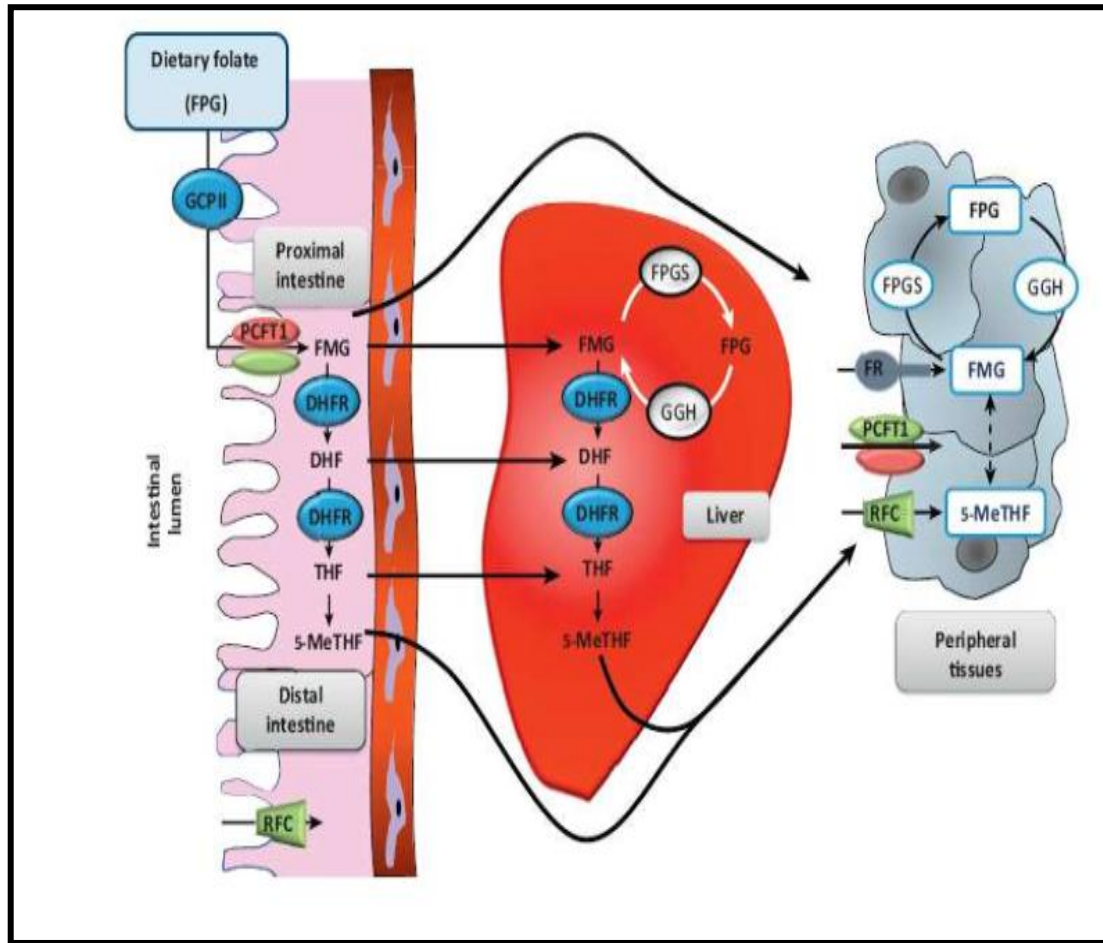
### III.2.1.1 Propriétés physicochimiques

L'acide folique est de couleur jaune clair, il est peu soluble dans l'eau et insoluble dans l'éthanol et l'éther mais soluble en milieu alcalin. Tous les folates sont sensibles et instables lorsqu'ils sont exposés à la lumière et à l'air (Guilland, 2013).

### III.2. 1.2. Métabolisme de l'acide folique

#### ➤ Absorption intestinale

L'absorption des folates a lieu principalement dans le duodénum et le jéjunum proximal. Les polyglutamates liés aux protéines alimentaires sont libérés sous l'action des protéases digestives, puis scindés en monoglutamates par une conjugase présente dans la lumière intestinale et sur la bordure en brosse. Deux protéines de transport sont impliquées dans la capture des monoglutamates par les entérocytes: principalement, le reduced folate carrier (RFC), une protéine transmembranaire exprimée dans de nombreux tissus, et le proton-coupled folate transporter (PCFT). Le PCFT pourrait jouer un rôle essentiel dans le transport intestinal des folates (McDowell, 2000 & Smulders et Stehouwer, 2005) (Figure. N°4)



**Figure. N°.4 :** Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (d'après Gueant *et al*, 2013).

Dans le sang, une partie importante des folates circulants est sous forme de 5-méthyl-THF monoglutamate; les tissus ne peuvent capter les polyglutamates contenant plus de trois résidus glutamates. Les folates présents dans la circulation portale sont captés dans le foie *via* RFC. Ils sont alors transformés en polyglutamates et stockés ou libérés dans la circulation sanguine. Les concentrations des folates sont comprises entre 12 et 40 nmol/l (5 à 20 µg/l) dans le sérum. Ces concentrations sont respectivement 20 fois et 1000 fois plus élevées dans les érythrocytes et le foie que dans le sérum. Une partie des folates est sécrétée dans la bile et réabsorbée dans l'intestin par la circulation entérohépatique (Lucock *et al.*, 2000).

Dans le plasma, les folates sont liés à des protéines de liaison spécifiques et ayant une affinité élevée, c'est les folate-binding proteins (FBP), et à des protéines de faible affinité (l' $\alpha$ 2-macroglobuline, l'albumine et la transferrine) (Guilland, 2013). Après internalisation, l'acide folique doit être réduit pour être actif. Il subit aussi une polyglutamation afin d'être retenu au sein de la cellule, principalement, sous forme de pentaglutamate.

Le foie capte rapidement 10 à 20 % des folates alimentaires, avec une préférence pour les dérivés non méthylés et non réduits. Les tissus périphériques s'enrichissent en dérivés fonctionnels, réduits et méthylés. Dans les tissus, les folates endogènes sont presque exclusivement des folylpolyglutamates tandis que les ptéroylmonoglutamates prédominent dans le plasma et les urines. La transformation des folates en polyglutamates est nécessaire pour la rétention tissulaire et la concentration des folates transportés; bien que le métabolisme en dérivés polyglutamates soit considéré comme un mécanisme de stockage, les folylpolyglutamates sont aussi des coenzymes actifs (**Guéant *et al.*, 2007 et Matherly et Goldman, 2003**).

Le foie est l'organe de stockage essentiel. Chez l'homme, les réserves en folates sont relativement faibles (de 5 à 15mg), compte tenu des besoins quotidiens (300 µg/jour). Les folates hépatiques sont excrétés dans la bile et réabsorbés. Ce cycle entérohépatique serait l'un des mécanismes impliqués dans le recyclage des folates. Les autres compartiments des folates sont les tissus à renouvellement rapide, essentiellement la moelle osseuse et les épithéliums buccaux, digestif et vaginal (**Guéant *et al.*, 2007**).

Les folates sont filtrés par le glomérule et réabsorbés au niveau du tubule proximal. En cas de concentration importante des folates plasmatiques, les capacités de réabsorption sont dépassées et les dérivés de l'acide folique sont éliminés dans les urines (**Guéant *et al.*, 2007**).

### III.2.1.3. Fonctions biochimiques et rôles physiologiques

Les folates jouent un rôle majeur dans les échanges de groupements mono-carbonés; ils possèdent, donc, une fonction essentielle dans le métabolisme de l'histidine et de la glycine (**Guéant, 2003 ; Munnich *et al.*, 1987**). Ils servent d'accepteurs et de donneurs d'unités monocarbonées dans un grand nombre de réactions du métabolisme des acides aminés et des nucléotides.

Les formes biologiquement actives de la vitamine B<sub>9</sub> se trouvent à l'état réduit et interviennent principalement dans plusieurs processus biochimiques dont deux sont essentiels à la survie et à la multiplication des cellules; la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) et la méthylation de l'homocystéine en méthionine (**Guilland, 2013**).

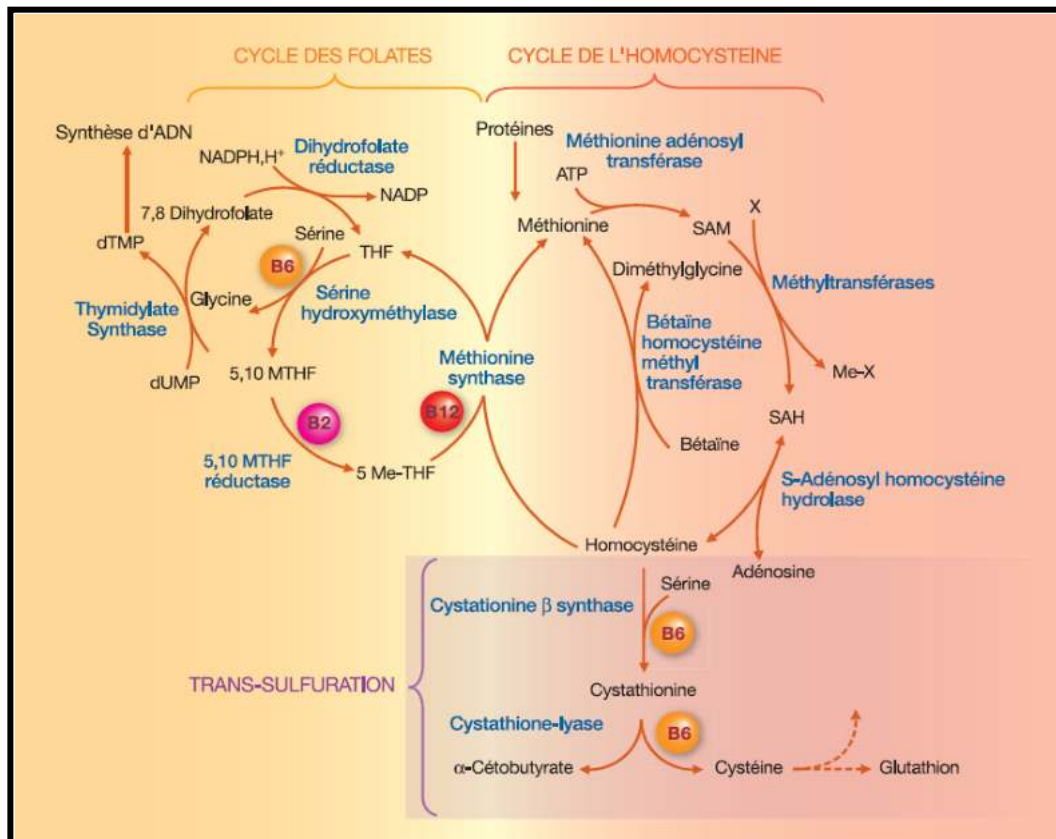


Figure. N°.5 : Cycle des folates et métabolisme des monocarbone (d'après Blaise *et al.*, 2007)

### III.2.1.4. Cycles des folates et du métabolisme des monocarbone

Le métabolisme des monocarbone vient du transfert de l'unité hydroxyméthyle de la sérine vers le tétrahydrofolate (THF). Le groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) est par la suite intégré dans le cycle de l'homocystéine où il donne lieu aux réactions de transméthylation et à la synthèse des aminothiols (figure 5).

Le 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH<sub>3</sub>THF) est la forme principale des folates circulant chez les mammifères. Il est capté à partir du milieu circulant par les cellules des tissus périphériques *via* des transporteurs spécifiques (Sierra et Goldman, 1999). Parmi ces transporteurs, le *reduced folate carrier* (RFC), dont le gène est localisé sur le chromosome 21 (SLC19A1, région 21q22.2-22.3) en est un candidat. À l'intérieur de la cellule, le 5-CH<sub>3</sub>THF est transformé en THF à la suite du transfert du groupement méthyle à l'homocystéine. En acceptant l'unité hydroxyméthyle de la sérine, le THF donne le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-CH<sub>2</sub>THF) dans une réaction catalysée par la sérine hydroxyméthyltransférase. Le 5,10-CH<sub>2</sub>THF formé est soit réduit en 5-CH<sub>3</sub>THF par la 5,10-

méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), soit oxydé en 5,10- méthényltétrahydrofolate dans une réaction réversible catalysée par la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (MTHFD). Les folates participent à la synthèse des noyaux puriques dans lesquels le C2 et le C8 sont formés par le 10-formyltétrahydrofolate. Dans la synthèse des noyaux pyrimidiques catalysée par la thymidylate synthase, l'acide désoxythymidyl-5'-monophosphate (dTMP) est synthétisé à partir de l'acide désoxyuridyl-5'- monophosphate (dUMP) et du 5,10-CH<sub>2</sub>THF. Le produit de cette réaction est le dihydrofolate (DHF) qui est par la suite réduit en THF par la dihydrofolate réductase (**Rosenblatt, 1995**).

#### III.2.1.4.1. Cycle de l'homocystéine et réaction de transméthylation

Selon **Guilland (2013)**, l'homocystéine est un acide aminé soufré qui n'intervient pas dans la synthèse protéique. Il est métabolisé suivant deux voies principales qui pour un état physiologique normal sont en équilibre. Il s'agit d'une part, de la transformation en cystathionine catalysée par la cystathionine b-synthase (CBS) et d'autre part, de son recyclage vers la méthionine catalysée par la méthionine synthase, dont l'activité dépend de la méthionine synthase réductase, de la MTHFR et la sérine-hydroxyméthyltransférase. Le gène codant la CBS est localisé sur le chromosome 21 (région 21q22.3). La relation entre la trisomie 21 et l'homocystéine se trouve à ce carrefour des réactions biologiques fondamentales des monocarbone. Les réactions de transméthylation sont assurées par les enzymes spécifiques du groupe des méthyltransférases (EC : 2.1.1.x), à partir de la S-adénosylméthionine (AdoMet). L'AdoMet sert de donneur de groupements méthyles à plus d'une centaine d'accepteurs (**Cantoni, 1975**). La S-adénosylhomocystéine (AdoHcy) formée au cours de la transméthylation, est à son tour hydrolysée dans une réaction réversible qui génère l'homocystéine.

#### III.2.2. La vitamine B12 ou Cobalamine (Cbl)

La vitamine B12 est d'origine alimentaire et est uniquement apportée par les produits animaux. Elle est représentée par un ensemble de composés appartenant à la famille des cobalamines: cyanocobalamine, hydroxocobalamine, méthylcobalamine et adénosylcobalamine. Les cobalamines ont une structure chimique proche de l'hème, mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt, d'où le nom de cobalamines (**Stabler, 1999**).

III.2.2.1. Métabolisme

➤ Absorption intestinale

Les cobalamines contenues dans les aliments sont d'abord libérées des protéines auxquelles elles sont liées par l'acidité et la pepsine gastriques. Elles se lient ensuite à l'haptocorrine, car l'affinité de la vitamine B<sub>12</sub> pour cette protéine d'origine salivaire est supérieure à celle pour le facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales de l'estomac. Dans la lumière intestinale, l'haptocorrine est dégradée par des enzymes protéolytiques d'origine pancréatique, permettant aux cobalamines de se lier au facteur intrinsèque. Le complexe vitamine B<sub>12</sub> -facteur intrinsèque est ensuite absorbé par endocytose dans l'iléon distal, après fixation sur un récepteur multiligand formé de la cubiline associée à la mégaline et à la protéine *amnionless*. Le facteur intrinsèque est dégradé dans le compartiment lysosomal et la vitamine B<sub>12</sub> est transférée sur la transcobalamine synthétisée par les entérocytes. Le complexe ainsi formé passe ensuite dans la circulation générale (Guiland, 2013).

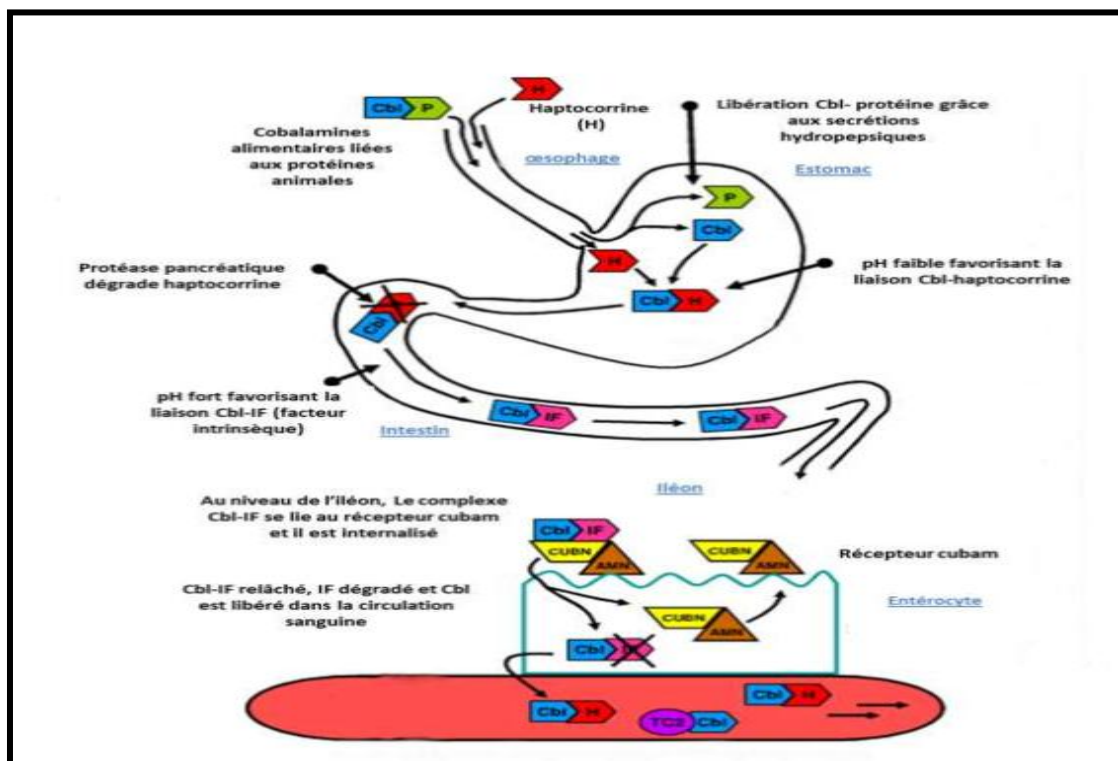


Figure.N°.6 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 (d'après Tanner *et al.*, 2012).

H : haptocorrine ; IF : facteur intrinsèque; Cbl : cobalamine; TC2 : transcobalamine II.

Le complexe vitamine B<sub>12</sub> -transcobalamine est internalisé par endocytose dans toutes les populations cellulaires après fixation sur un récepteur spécifique. L'haptocorrine est également présente dans le sang et dans la plupart des cellules. Elle participe au stockage et à l'élimination dans la bile des cobalamines et de leurs analogues structuraux (**Russell-Jones et Alpers, 1999**).

Le foie est l'organe le plus riche en vitamine B<sub>12</sub> et l'importance des réserves hépatiques permet de couvrir les besoins en cette vitamine pendant environ trois ans. Il existe aussi un cycle entérohépatique qui permet d'économiser les stocks en la vitamine B<sub>12</sub> (**Guilland, 2013**).

La vitamine B<sub>12</sub> est éliminée par la bile, les urines et les fèces. La demi-vie de la vitamine B<sub>12</sub> dans l'organisme est d'environ un an (**Guéant et al., 2007**).

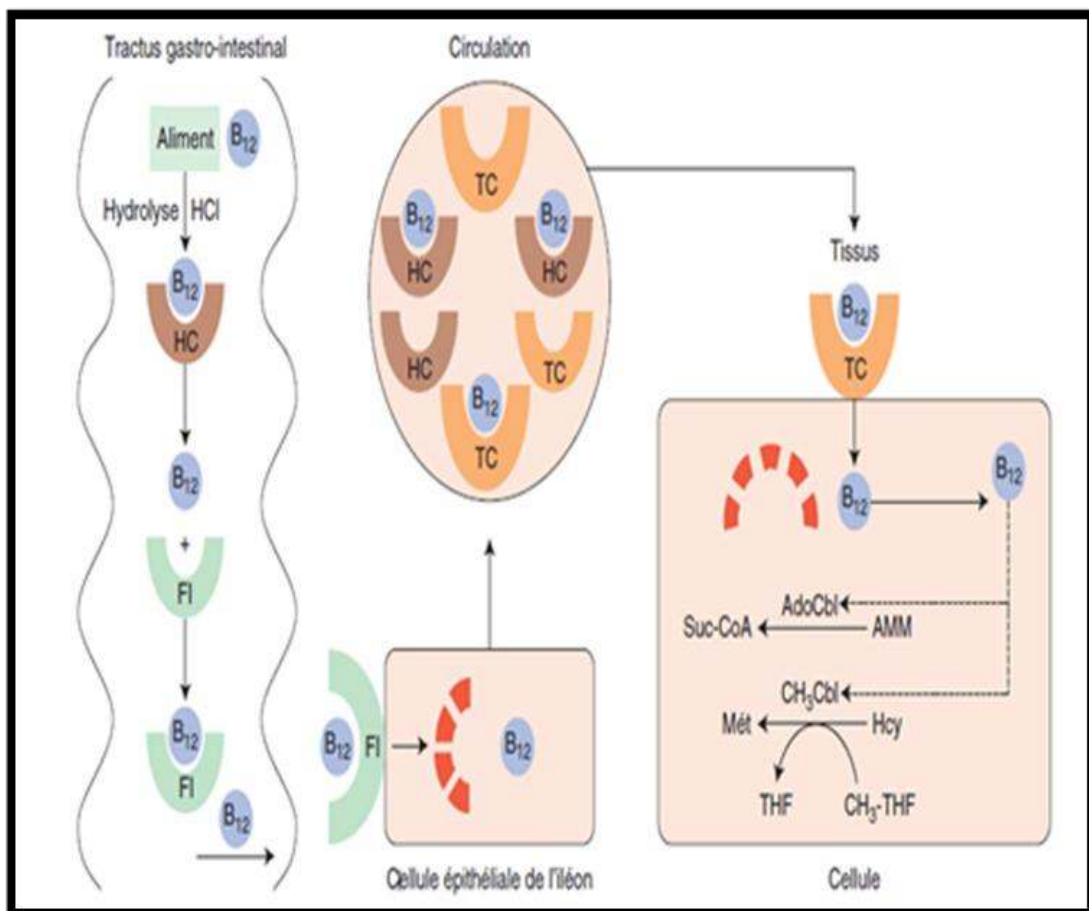


Figure.N°.7 : Fonctions métaboliques de la vitamine B<sub>12</sub> (d'après Guilland, 2013)

### III.2.2.2. Fonctions biochimiques et rôles physiologiques

Les enzymes à coenzyme B<sub>12</sub> sont impliquées dans deux types de réactions; les réactions de transméthylation et d'isomérisation (**Guilland, 2013**).

#### III.2.2.3.1. Réaction de transméthylation

La méthylcobalamine est le coenzyme de la méthionine synthase, qui catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine. Le groupement méthyle transféré est apporté par le 5-méthyl-THF, ce qui permet la régénération du THF (Figure 3) (**Guilland, 2013**).

#### ➤ Réaction d'isomérisation

La 5'-adénosylcobalamine est le coenzyme de la méthylcoenzyme A mutase, qui catalyse la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par transfert intrachaîne d'un atome d'hydrogène. Cette réaction est mitochondriale et permet l'oxydation du succinyl-CoA dans le cycle de l'acide citrique (**Turner et Talbot, 2009**).

Une carence en vitamine B<sub>12</sub> a pour conséquences:

- Une diminution de la synthèse de méthionine et donc de S-adénosylméthionine, le principal donneur de méthyles; ce qui perturbe le métabolisme des acides aminés soufrés et explique l'excrétion urinaire élevée d'homocystéine;
- Un blocage de la régénération du THF à partir du 5-méthyl-THF;
- Une accumulation d'homocystéine dans le secteur plasmatique (**Turner et Talbot, 2009**).

### III.2.3. Le Fer

Le fer est un micronutriment essentiel à toute forme de la vie et présent à l'état de trace dans l'organisme, principalement dans l'intestin grêle (**Beaumont et Girot, 2010**). Il intervient dans de nombreuses activités biologiques (**Beguin, 2002**), il est incorporé dans les protéines héminiques et les enzymes respiratoires (**Silbernagl et Lang, 2002**), l'intégration dans l'hème de l'hémoglobine permet le transport de l'oxygène aux tissus et aux cellules (**Vaulont, 2014 ; Baudina, 2012**). Le fer est un cofacteur qui joue un rôle critique dans de nombreuses réactions enzymatiques qui intervient dans la synthèse de l'ADN (**Beaumont et Karim., 2013**). Au cours de la grossesse, les besoins en fer sont encore plus élevés, il est nécessaire à

la croissance fœtale, et pour l'élévation de la masse érythrocytaire, et le fonctionnement placentaire (Ayoubi *et al.*, 2012).

### III.2.3.1. Métabolisme du fer

#### - Absorption digestive du fer

L'absorption intestinale du fer se déroule au niveau des entérocytes différenciés du duodénum et du haut jéjunum (Troadek *et al.*, 2006).

Le fer de l'alimentation existe sous deux formes, héminique et non héminique; la forme héminique, présente par exemple dans les viandes rouges, est la mieux absorbée. Cependant, au niveau moléculaire, les mécanismes d'absorption de la forme héminique sont mal connus (Anderson *et al.*, 2005). Seuls les entérocytes matures au sommet de la villosité duodénale expriment les protéines nécessaires à l'absorption du fer non héminique.

La régulation de l'absorption intestinale du fer est essentielle car il n'existe aucun moyen pour l'organisme pour éliminer le fer absorbé en excès. Cette régulation dépend bien sûr de la disponibilité du fer dans l'alimentation, mais aussi d'une régulation systémique complexe. Il avait été proposé depuis longtemps l'existence d'un régulateur des stocks (*store regulator*) qui module l'absorption en fonction du niveau des réserves de fer tissulaires, et d'un régulateur lié aux besoins de l'érythropoïèse (*erythroid regulator*) qui active l'absorption en réponse à une expansion de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse (Andrews, 1999).

Le fer est distribué dans l'organisme par le courant sanguin. Le système de transport du fer dans le plasma fait intervenir la transferrine. Cependant, lorsque le fer plasmatique n'est pas lié à la transferrine, il est dénommé « fer non lié à la transferrine » (FNLT).

La transferrine (TF) est une  $\beta$ -globuline synthétisée dans le foie et sécrétée dans le plasma. Sa caractéristique majeure est de présenter deux sites de liaison capables de prendre chacun en charge un atome de fer ferrique  $Fe^{3+}$ . Le fer, sous sa forme complexée à la transferrine, est alors non toxique pour l'organisme (Troadek *et al.*, 2006).

Le fer peut aussi être transporté par des systèmes indirects, comme l'haptoglobine, liant l'hémoglobine et avec l'hémopexine, liant l'hème libre, provenant de l'hémolyse intravasculaire des érythrocytes. Ces deux protéines sont synthétisées et sécrétées par l'hépatocyte. Enfin, la ferritine, protéine de stockage intracellulaire du fer, est retrouvée aussi dans le plasma. Elle pourrait jouer un rôle dans le transport plasmatique du fer, notamment au cours des surcharges hépatiques en fer, où le taux de ferritine plasmatique est élevé.

Cependant, il n'est pas prouvé que la ferritine plasmatique soit particulièrement riche en fer (**Troadec et al., 2006**).

L'acteur principal de stockage du fer est la ferritine et, l'organe de réserve du fer par excellence est le foie. Cependant, le fer peut aussi s'accumuler dans le système réticulo-endothélial, le cœur, le pancréas et le cerveau (**Troadec et al., 2006**).

L'élimination du fer est effectuée par la desquamation des cellules intestinales ou des cellules de l'épiderme ainsi que les excréctions urinaire et biliaire. Chez la femme, ces pertes sont majorées par les hémorragies menstruelles et de la grossesse (**Troadec et al., 2006**).

### III.2.3.2. Rôles du fer

Le fer est utilisé dans les organismes vivants, essentiellement, pour assurer le transport d'oxygène en entrant dans la composition de l'hémoglobine favorisant l'oxygénation du sang, ou la catalysation des réactions de transfert d'électrons, de fixation d'azote ou de synthèse d'ADN (**Beaumont et Girot, 2010**).

- Il est indispensable au bon fonctionnement du système immunitaire et permet ainsi à l'organisme de mieux se défendre contre les diverses infections, intervient dans la croissance des tissus et, il stimule les fonctions hépatiques.
- Le fer est considéré comme un anti-oxydant qui permet à l'organisme de lutter contre les radicaux libres responsables du vieillissement prématuré de la peau.
- Il participe aussi à la régulation de croissance cellulaire et à leur différenciation (**Beaumont et Girot, 2010**).

### III.2.4. Le calcium

Le calcium est un élément minéral essentiel pour l'organisme. Sachant qu'il représente environ 2 % des atomes du corps humain, il intervient dans la formation du squelette et des dents, ainsi que dans la contraction musculaire (**Bergel et Belizan, 2002**).

Les déficits en calcium sont peu fréquents car les apports calciques sont suffisants lors d'une alimentation normale avec consommation de produits laitiers et qu'il existe un phénomène d'adaptation digestive par augmentation de l'absorption (**Bergel et Belizan, 2002**). Cependant, une carence (rare) peut exister lors de déséquilibres alimentaires avec une consommation faible de produits laitiers, lors d'une prise de corticoïdes tout au long de la grossesse ou bien encore en raison d'une pathologie rénale entraînant une fuite de calcium. Elle peut conduire alors à une hypocalcémie maternelle et fœtale. Ces déficits en Calcium sont également incriminés dans la survenue d'hypertension artérielle gravidique (**Bergel et Belizan, 2002**).

Un apport insuffisant en calcium peut entraîner le développement d'une pré-éclampsie et accroître le risque de prématurité ou de fausse couche. En cas d'apport insuffisant, le bébé utilisera les réserves maternelles, ce qui entraînerait un risque de décalcification chez la femme enceinte (**Perrin et Simon, 2002**).

# *Partie expérimentale*

# **Chapitre I**

## **Matériel et Méthodes**

## I.1 Matériel

### I.1.2 Population d'étude

Une étude rétrospective a été réalisée durant l'année 2015 sur des patientes hospitalisées dans le service de gynécologie obstétrique du centre hospitalier de *Meriem Bouatoura*- Batna (Algérie) pour une métrorragie du premier ou du deuxième trimestre de la grossesse. L'échantillon étudié comprend **138** femmes enceintes, dont **69** de ces patientes ont été hospitalisées pour des complications de grossesse du premier trimestre (**n=39**) (de 5 à 13 semaines d'aménorrhée) et du deuxième trimestre (**n=30**) (de 14 à 22 semaines d'aménorrhée). Un groupe témoin composé de **69** femmes répartis comme le précédent ayant mené une grossesse normale et évolutive.

Les patientes ont été identifiées par des questionnaires comprenant : les antécédents familiaux, l'âge, la date et lieu de naissance, ainsi que les données gynécologiques et obstétriques de la mère (parité et issue des grossesses, naissances prématurées et à terme, avortements et mort in utéro). Tout antécédent de malformations congénitales a été enregistré (**voir annexe.1**). Les critères d'inclusion pour cette étude sont :

- Une grossesse non progressive qui a entraîné une cessation du développement et d'activité cardiaque (une fausse couche ou une mort fœtale) avant 22 semaines d'aménorrhée.
- Les patientes présentant une grossesse unique (un seul embryon).
- Le groupe témoin a été choisi de manière consécutive parmi une population de primipares Qui ont accouché durant cette période, tandis que les critères d'exclusion étaient :
- Les patientes souffrant d'une grossesse molaire, extra utérine ou une grossesse géminaire.
- Les patientes souffrant d'une hypertension chronique, de maladies du tractus urinaire, de diabète gestationnel ou non et d'un syndrome antiphospholipidique.

### I.1.2. Recueil des échantillons

#### I.1.2.1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été effectués au niveau de la veine du pli du coude à l'aide d'un matériel stérile. Pour chaque sujet, le sang a été recueilli dans deux tubes:

- Un tube sec, pour le dosage des vitamines (B9, B12), la Progestérone l'AFP, la  $\beta$ -HCG et l'uE3.

- Un tube hépariné, pour le dosage de quelques paramètres biochimiques (fer, calcium). Après centrifugation, le sérum et le plasma ont été séparé du culot dans des tubes secs et conserver à la température de -20°C.

- Un tube EDTA pour le dosage de l'homocystéine (Hcy) et l' FNS

Les vitamines (B9, B12), la progestérone et les marqueurs sériques (d'AFP, β-HCG, l'œstradiol) sont dosés dans le sang maternel et leur taux est exprimé en MoM (multiple de la médiane) pour chaque âge gestationnel. L'analyse de ces paramètres a été exprimé par le système d'immunoanalyse (Elecsys 2010 et **cobas e 6000**) (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne).

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Dosage des micronutriments et des marqueurs sériques

Les concentrations sériques de la vitamine B12, B9, l'AFP, β-HCG, l'œstradiol et la Progestérone ont été déterminées par électrochimiluminescence « ECLIA » sur des systèmes d'immunoanalyses.

Cependant, l'analyse de l'Homocystéine (Hcy) sanguin est basé sur un dosage enzymatique utilisant un cycle enzymatique permettant d'évaluer le produit de conversion de l'homocysteine (**Voir annexes**).

Le dosage des minéraux (fer et calcium) est réalisé par spectrophotométrie suite a la formation des complexes colorés quantifiables , dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration (**Voir annexes**).

### 1 .2.2. Calcul de l'indice de la masse corporelle (IMC)

En pratique, L'indice de masse corporelle (IMC), encore appelé indice de Quételet et ou indice de Corpulence, permet de définir le statut pondéral de tout adulte. Il s'agit du rapport entre le poids, exprimé en kilogrammes et la taille au carré, exprimée en mètres. L'IMC s'exprime en kg /m<sup>2</sup>. Il se calcule ainsi (**Ciangura et al., 2009**).

$$\text{IMC} = \frac{\text{poids (kg)}}{\text{taille (m)} \times \text{taille (m)}}$$

Cet indice permet de définir si la patiente est maigre, de poids normal, en surpoids, ou obèse, en tenant compte des différents degrés d'obésité.

**Tableau-6** : Interprétation des valeurs de l'IMC selon la classification de l'OMS

IMC	Interprétation
Moins de 16.5	Dénutrition
16.5 à 18.5	Maigre
18.5 à 25	Corpulence normale
25 à 30	Surpoids
30 à 35	Obésité modérée
35 à 40	Obésité sévère
Plus de 40	Obésité morbide ou massive

## II. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du test Student et le test Khi-deux. Les valeurs de  $p < 0,05$  étaient considérées comme statistiquement significatives, en utilisant SPSS Version 20-32bit et Graphpad prism 5.

### ❖ Calcul de la MoM (Multiple de la médiane)

L'utilisation des marqueurs sériques pour dépister une éventuelle anomalie de développement du fœtus, nécessite de connaître les valeurs moyennes des taux de ces substances dans le cas des grossesses normales servant de témoin et dans le cas d'échecs de grossesses, l'étude permettant d'établir les courbes de références est donc rétrospective et se place dans le cadre des études « cas-témoins » (**Parvin et al., 1991**).

Les marqueurs sériques suivent une courbe d'évolution physiologique. Les valeurs normales doivent donc être définies pour chaque semaine d'aménorrhée. Une unité différente est utilisée pour chaque marqueur. Ces données brutes sont, d'une part, difficiles à mémoriser et à interpréter et d'autre part, impossible à comparer entre elles et d'une étude à l'autre. Les transformer en multiple de la médiane pour chaque âge gestationnel (MoM) consiste à attribuer à chaque marqueur la valeur de 1 unité pour la valeur médiane à chaque âge gestationnel. Lorsque la valeur est inférieure à 0,5 MoM, elle est anormalement basse, lorsqu'elle est supérieure à 2,5 MoM, elle est anormalement élevée (**Geyl et al., 2014**).

Le multiple de la médiane (MoM) est une mesure de la distance entre un résultat de test individuel et la médiane. Il est couramment utilisé pour rapporter les résultats des tests de

dépistage médical, en particulier lorsque les résultats des tests individuels sont très variables (Nicholas 1976,1977). Le MoM a été initialement utilisé comme une méthode pour normaliser les données des laboratoires participants de marqueurs sériques afin que les résultats des tests individuels puissent être comparés. C'est la norme établie pour la déclaration des résultats du dépistage sérologique maternel (Parvin et al., 1991).

Un MoM pour un résultat de test pour une patiente peut être déterminé comme suit:

$$\text{MoM} = \text{résultat (patiente)} / \text{Médiane (Patiente de la population)}$$

➤ **Exemple**

Les tests d'alpha-fœtoprotéine (AFP) sont utilisés pour dépister une anomalie du tube neural (ATN) au cours du deuxième trimestre de la grossesse. Si le résultat médian de l'AFP à 16 semaines de gestation est de 30 ng / mL et que le résultat d'AFP d'une femme enceinte à cet âge gestationnel est de 60 ng / mL, donc son MoM est égal à  $60/30 = 2,0$ . En d'autres termes, son résultat AFP est 2 fois plus élevé que "normal" (Parvin et al., 1991).

# **Chapitre II**

## **Résultats et discussion**

## II. Profil épidémiologique de la population

### II.1. Répartition des femmes enceintes selon l'âge moyen

**Tableau—3:** Répartition des femmes enceintes au cours d'un avortement selon l'âge.

Age moyen (Moyenne $\pm$ SD)	
Cas	témoin
31,96 $\pm$ 7,15 an	27,50 $\pm$ 4,91 an
<b>P= 0,002</b>	

D'après notre étude, l'âge moyen pour les femmes ayant un échec de grossesse est de (31,96  $\pm$  7,15 an), alors que celui des femmes enceintes avec une grossesse normale est de (27,50  $\pm$  4,91 an), avec une différence très significative (**P=0,002**).

Nos résultats montrent que l'âge maternel avancé influence sur l'issue défavorable de la grossesse et les risques accrus de pertes fœtales, ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Cleary Goldman et al., (2005)** qui ont montré que plus l'âge des femmes enceintes est élevé il est susceptible de présenter plus de risque pour le nouveau né.

D'après l'étude de **Risch et al., (1986)** 11,7 % des taux de fausses couches se situent entre 30 et 34 ans. Cette dernière a été confirmée par les résultats obtenus en procréations médicalement assistées où entre 30 et 35 ans, le taux de fausses couches est de 16,4% (**Belaisch-Allart, 2004**).

L'étude de **Rozenbaum (2003)** a mis en évidence un arrêt très précoce des grossesses de 92 % des cas à 38 ans contre 48 % à 18 ans. Ce risque est multiplié par 2 ou 3 par l'étude de (**Cleary-Goldman et al., 2005; Laufer et al., 2004**). Ainsi que **Miletic et al., (2002)** notent que 20 % d'avortements spontanés sont à l'âge de 40 ans et plus.

L'âge maternel à la conception est un facteur de risque de perte fœtale important et indépendant; la chance de mener à bien une grossesse après 40 ans est faible (**Nybo Andersen, 2000**). En péri-ménopause, le taux de la FSH s'élève au début du cycle avec une élévation du taux d'œstradiol (**Scott et Hofmann, 1995**). Dès ce stade, la qualité ovocytaire est altérée et le taux de réussite des traitements s'abaisse (**Buyalos et al., 1997**). Il existe à partir de 35 ans une dégénérescence accrue des ovocytes avec altération chromosomique

(Lim et Tsakok, 1997) et une diminution de la fonction utérine et hormonale (Cano *et al.*, 1995).

Des études récentes ont montré un devenir fœtal plutôt favorable mais soulignent l'augmentation des complications avec l'âge maternel (Luke et Brown, 2007 ; Joseph *et al.*., 2005 ; Jacobson *et al.*, 2004). Mais si globalement le pronostic fœtal est bon pour les enfants des mères âgées, la majorité des études s'accordent à reconnaître une augmentation de la prématurité et des enfants de petit poids de naissance et surtout une augmentation de la mortalité in utero et périnatale (Belaisch-Allart, 2008).

La notion de gestante âgée varie avec les années et les pays. Les femmes de 35 ans et plus étaient initialement considérées comme des gestantes âgées ; puis, avec le recul de l'âge de la maternité, ce terme de femmes enceintes âgées s'est adressé aux femmes de 40 ans (Belaisch-Allart, 2008).

## II.2. Répartition des femmes enceintes en fonction de l'IMC avant et pendant la grossesse

A partir des données relatives du poids et de la taille des patientes l'IMC a été calculé avant et après la grossesse, les résultats sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau-04** : Répartition des femmes enceintes au cours d'avortement par l'IMC avant et après la grossesse (Moyenne±SD).

IMC avant la grossesse (kg/m <sup>2</sup> )		IMC Après la grossesse (kg/m <sup>2</sup> )	
Cas	témoin	Cas	témoin
25,14 ± 3,94	24,39 ± 3,79	25,69±4,32	25,16 ±3,79
<b>P=0,19</b>		<b>P=0,26</b>	

D'après l'analyse de nos données et par comparaison de l'IMC avant et après la grossesse entre les cas et les témoins, nous avons remarqué que les femmes en cours d'avortement ont pris un peu de poids par rapport aux témoins et leur IMC se situe dans la zone de surpoids [25-29] kg/m<sup>2</sup>, même avant la grossesse. Nos résultats concordent avec ceux de Bellver *et al.*, (2003) qui ont associé le surpoids chez la femme à une diminution de la

fertilité et une augmentation du risque d'avortement spontané précoce. Les mécanismes qui expliquent ces perturbations sont multifactorielles, complexes et imparfaitement comprises. L'obésité en particulier lorsqu'elle prédomine au niveau abdominal est associée à un déséquilibre des fonctions hormonales neuroendocrines et ovariennes induisant une hyperandrogénie relative et fonctionnelle, à l'origine de troubles du cycle menstruel par des aménorrhées, des cycles irréguliers et anovulatoires (**Pasquali et al., 2003**). L'insulinorésistance et l'hyperinsulinisme générés par l'obésité pourraient participer au moins en partie à ces déséquilibres hormonaux. Ce lien entre l'hyperandrogénie et l'obésité via l'hyperinsulinisme est particulièrement démontré en cas de syndrome des ovaires polykystiques (OPK), qui est classiquement associé à une hyperandrogénie et à une infertilité (**Gambineri et al., 2002**).

Les embryons préimplantatoires murins exposés à des conditions maternelles d'insulinorésistance présentent une diminution de la pénétration intracellulaire du glucose, par diminution de l'expression des récepteurs GLUT1 et une augmentation de l'apoptose (**Chi et al., 2000**). Après transfert chez des femelles de poids élevé, les grossesses obtenues sont associées à un risque accru de FCS et d'anomalies de développement (**Pinto et al., 2002 ; Wyman et al., 2007**).

D'après l'étude de **Fritz & Speroff (2011)**, les femmes en surpoids, présentent une phase lutéale courte (**Helm et al., 2009 ; Jain et al., 2007**), avec un cycle de l'endomètre perturbé, pouvant expliquer en partie le défaut d'implantation embryonnaire et la survenue de FCS (**Dessolle et al., 2009**). Au cours de 712 cycles de don d'ovocytes avec transfert d'embryons de bonne qualité, en l'absence de pathologie utérine ou auto-immune connue, **Bellver et al., 2003** retrouvent des taux de FCS augmentés lorsque l'IMC de la receveuse est supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>, par rapport aux femmes de poids normal (respectivement, 38,1 % et 13,3 %).

Notons qu'un IMC < 18 kg/ m<sup>2</sup> n'aurait aucun impact sur les issues de grossesses, suggérant que l'environnement endométrial ne serait altéré qu'en cas d'obésité. De plus, au cours de la grossesse, l'obésité viscérale abdominale est associée à une redistribution des acides gras non estérifiés avec une accumulation ectopique (foie, muscle, cœur) entraînant une lipotoxicité associée à un stress oxydant accru. Les conséquences sont une inhibition de l'invasion trophoblastique, une altération du développement placentaire et de la fonction endothéliale maternelle, avec un risque accru de FCS (**Jarvie et al., 2010**).

De cet effet, une diminution rapide et massive de l'IMC et un meilleur contrôle de l'hyperinsulinisme permettent par ailleurs de favoriser l'ovulation et d'augmenter la fertilité chez les patientes obèses et améliorer les échecs de grossesse (**Gambineri A *et al.*, 2002**).

### II.3. Répartition des femmes enceintes selon l'âge de grossesse

Les fréquences d'avortements des différentes patientes appartenant à diverses tranches d'âge sont calculées par rapport à l'âge gestationnel et les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous (tableau 5).

**Tableau-05:** La fréquence des avortements selon l'âge de grossesse

Age gestationnel (en SA)	Prévalence (%)	
	Malade	témoin
[5-12]	53,1%	55,3%
[13-23]	44,68%	62,1%

Nos résultats peuvent s'expliquer que l'âge gestationnel compris entre [5-12] SA était l'âge le plus rencontré concernant les avortements avec 53,1%, par rapport aux autres périodes de grossesse, dans lesquelles la fréquence des avortements a été un peu diminuée avec l'augmentation des semaines d'aménorrhée. Donc la majorité des avortements surviennent dans la période précoce de la grossesse par rapport aux périodes tardives.

Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Beucher (2009)** qui a montré qu'environ un tiers des fausses couches sont infra-cliniques et surviennent après seulement quelques jours d'implantation et représentent une fréquence de 87%, ainsi que, le taux d'avortements spontanés diminue avec le terme de la grossesse.

### II.4. Identification de la population selon les antécédents

#### II.4.1. Antécédents gynéco-obstétriques

A partir des réponses obtenues, le nombre des grossesses ayant des antécédents gynéco-obstétriques (grossesse prématurée et fausse couche) ainsi que le nombre de grossesse à terme ont été calculé et reporté par rapport au diverses tranches d'âges (Tableau-6).

**Tableau-06** : Répartition des femmes enceintes en cours d'avortement selon les antécédents gynéco-obstétriques (Moyenne±SD).

Tranches d'âge	Nombre de grossesse à terme	Nombre de Fausse couche	Nombre de grossesse prématuré
[19-25]	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00±0,00
[26-32]	0,97±0,17	1,16 ± 0,08	0,09±0,05
[33-39]	1,48±0,21	1,25±0,22	0,2±0,09
[40-46]	2,95±0,19	1,33 ± 0,29	0,1 ±0,06

L'analyse des résultats du tableau indique que le nombre des fausses couches considérées comme antécédents est proportionnel avec l'augmentation de l'âge. Ce qui est représenté dans les deux dernières tranches d'âges [33-39] ans avec une moyenne de [1,25 ± 0,22] et dans la tranche et [40-46] ans avec [1,33 ± 0,29], donc plus d'antécédents de fausses couches, le risque d'avortement serait augmenté. C'est la notion des fausses couches à répétition.

D'après **Knudsen (1991)**, le risque d'avortement en fonction du nombre d'antécédents est de (0) pour 11%, 16% pour une fausse couche, 25% pour 2 fausses couches, 45% pour 3 fausses couches et de 54% pour 4 fausses couches.

L'augmentation du risque d'avortement avec le nombre d'antécédents précédents est également un argument de la réalité du syndrome d'avortements à répétition. Ainsi que, **Alberman, 1988** a montré qu'après 1, 2 et 3 avortements spontanés, le risque d'un nouvel avortement est respectivement de 16 %, 36 % et 60 %.

## II.5. Détermination des taux de Micronutriments

### II.5. 1. Variation des taux de l'Acide folique

L'acide folique est un micronutriment essentiel à la synthèse des nucléotides. Cependant, pendant la grossesse, les femmes ont besoin d'une plus grande quantité de folates afin de soutenir l'augmentation du volume sanguin, l'extraordinaire multiplication cellulaire de l'embryon, la croissance des tissus maternels et plus globalement, la croissance fœtale. Ils

interviennent dans le métabolisme neurocérébral et dans la synthèse des neuromédiateurs (Perrin et Simon, 2002).

Un déficit en folates induit une altération de la synthèse de l'ADN, une accumulation potentiellement toxique de l'homocystéine et une perturbation des réactions de méthylation (Schlienger, 2011). Cette carence est à l'origine d'un ralentissement des mitoses avec, entre autres, une atteinte des lignées cellulaires sanguines induisant une anémie macrocytaire, une leucopénie et une thrombopénie (Schlienger, 2011).

Afin de détecter l'influence de ce paramètre sur l'issue de la grossesse chez les femmes enceintes de notre population, la variation du taux de l'acide folique a été reporté au cours du premier et du deuxième trimestre (Tableaux 7).

**Tableau 7 :** Variation du taux de l'Acide folique chez les femmes enceintes (Moyenne± SD).

	1 <sup>er</sup> trimestre		2 <sup>ème</sup> trimestre	
	Cas	témoin	Cas	témoin
Acide folique (nmol/l)	24,44± 11,42	28,28± 0,42	29,23± 10,976	31,88 ± 5,38
Valeur de P	0,990		0,993	

D'après nos résultats, la concentration moyenne de l'acide folique semble diminuer entre les cas et les témoins au cours du premier et du deuxième trimestre mais d'une façon non significative.

Ces données ressemblent à celles de Hoffman *et al.*, (2008) qui ont rapporté que le taux de folate sérique dans les cas était inférieur à celui des témoins, mais la comparaison n'était pas significative et ils ont conclu que, dans les grossesses compliquées qui se terminent par un avortement au cours du premier et du deuxième trimestre, les faibles niveaux de folate ne semblent pas être associés à un risque accru d'avortements et de résultats négatifs ; malgré son rôle extrêmement important pour le développement du fœtus, il est considéré comme un cofacteur essentiel dans la biosynthèse des nucléotides et dans la métabolisation de l'homocystéine en méthionine, cette dernière est utilisée dans la méthylation de l'ADN, des protéines et des lipides. L'interférence avec la synthèse de l'ADN conduit à des divisions cellulaires anormales. Les cellules qui se divisent rapidement, comme dans le système hématopoïétique, sont les plus vulnérables aux irrégularités de la production d'ADN (Scholl et Johnson, 2000).

Plusieurs études ont montré que la carence en acide folique augmente les concentrations en homocystéine (**Wouters et al., 1993, Nelen et al., 1998**). Les femmes avec des avortements à répétition ont une plus forte prévalence d'hyperhomocystéinémie en comparaison avec les groupes contrôles. Ainsi que, la supplémentation par l'acide folique en période périconceptionnelle réduisent de façon significative les concentrations en homocystéine et donc les malformations dont plusieurs conduisent à des avortements (**Lumley et al., 2001**).

#### II.2.2.2. 2. Variation du taux de la Vitamine B12

La variation du taux de la Vitamine B12 chez les femmes enceintes durant le premier et le deuxième trimestre, leurs significations ainsi que leur intervalle de confiance à 95% sont regroupées dans le (tableau 08) :

**Tableau 08** Variation du taux de la vitamine B12 chez les femmes enceintes (**Moyenne± SD**)

	1 <sup>er</sup> trimestre		2 <sup>ème</sup> trimestre	
	Cas	témoin	Cas	témoin
<b>Vitamine B12 pmol/l</b>	174,49± 83,50	176,94 ± 65,65	138,12± 55,12	141,43 ± 51,75
<b>Valeur de P</b>	0.997		0.987	

Nos résultats montrent une diminution non significative du taux de la cobalamine (B12) chez les femmes en période d'avortement par rapport aux témoins, ces résultats concordent avec ceux de (**Jacotot et Campillo, 2003**) qui ont associé les déficits en cobalamines chez la femme enceinte à des naissances prématurées qui pouvant même conduire à un décès intra-utérin (**Jacotot et Campillo, 2003**).

La vitamine B12 participe au métabolisme de l'homocystéine, puisqu'elle est l'un des co-facteurs de la MTHFR et intervient dans la synthèse de la méthionine. Son rôle métabolique est étroitement lié à celui de l'acide folique car l'une des enzymes dépendant de la vitamine B12 (la méthionine synthétase) est indispensable au fonctionnement du cycle de la méthylation. La carence en cette vitamine peut donc influencer défavorablement sur l'utilisation des folates puisqu'elle permet la pénétration de ce dernier dans les hématies, alors des hémorragies placentaires peuvent être observées comme elle peut entraîner une détérioration neurologique, une anémie mégalo-blastique et des taux élevés d'homocystéine dans le plasma.

Plusieurs études ont montré qu'une carence en vitamine B12 était associée à une augmentation du risque d'anomalie du tube neural (ATN) (**Mobasheri et al., 2010**).

### II.2.2.2. 3. Variation du taux de l'Hcy

Les valeurs de la variation du taux de la Hcy chez les patients pendant le premier et le deuxième trimestre et leurs significations sont présentées dans le tableau (09).

**Tableau 09 :** Variation du taux de l'Hcy chez les femmes enceintes (**Moyenne± SD**).

	1 <sup>er</sup> trimestre		2 <sup>ème</sup> trimestre	
	Cas	témoin	Cas	témoin
<b>Hcy (µmol/l)</b>	8,58± 0,79	8,40 ± 0,76	9,54 ± 0,85	9,47 ± 1,49
<b>Valeur de P</b>	0,886		0,976	

D'après nos résultats la concentration moyenne de l'Hcy semble un peu élevée entre les cas et les témoins au cours du premier et du deuxième trimestre mais d'une manière non significative.

Ces résultats concordent avec ceux de (**Savage et al., 1994**) ; qui ont montré que les vitamines du groupe B agissent comme des cofacteurs dans la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine. Leur déficit induit une hyperhomocystéinémie *responsable* du stress oxydant. Ainsi, l'hyperhomocystéinémie a été associée à une embryotoxicité (**Quere et al., 2001**) et à une toxicité vasculaire avec infarctus placentaire (**Stegers-Theunissen et al., 1992**), ces deux phénomènes pouvant être à l'origine d'une pré-éclampsie et a des FCS. Une diminution significative des taux d'acide folique et une augmentation des taux d'homocystéine ont été observés chez des femmes ayant fait plus de quatre FCS (**Sikora et al., 2007**).

L'hyperhomocystéinémie se traduit génétiquement par un déficit en une enzyme du métabolisme de la méthionine (Cystathionine b synthétase (CbS) ou en méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), soit elle doit être acquise par le déficit en cofacteur indispensable au métabolisme de la méthionine (vitamines B6, B12 et l'acide folique).

D'après l'étude de **Wouters et al., 1993** ; l'hyperhomocystéinémie est observée avec une fréquence accrue 4 fois plus fréquemment que dans la population témoin, chez les femmes ayant présenté au moins deux (AS) inexplicables précoces avant la 16e SA. La mutation C677T du gène de la MTHFR à l'état homozygote était retrouvée associée à un risque accru 2 à 3 fois plus chez les femmes présentant des avortements spontanés (AS)

précoces (Nelen *et al.*, 2000), ainsi, ces résultats n'ont pas été confirmés dans l'étude réalisée par Holmes *et al.*, 1999. Toutefois, l'étude génotypique est probablement trop limitée et les conséquences de cette mutation sur le métabolisme de la méthionine devraient prendre en compte le statut vitaminique des patientes et en particulier, l'acide folique. Un déficit en folates diminue le nombre des groupements méthyles disponibles, indispensables à la pérennité de la méthylation et au processus de méthylation qui pourrait être impliqué dans la survenue de FCS par anomalies de méthylation de gènes impliqué dans le développement fœtal précoce (Castro *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2007).

En effet, Quere *et al.*, 2001 ont montré que, le traitement des femmes présentant 3 ou 4 (AS) dans leurs antécédents avec une hyperhomocystéinémie par 15 mg/j d'acide folique pendant 1 mois, entraîne une diminution significative (> 90 %) du risque d'AS du 1er trimestre de la grossesse.

De cet effet, les hyperhomocystéinémies maternelles, quelque soit leur étiologie, constituent un facteur de risque pour les fausses-couches précoces à répétition (Nelen *et al.*, 2000 ; Del *et al.*, 2004 ; D'Uva *et al.*, 2007 ; Dodds *et al.*, 2008).

### II.2.2.2. 3. Variation du taux de Fer

Les résultats des variations des taux de fer des cas et des témoins présentés dans le tableau (10).

**Tableau-10.** Variation du taux de Fer chez les femmes enceintes (**Moyenne ± SD**).

	1 <sup>er</sup> trimestre		2 <sup>ème</sup> trimestre	
	Cas	témoin	Cas	Témoin
<b>Fer (mg/L)</b>	1,60 ± 0,1 1	1,62 ± 0,22	1,16 ± 0,781	1,22 ± 0,10
<b>Valeur de P</b>	0,939		0,781	

D'après nos résultats, les valeurs moyennes du fer aux cours du premier et du deuxième trimestre sont inférieures à celles du groupe contrôle, mais de manière non significative ( $P \geq 0,05$ ).

Nos résultats concordent avec ceux menés par Bitam et Belkadi, 2008 ; qui ont trouvé une légère carence martiale chez les femmes enceintes est de 10 % au cours du premier trimestre et ceux rapporté par Abessolo *et al.*, 2011 ; qui ont montré que 14,7 % des

femmes Gabonaises enceintes sont carencées en fer où l'alimentation est beaucoup plus variée, alors que l'alimentation dans notre population est déséquilibrée avec une consommation faible des produits d'origine animale (viande, poisson, œufs,...).

Par contre **Malek-Mellouli et al., 2013** ont confirmé dans une étude réalisée sur 86 femmes regroupée en 56 femmes enceintes et 30 femmes non enceintes une diminution significative du fer sérique du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. Le fer a un rôle capital dans l'organisme de la mère et du fœtus, c'est un élément constitutif de l'hémoglobine et de la myoglobine et il participe dans de nombreuses réactions enzymatiques et métaboliques (**Harvey, 2011**).

En effet, ces déficits en fer au cours de la grossesse peuvent être expliqués par l'élévation des besoins au cours de la grossesse. D'après **Butte et King., 2005**, environ 1000 mg de fer est nécessaire pour couvrir les besoins de la femme enceinte à cause de l'élévation de la masse érythrocytaire, la croissance fœtale, le fonctionnement placentaire et les pertes métaboliques et physiologiques (**Milman, 2006**).

Les besoins en fer augmentent au fur et à mesure dans cette situation passant d'environ de 1 mg par jour au premier trimestre à 8 mg par jour au troisième trimestre (**Bothwell, 2000**). Malgré que, les apports alimentaires ne sont pas habituellement suffisants pour compenser ces pertes, puisque le transfert actif du fer de la mère vers le fœtus se poursuit, même en cas de la carence maternelle (**Theresa et al., 2000**).

La multiparité est un autre facteur qui provoque des déplétions successives des réserves en fer, sans reconstitution intermédiaire satisfaisante (**Diallo et al., 1999**). Les besoins élevés en fer durant la gestation pour faire face à l'expansion des tissus maternofoetaux (masse sanguine maternelle et unité foetoplacentaire) augmentent le risque de déficit dans cette population (**Favier et Hininger-Favier, 2004**). Une alimentation correctement équilibrée devrait, au cours d'une grossesse normale chez une femme non carencée au départ, pouvoir faire face aux besoins (**Hininger -Favier et Hercberg, 2005**).

Après analyse de nos données, le taux du fer sérique chez les femmes enceintes était légèrement bas que chez celles du groupe contrôle et cela peut être du à la prise des suppléments.

### II.2.2. Variation du taux de calcium

Le calcium est parmi les minéraux qui peuvent jouer un rôle primordial dans la croissance fœtale, il intervient dans la formation des os du squelette et les dents du fœtus. Cependant un apport insuffisant en calcium peut entraîner le développement d'une pré-éclampsie et accroître le risque de prématurité et de fausse couche (**Bergel et Belizan, 2002**). Les résultats des variations des taux du calcium des cas et des témoins présentés dans le tableau (11).

**Tableau 11** Variation du taux de calcium chez les femmes enceintes (**Moyenne ± SD**).

	1 <sup>er</sup> trimestre		2 <sup>ème</sup> trimestre	
	Cas	témoin	Cas	témoin
<b>Calcium (mg/L)</b>	10,04 ± 0,58	10,71 ± 0,10	9,96 ± 0,781	10,29 ± 0,1 3
<b>Valeur de P</b>	0,07		0,33	

D'après nos résultats, la concentration moyenne du calcium est légèrement diminuée entre les cas et les témoins au cours du premier et du deuxième trimestre.

Au cours de la grossesse, toutes les régulations sont en place pour permettre le transfert du calcium au fœtus et l'adaptation du métabolisme phosphocalcique maternel (**Gompel et al., 1993**). Les besoins fœtaux augmentent progressivement et le fœtus reçoit tout au long de la grossesse jusqu'à 30 g de calcium, les deux tiers étant acquis au cours du dernier trimestre de la gestation (**Salle, 1995**).

Après analyse de nos résultats, une légère carence calcique était retrouvée chez les femmes, en cours d'avortement par rapport aux femmes enceintes avec une grossesse normale. On peut expliquer ces résultats par la pauvreté de l'alimentation en produits riches en calcium surtout. Au cours de la grossesse, un apport calcique satisfaisant est nécessaire pour conserver l'homéostasie maternelle et la croissance fœtale et placentaire (**Fournié et al., 1999**). Les besoins en calcium de la femme enceinte sont majorés afin de permettre la formation du squelette fœtal. Pour assurer au fœtus des apports calciques suffisants, différents mécanismes sont mis en œuvre : la synthèse de 1-25-hydroxy-vitamine D par le placenta, conduisant à une augmentation de l'absorption intestinale de calcium et à une mobilisation du calcium osseux maternel (**Genin et al., 2011**).

Le calcium intervient dans la contraction musculaire. En effet, de faibles apports calciques pourraient stimuler les hormones parathyroïdiennes et la libération de la rénine, aboutissant à une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires et donc à une vasoconstriction (**Hofmeyr et al., 2010**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le calcium prévient probablement l'hypertension artérielle et ses complications pendant la grossesse (**Pena-Rosas et Casanueva, 2006**). Si les besoins maternels ne sont pas satisfaits, une résorption du tissu osseux maternel entame le capital (**Perrin et Simon, 2002**).

Selon l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (Inpes) (**2007**) : Un apport insuffisant en calcium peut entraîner le développement d'une pré-éclampsie (hypertension provoquée par la grossesse) et accroître le risque de prématurité ou de fausse couche. En cas d'apport insuffisant, le bébé utilisera les réserves maternelles, ce qui peut entraîner un risque de décalcification chez la femme enceinte ». Il a été récemment suggéré que l'hypertension induite par la grossesse pourrait résulter d'une anomalie d'implantation (**Cheng, Wang, 2009**).

### II.2.2. Détermination des taux de marqueurs sériques

Plusieurs études ont suggéré que les fluctuations des marqueurs sériques, pourraient affecter le développement du fœtus et l'issue de la grossesse (**Mobasheri et al., 2010**). Pour cette raison le dosage des marqueurs sériques (AFP,  $\beta$ -HCG, uE3) a été effectué aux cours des deux premiers trimestres pour les deux groupes de patientes (cas et témoins).

#### II.2.2. 1. Variation du taux d'AFP sérique

L'alpha-fœto-protéine est une glycoprotéine synthétisée par les cellules du foie fœtal et le tractus gastro-intestinal fœtal. Le fœtus l'élimine par ses urines dans le liquide amniotique, d'où elle passe dans le sang maternel. Elle est exprimée très tôt, atteint un pic de concentration vers 14SA, puis diminue progressivement au cours de la grossesse et son expression s'éteint quelques jours après la naissance (**Brock et al., 1972**).

Les moyennes des taux de l'AFP sérique dosés chez les femmes enceintes au cours du premier et du deuxième trimestre sont représentées dans le tableau (12).

**Tableau-12** Variation du taux d'AFP sérique chez les femmes enceintes (Moyenne± SD).

	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>ème</sup> trimestre
AFP (MoM)	0,76 ± 0,43	2,82 ± 3,29
Valeur de P	0,001	0,001

Le niveau sérique d'alpha-fœtoprotéine au cours du premier et du 2<sup>ème</sup> trimestre était de (0,76 ± 0,43) vs (2,82 ± 3,29) MoM, respectivement (P <0,05). La concentration moyenne d'alpha-fœtoprotéine est significativement faible au cours du 1<sup>er</sup> trimestre par contre elle est très élevée au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre entre les cas et les témoins.

D'après nos résultats un faible taux d'AFP sérique est remarqué chez les patientes présentant un avortement au cours du premier trimestre, ce qui concorde avec plusieurs chercheurs (Muller *et al.*, 2003 ; Cuckle, 2000) qui ont corrélé les faibles niveaux d'AFP avec les avortements spontanés et la présence d'anomalies chromosomiques (aneuploïdes) telles que les trisomies et surtout en cas d'association à un faible niveau d'HCG (Cuckle H, 2000).

Par contre au cours du deuxième trimestre on a remarqué une augmentation significative d'AFP chez les femmes affectées par rapport aux témoins ce qui est en accord avec les résultats de Duric *et al.*, 2003 ou ils ont associé les concentrations d'AFP maternelles anormalement élevées à la perte fœtale, la mort périnatale, les décès néonatal, l'hydrocéphalie, les hernies diaphragmatiques, le syndrome de Turner, le kyste du plexus choroïde et les anomalies de fermeture du tube neural fœtal.

Cependant, des élévations modérées supérieures à la grossesse normale ont été observées chez les femmes atteintes d'un dysfonctionnement fœtoplacentaire grave en association avec la β-HCG. En revanche, Plusieurs études (Milunsky A *et al.*, 1989) ont associé l'augmentation significative inexplicée de l'AFP au risque de la pré-éclampsie (Wenstrom *et al.*, 1994 ; Leung *et al.*, 2000), du retard de croissance intra-utérin (RCIU), d'hématome rétro-placentaire avec des lésions histologiques de type thrombotique et inflammatoire des vaisseaux placentaires, à l'oligo-hydramnios, au décollement placentaire et de mort in utero (MIU) (Brock *et al.*, 1982; Purdie *et al.*, 1983; Walters *et al.*, 1985; Katz *et al.*, 1984; Salafia *et al.*, 1995 ; Williams *et al.*, 1992 ; Yaron *et al.*, 1999; Maher *et al.*, 1994), ceci conduit à une atteinte placentaire qui pourrait permettre une diffusion plus rapide

de l'AFP du compartiment foetoplacentaire au maternel résultant en une élévation de l'AFP sérique maternelle. Cette hypothèse est soutenue par les résultats d'autres études (**Yaron et al., 1999 ; Cusick et al., 1996**).

Ainsi, le mécanisme exact de l'élévation de l'AFP est mal connu. Il pourrait en effet s'agir d'une fuite transplacentaire de l'AFP de la circulation fœtale qui pourrait être due à son tour aux défauts de la structure placentaire par déficience de la barrière endothéliale augmentant l'aire de diffusion de cette hormone. L'AFP augmentée peut aussi provenir du fœtus en souffrance chronique à cause d'un décollement placentaire (**Purdie et al., 1983**), ou d'une ischémie placentaire due à des thrombi intervillositaires (**Salafia et al., 1995**) qui engendreraient une souffrance fœtale, qui pourrait expliquer l'augmentation de l'AFP sérique maternel.

En effet, le dosage de l'alpha-foetoprotéine sérique maternelle (AFP) au cours du premier et du deuxième trimestre de la grossesse est très intéressant pour le dépistage des aneuploïdies, des anomalies du tube neural et pour l'issue défavorable de la grossesse, y compris la mort fœtale, la prééclampsie (PE), la restriction de la croissance fœtale et l'accouchement prématuré.

### II.2.2. 2. Variation du taux de $\beta$ -HCG

L'hormone chorionique gonadotrophique (HCG) est une glycoprotéine formée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , sécrétées dès la fécondation. Cette hormone est sécrétée par le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste, mais la grande majorité est produite grâce aux citernes que forment les réticulums endoplasmiques du syncytiotrophoblaste.

La sécrétion d'HCG débute avant la nidation. Les récepteurs de l'HCG sont présents dans le trophoblaste dans l'endomètre. Elle devient détectable entre le 7<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour après la fécondation. La sous-unité  $\alpha$  devient détectable dans la circulation maternelle entre la 6<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse.

L'HCG double sa valeur en 1,4 à 2,1 jours. Dès le retard des règles, sa concentration sanguine maternelle atteint 100 UI/L et son taux augmente jusqu'à la 8<sup>ème</sup> -10<sup>ème</sup> semaine, pour atteindre 100000 UI/L, puis baisse jusqu'à la 18<sup>ème</sup> -20<sup>ème</sup> semaine, pour se maintenir en plateau aux environs de 10000-20000 UI/L jusqu'à l'accouchement.

La bêta-hCG libre est un marqueur sérique du premier trimestre décrit par **Macri *et al.*, 1990**. Plusieurs études (**Ranta J.K *et al.*, 2011** ; **Odibo *et al.*, 2011** ; **Hourrier *et al.*, 2010**, **Kirkegaard *et al.*, 2011**) ont montré une augmentation significative de complications fœtales et maternelles tels que la prématurité, le RCIU et le risque de pré-éclampsie en cas de valeur <0,5MoM.

Pour ces raisons les taux de la  $\beta$ -HCG sérique a été dosée chez toutes les femmes enceintes constituant la population d'étude au cour du premier et du deuxième trimestre et les variations ainsi que leur signification sont montrées dans le tableaux 13.

**Tableau-13** Variation du taux de  $\beta$ -HCG sérique chez les femmes enceintes (**Moyenne $\pm$  SD**).

	<b>1<sup>er</sup> trimestre</b>	<b>2<sup>ème</sup> trimestre</b>
<b><math>\beta</math>-HCG (MoM)</b>	0,048 $\pm$ 0,071	0,18 $\pm$ 0,22
<b>Valeur de P</b>	0,001	0,23

Les valeurs médianes de  $\beta$ -HCG aux cours du premier et du deuxième trimestre sont respectivement :  $\beta$ -HCG (0,048  $\pm$  0,07 MoM) et (0,18  $\pm$  0,22 MoM), (**P<0.05**).

Nos résultats ont montré qu'au cours du premier et du deuxième trimestre, un taux faible de la  $\beta$ -HCG est remarqué chez les patientes en cours d'avortement, ces résultats sont on accord avec les travaux de **Dugoff *et al.*, 2004** et **Rissanen, 2006**, qui ont signalé aussi un faible taux de  $\beta$ -HCG associé à une incidence accrue de fausse couche spontanée et que les taux extrêmement faibles ont été associés à une augmentation du risque de perte de grossesse avant 24 semaines.

Les mêmes résultats sont obtenus par **Yaron *et al.*, 2011** qui ont trouvé dans leur étude un seul résultat statistiquement significatif lié a une augmentation du risque de fausse couche spontanée chez les patientes présentant une faible concentration de  $\beta$ -HCG libre.

La  $\beta$ -HCG libre est sécrétée par le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste et est un marqueur de la différenciation cytotrophoblastique; elle maintient le début de la grossesse ; sa production est stimulée par différentes molécules dont les facteurs de croissance et les cytokines. Sachant que les placentas des patientes en cours d'avortement présentent des troubles de la différenciation cellulaire avec une invasion déficiente et un plus petit poids, une altération dans la quantité totale de l'hCG semble être logique.

Selon **Gordon et al., 2002** le dysfonctionnement placentaire qui résulte d'un défaut d'angiogénèse induit une perturbation de sécrétion de la  $\beta$ -HCG, cette dernière joue un rôle principal dans la stimulation de la stéroïdogénèse maternelle et fœtale et le maintien du corps jaune ce qui assure une bonne évolution de la grossesse jusqu'à la septième semaine.

### II.2.2.3. Variation du taux d'œstriol (uE3)

L'œstriol est une hormone stéroïde synthétisée par l'unité fœto-placentaire et son origine est strictement fœtale. Elle provient du cholestérol fœtal, L'œstriol est donc un très bon reflet de l'activité stéroïdogène des surrénales fœtales (**Weissgerber Tl et al., 2006**).

Le dosage de l'œstriol constitue une aide au diagnostic d'atteinte de l'axe corticotrope des anomalies échographiques :

Selon **Marcos et al. (2009)**, l'élévation de l'œstriol, indique l'absence des anomalies fœto-placentaires alors que si le taux de l'œstriol est effondré ( $<0,2\text{MoM}$ ) une trisomie 18 peut s'associer surtout si des taux faibles en hCG et AFP ont été détecté, mais aussi une pathologie fœtale comme le déficit en sulfatase placentaire, un hypopituitarisme congénital ou un déficit isolé en ACTH peuvent être associés. Pour ces raisons, les variations des taux d'œstriol sérique chez les femmes enceintes au cours du premier et du deuxième trimestre ont été calculées et les résultats sont exprimés dans le tableau (14).

**Tableau-14** Variation du taux d'uE3 sérique chez les femmes enceintes (**Moyenne  $\pm$  SD**).

	<b>1<sup>er</sup> trimestre</b>	<b>2<sup>ème</sup> trimestre</b>
<b>uE3 (MoM)</b>	0,095 $\pm$ 0,08	0,037 $\pm$ 0,05
<b>Valeur de P</b>	0,001	0,092

Les valeurs médianes d'uE3 aux cours du premier et du deuxième trimestre sont respectivement (0,095  $\pm$  0,08MoM **P**  $<0,05$  et 0,037  $\pm$  0,05MoM).

D'après les résultats obtenus, la diminution significative du taux signalé dans notre étude au cours du premier trimestre est en concordance avec les données de **Bick et al., 1999**, qui ont corrélé la diminution d'uE3 à des anomalies chromosomiques et structurelles fœtales (anencéphalie) et au décès fœtal. Dans la plupart de ces pathologies, le taux d'estriol est signalé comme étant indétectable ou ( $< 0,2 \text{ MoM}$ ).

Les mêmes résultats sont confirmés par **Leporrier, 2009** qui ont signalé que si le taux d'œstriol est effondré ( $<0,2\text{MoM}$ ), il faut évoquer une mort in utero, une trisomie 18 et d'autant plus s'il est associé à une valeur effondrée d'hCG et d'AFP, mais aussi à une pathologie fœtale comme le déficit en sulfatase placentaire (**Craig, 2010**).

D'après **Craig, 1999** et **Glass, 1989**, le taux d'œstriol reflète l'activité stéroïdogène fœtale et son taux très faible peut révéler une hypoplasie congénitale des surrénales, une atteinte de l'axe corticotrope, ou un syndrome malformatif lié à un bloc de synthèse du cholestérol comme le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (**Irons., 1999**). De cet effet, et en cas de faible taux d'œstriol, une échographie morphologique à la recherche de malformations fœtales, ainsi qu'un conseil génétique peut être réalisé. Par contre, en cas d'élévation de l'œstriol, il n'existe pas d'anomalies fœto-placentaires décrites (**Gagnon., 2008**).

#### II.2.2. 4. Variation du taux de la progestérone

Le rôle des hormones stéroïdiennes comme la progestérone dans la prévention des avortements, la perte de grossesse récurrente et le travail prématuré ont été largement étudiées. Le rôle de la supplémentation en progestérone dans la procréation assistée a été aussi analysé. Le taux de la progestérone chez les femmes enceintes constituant la population d'étude a été calculée au cours du premier et du deuxième trimestre et les résultats sont exprimés dans le tableau (15).

**Tableau 15** Variation du taux de la progestérone chez les femmes enceintes (**Moyenne  $\pm$  SD**)

	<b>1<sup>er</sup> trimestre</b>	<b>2<sup>ème</sup> trimestre</b>
<b>Progestérone (MoM)</b>	[0,21 $\pm$ 0,15]	[0,17 $\pm$ 0,16]
<b>Valeur de P</b>	0,001	0,001

Les valeurs moyenne des médianes de la progestérone aux cours du premier et du deuxième trimestre sont respectivement (0,21  $\pm$  0,15MoM) et (0,17  $\pm$  0,16 MoM), **P <0,05**).

Nos résultats montrent des taux anormalement bas de la progestérone sérique chez les patientes en voie d'avortement aux cours des deux trimestres ce qui est en accord avec les données de **Weissgerber (2006)** et **Wright (1980)**, qui ont montré une diminution très nette de la progestérone à l'entrée en travail.

De plus, l'administration de progestérone exogène ne prolonge pas la durée de gestation ce qui nous explique le déclenchement précoce du travail qui résulte d'un avortement, Donc, la progestérone constitue un bon marqueur de diagnostic des grossesses non viables comme c'est une hormone qui participe dans le maintien du calme utérin puisqu'elle intervient dans la sécrétion d'un certain nombre de facteurs ou enzymes impliqués dans l'implantation embryonnaire (Stephenson et al., 2002).

Par ailleurs, ce faible taux de progestérone peut expliquer que ces femmes enceintes souffrent d'une insuffisance lutéale qui se caractérise par une production insuffisante de cette hormone retentissant sur la qualité de l'endomètre et nuisant à l'implantation (Vinatier et al., 1998).

### II.2.3. Anémie et avortement

Selon les réponses des femmes constituant les groupes cas et témoin de la population d'étude en ce qui concerne le nombre d'avortements et les antécédents d'anémie ont été calculées et les résultats sont exprimés dans le tableau (16).

**Tableau-16** Nombre de femmes enceintes présentant une anémie

	Nombre de femmes enceintes présentant une anémie		Total
	NON	OUI	
Cas	48	21	69
Témoin	59	10	69
Total	107	31	138
P	0,02		

D'après les résultats que nous avons tirés à partir de cette étude la diminution du taux de fer s'accompagne d'une anémie chez les femmes en cours d'avortement avec une fréquence significative ( $P \leq 0,05$ ).

Donc l'anémie dans notre étude constitue un facteur de risque pour les échecs de grossesses et elle est l'une des pathologies les plus courantes en obstétrique et n'est que l'ultime expression d'une carence en fer qui en est la cause dans la plupart des cas.

La carence en fer est la plus importante de toutes les carences en micronutriments, elle touche plus de 2,15 milliards de personnes à travers le monde (Rey et al., 1995 ; Galan et al., 1998).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 51% des femmes enceintes des pays développés et pays en voie de développement confondus présentent une anémie. Il s'agit d'un trouble de gravité variable auquel sont exposées 10 à 30% des femmes enceintes dans les pays développés et 40 à 80% dans les pays en voie de développement. Aux Etats-Unis, selon le *National Health and Nutrition Examination Survey*, 5 à 10 % des femmes de 20 à 44 ans présentent une carence martiale. Il est admis que l'anémie est un facteur de risque significatif au regard de la morbidité maternelle et surtout fœtale, d'autant plus s'il s'agit d'une anémie préexistante à la grossesse. Les besoins en fer durant la grossesse sont significativement augmentés. Ces besoins augmentent surtout lors de la deuxième partie de la grossesse, en lien avec l'augmentation de la masse globulaire de la mère, des besoins du fœtus et du placenta et des pertes sanguines à l'accouchement. La réponse à ces besoins dépend de l'état des réserves avant la grossesse (**Rey et al.,1995 ; Galan et al., 1998**).

La grossesse entraîne de profondes modifications de l'hémogramme. En effet, il se manifeste une augmentation du volume plasmatique et ceci dès le 1<sup>er</sup> trimestre pour atteindre 30 à 50% en fin de grossesse. Néanmoins, l'augmentation de la masse plasmatique (150% du volume initiale) est supérieure à celle de la masse globulaire (120% du volume initiale) (**Fournié et al., 1999**).

Nos résultats concordent avec ceux menés par Scholl & Hediger (1994), aux Etats-Unis, selon une étude prospective dont 28% des femmes enceintes étaient anémiques, mais seulement 3,8% répondaient à la définition de l'anémie ferriprive, même si près de 10% avaient des réserves basses en fer (**Rey et Sachet, 1995; Galan et al., 1998**). Ces résultats sont également retrouvés dans l'étude de **Galan et al., 1998**. Mais cela ne concorde pas avec celui rapporté par **Abessolo et al. (2011)** qui a trouvé 33,9 % de microcytoses.

#### II.2.4. Diabète et avortement

Selon les réponses des femmes constituant les groupes cas et témoins de la population d'étude en ce qui concerne le nombre d'avortements et les antécédents du diabète ont été calculées et les résultats sont exprimés dans le tableau (17).

**Tableau 17**-Nombre des femmes enceintes diabétique.

	Nobre de femmes enceintes présentant un diabète		Total
	NON	OUI	
Cas	66	3	69
Temoin	67	2	69
Total	133	5	138
P	0,65		

D'après les résultats obtenus, le nombre des femmes enceintes diabétique en cours d'avortement est très faible (**P=0,65**). Donc le diabète dans notre étude n'est pas un facteur de risque pour les échecs de grossesses. Nos résultats sont ont accord avec l'étude de **Castorino et Jovanovič (2011)**, Portant sur 389 patientes diabétiques et 429 non diabétiques a évalué le taux de grossesses évolutives en fonction de la fructosaminémie et du taux d'hémoglobine glycosylée mesurés en début de grossesse et répartis en six intervalles. Ils n'ont pas montré de différence entre le taux global de FCS entre la population diabétique et non diabétique.

Par contre selon **Ivanisevic (2005)** et **Lucas (2001)**, le taux de FCS précoces est augmenté chez les femmes diabétiques insulino-dépendantes et plusieurs études ont montré une corrélation entre le taux d'hémoglobine glycosylée au premier trimestre de la grossesse et le taux de FCS. Le mécanisme physiopathologique évoqué est celui de malformations embryonnaires létales, car le taux de malformations est aussi augmenté en cas de mauvais équilibre du diabète dans la période périconceptionnelle (**Lucas et al., 1989**).

### II.2.5. Avortement et hypertension artérielle (HTA)

L'analyse de nos résultats concernant le nombre des femmes enceintes hypertendues en cours d'avortement est très élevée (**P=0,0001**). Donc l'hypertension artérielle (HTA) dans notre étude constitue un facteur de risque pour les échecs de grossesses (Tableau 18).

**Tableau 18** -Nombre des femmes enceintes hypertendues.

	Nobre de femmes enceintes présentant une HTA		Total
	NON	OUI	
Cas	26	43	69
Temoins	65	4	69
Total	91	47	138
P	0,0001		

Ces résultats indiquent une augmentation du nombre de femmes présentant des complications d'hypertension artérielle et qui influencent sur l'évolution normale de leur grossesse, ces données s'accordent avec ceux de Prysak, (1995) qui a montré un risque deux à trois fois plus élevé d'hypertension chez les femmes présentant des avortements, comparativement aux témoins.

Par ailleurs d'après **Krezesinski (1999)**, l'hypertension artérielle de la grossesse proprement gravidique accompagnée ou non de protéinurie est la complication médicale la plus fréquente aux cours de la grossesse touchant environ 10% des femmes et moins de 5% sous sa forme pré-éclampsique qui est devenu un facteur de morbidité et de mortalité fœtale.

De plus il existe une relation inverse entre la croissance fœtale et la pression artérielle maternelle tout au long de la grossesse. Le trouble des échanges fœto-maternels explique le retard de croissance intra-utérin, si ce trouble s'aggrave, les échanges gazeux peuvent être compromis, une hypoxie et une acidose fœtale vont apparaître ; avec des risques de lésions cérébrales (**Borzychowski et al., 2006**).

Ainsi, de nombreuses maladies de la grossesse dont la pré-éclampsie (HTA gravidique) sont dues à une déficience de la vascularisation placentaire, par un trouble de l'angiogénèse placentaire, soit par des facteurs de croissances, des marqueurs biologiques, du système immunitaire ou des facteurs génétiques.

L'hypertension gravidique peut être expliquée en physiopathologie d'abord par un défaut de la placentation puis, par une réaction maternelle généralisée touchant l'endothélium (**Van Wijk et al., 2000**). L'invasion des cellules trophoblastiques dans l'endomètre et dans le tiers proximal du myomètre et l'invasion des artères spiralées sont d'une importance vitale pour la fixation du placenta et la connexion avec le système vasculaire maternel.

Les études de **Matijevic et al., 1999**; **Meekins et al., 1994** ont montré que dans les HTA gravidiques, l'invasion trophoblastique est trop superficielle avec un défaut d'invasion des artères spiralées qui restent ainsi de petit calibre. Ce qui provoque une hypoxie placentaire durant toute la grossesse, cette réaction maternelle généralisée touchant l'endothélium de différents organes. Ainsi l'étude histologique des placentas chez ces patientes montre une prolifération trophoblastique mais une migration des cellules trophoblastique trop superficielle (**Redline et al., 1995**); l'invasion des artères spiralées du myomètre est fortement

réduite causant ainsi une réduction de l'apport sanguin dans l'espace intervilleux et exposant le fœtus à des conditions pauvres en nutriments et en oxygène.

D'après **Van Wijk *et al.*, 2000**, l'ischémie placentaire libère des facteurs placentaires toxiques dans la circulation sanguine maternelle qui altèrent le bon fonctionnement de l'endothélium et induit une réaction endothéliale maternelle généralisée.

Plusieurs études ont démontré que l'hypoxie perturbe l'expression d'isoformes de VEGF et la diminution des récepteurs au VEGF dans la pré-éclampsie (**Lyall *et al.*, 1997**).

**Kupferminc *et al.*, (1997)** ont mis en évidence des taux élevés de VEGF dans la circulation maternelle chez les patientes souffrant de pré-éclampsie, ainsi qu'une corrélation entre leur taux et la sévérité de la pré-éclampsie.

Par ailleurs, une prolifération trophoblastique sans invasion induit l'activation de certains gènes dont le TGF- $\beta$ 3 (un inhibiteur de l'invasion trophoblastique) est stimulé par un facteur de transcription (HIF- $\alpha$ ), cette molécule, contrairement aux grossesses d'évolution normale, est présente au delà du premier trimestre dans la pré-éclampsie (**Caniggia *et al.*, 1999 et 2000**). De plus l'HIF-1 $\alpha$  supprime l' $\alpha$ 1 $\beta$ 1 qui est une molécule d'adhésion nécessaire pour la migration trophoblastiques (**Goldman-Wohl *et al.*, 2002**).

Ce défaut de différenciation cellulaire permettant l'invasion nécessaire au premier trimestre induit des cellules trophoblastiques trop immatures. Ces cellules trophoblastiques immatures présentent à leur surface l'intégrine  $\alpha$ 5 et n'exprime pas l'intégrine  $\alpha$ 1 ; ainsi, elles n'acquièrent pas le phénotype nécessaire à l'adhésion endovasculaire (**Zhou *et al.*, 1997-b**) et leur prolifération est excessive (**Redline *et al.*, 1995**). Cette invasion trophoblastique trop superficielle altère également l'expression de certains gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, qui de ce fait sont déficients, comme par exemple l'expression de MMP-9 qui n'est pas stimulée dans la pré-éclampsie (**Lim *et al.*, 1998**). L'activité enzymatique de l'urokinase *plasminogen activator* et *plasminogen inhibitor* est aussi altérée dans la pré-éclampsie (**Graham *et al.*, 1996**).

Ces altérations placentaires prenant forme lors du 1er trimestre et qui posent le problème de la difficulté d'avoir accès, durant le développement de ces lésions aux cours de progression de la grossesse car le diagnostic étant posé dès la 20e SA et les placentas étant disponibles après l'accouchement.

Le dysfonctionnement endothélial mène à un déséquilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs et donc à l'hypertension. L'équilibre entre les mécanismes de coagulation et d'anti-coagulation du sang est aussi affecté par les changements quantitatifs des substances coagulantes et leurs inhibiteurs (**Ness *et al.*, 1996**).

### II.2.6. Avortement et infection

Selon les réponses des femmes constituant les groupes cas et témoin de la population d'étude en ce qui concerne le nombre d'avortements et les infections ont été calculées et les résultats sont exprimés dans le tableau (19).

**Tableau 19** -Nombre des femmes enceintes présentant une infection.

	Nobre de femmes enceintes présentant une infection		Total
	NON	OUI	
Cas	45	24	69
Temoins	47	22	69
Total	92	46	138
P	0,86		

D'après nos résultats, les femmes enceintes de l'étude présentent des infections mais pas de différence significative entre les cas et les témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux d'**Osser *et al.*, (1996)**, qui ont montré que divers agents infectieux peuvent induire des avortements sporadiques (*Herpes simplex* virus, virus de la rubéole, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma hominis*). Par ailleurs, plusieurs conditions doivent être remplies pour retenir la responsabilité d'un agent infectieux dans les avortements à répétition, soit la longue persistance; l'infestation peu symptomatique pour échapper au diagnostic et au traitement et avoir accès au fœtus soit pour infecter les tissus fœtaux, soit pour y entretenir une réponse inflammatoire. Peu d'agents infectieux répondent à ces exigences. L'intérêt s'est récemment déplacé vers les infections vaginales qui pourraient intervenir dans les avortements tardifs et les accouchements prématurés.

*Conclusion et  
perspectives*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La femme enceinte est exposée à des risques importants de complications qui peuvent affecter sa santé et celle de son nouveau-né. Nos résultats montrent que les femmes enceintes présentent des altérations métaboliques caractérisées par une variation des marqueurs nutritionnels (Micronutriments) et sériques comme l'acide folique, la vitamine B12, l'Homocystéine (Hcy), le fer, l'alphafoetoprotéine (AFP), la  $\beta$ -HCG, l'œstradiol et la progestérone. Ces altérations métaboliques durant la grossesse sont associées le plus souvent au développement d'un échec de grossesse qui peuvent être responsables d'importantes complications materno-fœtales (avortement, pré-éclampsie).

D'après notre étude, l'avortement est l'un des principales complications qui touche la femme au début de la grossesse et qui se traduit par une interruption et l'expulsion d'un embryon ou d'un fœtus avant 22 semaines d'aménorrhées.

Nos résultats montrent que les marqueurs sériques maternels ont fait la preuve de leur efficacité dans l'évaluation précoce des échecs de grossesse et des risques d'aneuploïdies. Ils peuvent être proposés aux femmes, quel que soit leur âge, en leur expliquant bien les avantages mais également les limites du test.

Ainsi que, les déterminants nutritionnels que nous avons dosé dans cette recherche montrent leur intérêt pour l'organisme. Par ailleurs, toute carence de ces molécules affecte la femme enceinte, soit par une anémie mégaloblastique qui pourrait avoir des effets néfastes sur le fœtus ce qui est confirmé par le dosage des vitamines, du fer et d'homocystéine.

De plus dans notre travail, on a constaté que l'hypertension artérielle influence sur l'évolution normale de la grossesse et montre un risque plus élevé chez les femmes en cours d'avortement comparativement aux témoins.

Dans cette étude, nous possédons un ensemble de facteurs de risque mais, il nous reste à déterminer d'autres marqueurs biologiques puis le profil génétique. Cette identification claire des marqueurs pourrait permettre à traiter ou prévenir les échecs de grossesse, diminuer la morbidité et la mortalité fœtale et maternelle. Mais elles pourraient aussi nous faire avancer dans le domaine de malformations et d'oncologie car le placenta détient le secret d'une

angiogénèse limitée dans le temps et dans l'espace, en utilisant les mêmes processus d'invasion que les tumeurs.

L'acquisition de données dans ces domaines permettra d'évaluer de manière précoce et plus complète les échecs de grossesse par la recherche des paramètres génétiques et biologiques notamment:

- La recherche de nouveaux marqueurs sériques comme : la leptine, l'Inhibine-A, l'Urotensin-II et le PAPP-A, l'Acide Méthylmalonique (MMA), VEGF qui sont probablement les futurs marqueurs.
- La prévention des avortements est un grand pas en avant dans la pratique obstétricale et les soins néonataux. L'étiologie exacte n'étant pas encore connue, une prévention primaire par le dosage des micronutriments et des marqueurs sériques apportent un complément appréciable à l'échographie. Il s'agit d'un dépistage applicable à toute la population générale. Il nous permet de sélectionner un groupe de femmes enceintes ayant un risque accru d'avortements et de malformations.
- Il semblait que l'apport en micronutriments soit efficace en améliorant le stress oxydatif et afin d'éviter ces graves conséquences, la femme enceinte doit être conseillée durant sa période de grossesse, de prendre des aliments riches en micronutriments : la vitamine B9, la vitamine B12 et les minéraux (fer et calcium), toutefois une supplémentation vitaminique peut être nécessaire.
- En effet, la diminution rapide et massive de l'IMC permet souvent la régularisation des cycles de l'ovulation, avec obtention de grossesses. Elle améliorerait les issues de grossesses, en diminuant les complications obstétricales et les risques de FCS.

# **Références bibliographiques**

- Abessolo, F. O., Ngou, J. P. N. M., Ntamack, J. B., Nsi, A. S., Meye, J. F., & Ngou-Milama, E. (2011).** Statut en micronutriments de la femme gabonaise lors du diagnostic de sa grossesse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(436), 67-71.
- Agostini A, Ronda I, Capelle M, Romain F, Bretelle F, Blanc B. (2005)** Influence of clinical and ultrasound factors on the efficacy of misoprostol in first trimester failure. *Fertil Steril Oct; 84(4): 1030-2.*
- Alberman, E. (1988).** The epidemiology of repeated abortion. In *Early Pregnancy Loss* (pp. 9-17). Springer, London.
- Andersen AM, Andersen PK, Olsen J, Gronbaek M, Strandberg-Larsen K. (2012)** Moderate alcohol intake during pregnancy and risk of fetal death. *Int J Epidemiol; 11:405–13.*
- Anderson, G. J., & Frazer, D. M. (2005).** Hepatic iron metabolism. In *Seminars in liver disease* (Vol. 25, No. 04, pp. 420-432). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- Andrews N.C. (1999).** Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.*; 341: 1986-1995.
- Ankum WM, Wieringa-De Waard M, Bindels PJE. (2001)** management of spontaneous miscarriage in the first trimester: *an example of putting informed shared decision making into practice. BMJ; 322: 1343-6.*
- Audibert F , Cayol V, Abitbol MM, Ober MB, Gallo GR, Driscoll SG, Pirani CL (1978),** *Gynécoobstétrique- 4ème édition-Estem-Collection Med-Line.*
- Ayoubi, J. M., Hirt, R., Badiou, W., Hininger-Favier, I., Favier, M., Zraik-Ayoubi, F., & Pons, J. C. (2012).** Nutrition et femme enceinte. *Gynécologie/Obstétrique*, 5(042), 1-14.
- Belaisch-Allart, J., Devaux, A., Ayel, J. P., & De Mouzon, J. (2004).** La femme de 40 ans et plus en FIV et en ICSI: données FIVNAT. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 32(9), 730-736.
- Belaisch-Allart J. (2008).** Grossesse et accouchement après 40 ans. *EMC - Obstétrique: 1-8 [Article 5-016-B-10].*
- Balen AH, Tan SL, MacDougall J, Jacobs HS. (1993)** Miscarriage rates following in vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod;8: 959-964.*
- Baudina B., 2012-** Homéostasie du fer et aspects nutritionnels. *Revue Francophone des Laboratoires*. vol. 2012(442) : 55-59.
- Beaumont C., Girot R. (2010).** Métabolisme du fer : physiologie et pathologie. *EMC Hématologie* :1-16 [Article 13-000-P-20].
- Beaumont C., Karim Z., 2013-** Actualité du métabolisme du fer. *Revue de médecine interne*. vol. 34(1) : 17-25.
- Beguin Y., 2002-** Le métabolisme du fer. *Hématologie*. vol. 8(7-11) : 7-11.

- Beguin, Y. (2002).** Prediction of response and other improvements on the limitations of recombinant human erythropoietin therapy in anemic cancer patients. *Haematologica*, 87(11), 1209-1221.
- Bellver, J., Rossal, L. P., Bosch, E., Zúñiga, A., Corona, J. T., Meléndez, F., & Pellicer, (2003).** Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertility and sterility*, 79(5), 1136-1140.
- Bergel E., Belizan J. (2002).** A deficient maternal calcium intake during pregnancy increases blood pressure of the offspring in adult rats. *BJOG*; 109: 540-5.
- Berrebi A., Pons J.C. (2012).** Nutrition et femme enceinte. *EMC - Obstétrique*;7(1):1-13 [Article 5-042-A-10].
- Beucher, G., Benoist, G., & Dreyfus, M. (2009).** Prise en charge des fausses couches spontanées du premier trimestre. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 37(3), 257-264.
- Bick, D. P., McCorkle, D., Stanley, W. S., Stern, H. J., Staszak, P., Berkovitz, G. D., ... & Kelley, R. I. (1999).** Prenatal diagnosis of Smith–Lemli–Opitz syndrome in a pregnancy with low maternal serum oestriol and a sex- reversed fetus. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 19(1), 68-71.
- Bitam A. et Belkadi N. (2008).** Prévalence de l’anémie ferriprive au cours de la grossesse dans la wilaya de Blida (Nord de l’Algérie). *Nutrition clinique et métabolisme* ; vol 22 ;N=° 3 : 100-107.
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007)** Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *The American journal of pathology* 170: 667-679.
- Blohm, F., Fridén, B., & Milsom, I. (2008).** A prospective longitudinal population- based study of clinical miscarriage in an urban Swedish population. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(2), 176-183.
- Bothwell T.H., 2000-** Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *Am JinNutr.* vol. 72(1) : 257S-64S.
- Borzychowski A.M, Sargent I.L, Redman C.W.G.(2006),**Inflammation and pre-eclampsia. *Seminars in Fetal - Neonatal Medicine*)
- Brock DJ, Barron L, Watt M, Scrimgeour JB, & Keay AJ (1982)** Maternal plasma alpha-fetoprotein and low birthweight: a prospective study throughout pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 89(5), 348-351.
- Brock, D. J., & Sutcliffe, R. G. (1972).** Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *The Lancet*, 300(7770), 197-199.
- Butte N.F., King J.C. (2005).** Energy requirements during pregnancy and lactation *Public Health Nutr.* ; 8 : 1010-1027.

- Buyalos RP., Daneshmand S., Brzechffa PR. (1997).** Basal estradiol and folliclestimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. *Fertil Steril*; 68 : 272-277.
- Cabrol, D., Pons, J. C., & Goffinet, J. F. (2003).** *Traité d'obstétrique*. Médecine-Sciences Flammarion.
- Canick, J. A., Knight, G. J., Palomak, G. E., Haddow, J. E., Cuckle, H. S., & Wald, N. J. (1988).** Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 95(4), 330-333.
- Caniggia I, Grisar-Gravnovsky S, Kuliszewsky M, Post M, & Lye SJ (1999)** Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *Journal of Clinical Investigation*, 103(12), 1641-1650.
- Caniggia I, Winter J, Lye SJ, & Post M (2000)** Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 21 (Suppl.A), 25-30.
- Cano F., Simon C., Remohi J., Pellicer A. (1995).** Effect of ageing on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril*; 64:584-589.
- Cantoni, G. L. (1975).** Biological methylation: selected aspects. *Annual review of biochemistry* , 44(1), 435-451.
- Capmas, P., Bats, A. S., Bensaid, C., Huchon, C., Scarabin, C., Nos, C., & Lecuru, F. (2009).** Surgical treatment of early endometrial cancer: what are the benefits of laparoscopy?. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 38(7), 537-544.
- Carcopino, X., Raoult, D., Bretelle, F., Boubli, L., & Stein, A. (2009).** Q Fever during Pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166(1), 79-89.
- Castorino, K., & Jovanovič, L. (2011).** Pregnancy and diabetes management: advances and controversies. *Clinical chemistry*, 57(2), 221-230.
- Castro, R., Rivera, I., Ravasco, P., Camilo, M. E., Jakobs, C., Blom, H. J., Almeida, I. T. (2004).** 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→ T and 1298A→ C mutations are associated with DNA hypomethylation. *Journal of medical genetics*, 41(6), 454-458.
- Chango, A., Parrot-Roulaud, F., & Nicolas, J. P. (1999).** Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocystéine. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 57, No. 1, pp. 37-42).
- Chayachinda, C., Thamkhantho, M., Bhuwathanapun, M., & Srinilta, A. (2012).**

Septic abortion: a 5-year experience at Siriraj Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 95(3), 307.

- Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., ... & Fodor, S. P. (1996).** Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 274(5287), 610-614.
- Cheng, M. H., & Wang, P. H. (2009).** Placentation abnormalities in the pathophysiology of preeclampsia. *Expert review of molecular diagnostics*, 9(1), 37-49.
- Chi, M. M. Y., Schlein, A. L., & Moley, K. H. (2000).** High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology*, 141(12), 4784-4792.
- Ciangura C., Czernichow S., Oppert J.M. (2009).** Obésité. *EMC - AKOS (Traité de Médecine) :1-9 [Article 3-0780]*.
- Cleary-Goldman, J., Malone, F. D., Vidaver, J., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Cmstock, C. H., ... & Timor-Tritsch, I. E. (2005).** Impact of maternal age on obstetric outcome. *Obstetrics & Gynecology*, 105(5, Part 1), 983-990.
- Condous G. (2004)**the management of early pregnancy complications. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*; 18:37-57.
- Costello, A. M. D. L., & Osrin, D. (2003).** Micronutrient status during pregnancy and outcomes for newborn infants in developing countries. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1757S-1764S.
- Craig, J. E., Savage, V., Cowley, D., Clague, A., & Glass, L. A. (1999).** Low maternal serum oestriol at mid- trimester may indicate a fetal disorder of cholesterol biosynthesis. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*, 39(2), 249-251.
- Craig, W. Y., Roberson, M., Palomaki, G. E., Shackleton, C. H., Marcos, J., & Haddow, J. E. (2010).** Prevalence of steroid sulfatase deficiency in California according to race and ethnicity. *Prenatal diagnosis*, 30(9), 893-898.
- Creinin MD, Schwartz JL, Guido RS, Pymar HC. (2001)** early pregnancy failure. *Current management concepts. Obstet Gynecol Surv* ; 56: 105-13.
- Cusick W, Rodis JF, Vintzileos AM, Albini SM, McMahan M, & Campbell WA (1996)** Predicting pregnancy outcome from the degree of maternal serum alpha-fetoprotein elevation. *Journal of Reproductive Medicine*, 41(5), 327-332.
- Cuckle, H. (2000).**Biochemical screening for Down syndrome. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and reproductive biology*, 92(1), 97-101.
- Cunningham, D. S., Brodnik, R. M., Rayl, D. L., Brown, A. W., & Hansen, K. A. (1993).** Suboptimal progesterone production in pathologic pregnancies. *The Journal of reproductive medicine*, 38(4), 301-305.

- Daily, C. A., Laurent, S. L., & Nunley, W. C. (1994).** The prognostic value of serum progesterone and quantitative  $\beta$ -human chorionic gonadotropin in early human pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 171(2), 380-384.
- Del, A. B., Maruotti, G., Fulgieri, A. M., Celeste, T., Lombardi, L., Amato, N. A., Pietropaolo, F. (2004).** Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva ginecologica*, 56(5), 379-383.
- Descamps, P., Marret, H., Binelli, C., Chaplot, S., & Gillard, P. (2000).** Modifications de l'organisme maternel au cours de la grossesse.
- Dessolle, L., Daraï, E., Cornet, D., Rouzier, R., Coutant, C., Mandelbaum, J., & Antoine, J. M. (2009).** Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. *Human reproduction*, 24(12), 3082-3089.
- De Mees, C., Szpirer, J., & Szpirer, C. (2005).** Etude de la fonction de l'alpha-foetoprotéine.
- Diallod., Bloti., Tcherniag., 1999-** Iron deficiency during pregnancy : effects on the newborn. *Hématologie*. vol. 5(3) : 216-222.
- Dodds, L., Fell, D. B., Dooley, K. C., Armson, B. A., Allen, A. C., Nassar, B. A., ... & Joseph, K. S. (2008).** Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clinical chemistry*, 54(2), 326-334.
- Dugoff, L., Hobbins, J. C., Malone, F. D., Porter, T. F., Luthy, D., Comstock, C. H., ... & Timor-Tritsch, I. E. (2004).** First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 191(4), 1446-1451.
- Duric, K., Skrablin, S., Lesin, J., Kalafatic, D., Kuvacic, I., & Suchanek, E. (2003).** Second trimester total human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein and unconjugated estriol in predicting pregnancy complications other than fetal aneuploidy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 110(1), 12-15.
- D'Uva, M., Di Micco, P., Strina, I., Alviggi, C., Iannuzzo, M., Ranieri, A., ... & DePlacido, G. (2007).** Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. *Thrombosis Journal*, 5(1), 10.
- Favier M., Hininger-Favier I., 2004-** Faut-il supplémenter en fer les femmes enceintes ?. *GynecolObstetFertil*. vol. 32 : 245-250.
- Fournié A., Laffitte A., Parant O., Ko-Kivok-Yun P. (1999).** Modifications de l'organisme maternel au cours de la grossesse. *EMC - Obstétrique ; 7(2) :1-8 [Article 5- 008- A-10]*.

- Fritz, M. A., & Speroff, L. (2011).** Clinical gynecologic endocrinology and infertility.
- Frenot M., Vierling J (2001).** Besoins et apports nutritionnels recommandés durant la grossesse in « Biochimie des aliments, diététique du sujet bien portant ;2eme Edition Editeur Doin, Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine ». p 253-60.
- Gagnon, A., Wilson, R. D., Audibert, F., Allen, V. M., Blight, C., Brock, J. A., ... & Wyatt, P. (2008).** Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes.*Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 30(10), 918-932
- Galan P., Preziosi P., Favier A., et al. (1998).** Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. *Eur J Clin Nutr*; 52 : 383-8.
- Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R.(2002)** Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 26(7):883–96.
- Ganong WF. (1973)** Pregnancy. In “Review of Medical Physiology”. 6th Ed. California: Lange Medical Publications, p.337-9.
- Genin A.-S., Meria P., Daudon M., Desgrandchamps F. (2011).** Lithiase urinaire et grossesse. *EMC - Urologie*:1-10 [Article 18-106-A-20].
- Geyl, C., Subtil, D., Vaast, P., Coulon, C., Clouqueur, E., Deruelle, P., & Debarge, V. (2014).** Interprétation des valeurs atypiques des marqueurs sériques. *Journal de obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 43(1), 5-11.
- Girard J. (1993).** Nutrition et croissance foetale. In : « Traité de nutrition pédiatrique (Ricour C., Ghisolfi J., Putet G., Goulet O. Editions Maloine, Paris, 1088 pages» ;p 295- 311.
- Glock, J. L., & Brumsted, J. R. (1995).** Color flow pulsed Doppler ultrasound in diagnosing luteal phase defect. *Fertility and sterility*, 64(3), 500-504.
- Gagnon, A., Wilson, R. D., Audibert, F., Allen, V. M., Blight, C., Brock, J. A., ... & Wyatt, P. (2008).** Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes.*Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 30(10), 918-932.
- Goldman-Wohl D & Yagel S (2002)** Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. Review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 233-238.
- Gordon, J. D., & Speroff, L. (2002).** *Handbook for clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Geyl, C., Subtil, D., Vaast, P., Coulon, C., Clouqueur, E., Deruelle, P., & Debarge, V. (2014).** Interprétation des valeurs atypiques des marqueurs sériques. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 43(1), 5-11.
- Glass I.A., Lam R.C., Chang T., and al (1998).** Steroid sulphatase deficiency is the major cause

- of extremely low oestriol production at mid-pregnancy: a urinary steroid assay for the discrimination of steroid sulphatase deficiency from other causes *Prenat Diagn*; 18 : 789-800
- Glinoeur D, Soto MF, Bourdoux P et al. (1991)** Pregnancy in patients with mild thyroid abnormalities: maternal and neonatal repercussions. *J Clin Endocrinol Metabol*;73: 421-427.
- Goldstein SR.(1994)** Embryonic death in early pregnancy : *a new look at the first trimester. Obstet Gynecol ; 84 : 294-297.*
- Gompel A., Truc JB., Decroix Y., Poitou PH. (1993).** Place du calcium aux différents âges de la vie des femmes. *Presse Med ; 22 : 864-869.*
- Gordon, J. D., & Speroff, L. (2002).** *Handbook for clinical gynecologic endocrinology and infertility.* Lippincott Williams & Wilkins.
- Graham CH & McCrae KR (1996)** Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **175(3 Pt 1)**, 555-562.
- Guéant, J. L. (2003).** Vitamines et oligoéléments Congrès franco-marocain, Rabat, 28-31 octobre 2002. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 61, No. 4, pp. 483-495).
- Guéant J. L., Villaume C., Covi G. (2007).** Folates : vitamine B9. Les vitamines, *Cahier de formation biologie médicale (N°38), BIOFORMA ; vol : 362 ; 151-162.*
- Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL (2013)** Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24: 279-289
- Guilland J.-C. (2013).** Vitamines hydrosolubles (II). Vitamines B9, B12 et C. *EMC Endocrinologie-Nutrition*;10(1):1-1]. **Harvey T., 2011-** Conséquences de la carence martiale au cours de la grossesse. *Revue générale Obstétrique.* vol. 158 : 1-7.
- Hininger-Favier I., Hercberg S. (2005).** Iron deficiency in France: prevalence and prevention. *Bull. Acad. Natl. Med. ; 189 : 1623-1630.*
- Hofmeyr GJ., Lawrie TA., Atallah AN., Duley L. (2010).** Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*;(8):CD001059.
- Hourrier S., Salomon L.J., Dreux S., Muller F. (2010).** Screening for adverse pregnancy outcome at early gestational age *Clin Chim Acta*; 411 : 1547-1552.
- Holmes, Z. R., Regan, L., Chilcott, I., & Cohen, H. (1999).** The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *British journal of haematology*, *105*(1), 98-101.

- Helm, K. D., Ness, R. M., & Evans, W. S. (2009).** Physiologic and pathophysiologic alternations of the neuroendocrine components of the reproductive axis. *Reproductive Endocrinology*, 30-81.
- Hoffman, M. L., Scoccia, B., Kurczynski, T. W., Shulman, L. P., & Gao, W. (2008).** Abnormal folate metabolism as a risk factor for first-trimester spontaneous abortion. *Journal of Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*, 53(3), 207-212.
- Israel, R., Stern, J. J., Dorfmann, A. D., Gutiérrez-Najar, A. J., Cerrillo, M., & Coulam, C. B. (1996).** Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and sterility*, 65(2), 250-253.
- Irons M.B., Nores J., Stewart T.L., and al. (1999)** Antenatal therapy of Smith-Lemli-Opitz syndrome *Fetal Diagn Ther*; 14 : 133-137
- Islami D, Bischof P, & Chardonens D (2003)** Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG . *Molecular Human Reproduction*, 9(7), 395-398.
- Ivanisevic, M. (2005).** Ultrasonic Surveillance of the Diabetic Fetus. In *Diabetology of Pregnancy* (Vol. 17, pp. 230-253). Karger Publishers.
- Jacobson B., Ladfors L., Milsom I. (2004).** Advanced maternal age and adverse perinatal outcomes. *Obstet. Gynecol.* ; 104 : 727-733.
- Jacotot B., Campillo B. (2003).** Nutrition humaine. *Abrégé. Masson éditeur. Paris, France:* 127-163.
- Jain, A., Polotsky, A. J., Rochester, D., Berga, S. L., Loucks, T., Zeitlian, G., ... & Santoro, N. (2007).** Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(7), 2468-2473.
- Jarvie, E., Hauguel-de-Mouzon, S., Nelson, S. M., Sattar, N., Catalano, P. M., & Freeman, D. J. (2010).** Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clinical Science*, 119(3), 123-129.
- Jean-Claude Empeire.(1990)** Gynécologie endocrinienne du praticien. *P ; 179:180 et 105.* Edition Frison-Roche.
- Jiang, Y., Sun, T., Xiong, J., Cao, J., Li, G., & Wang, S. (2007).** Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(9), 657-667.
- Johnson MR, Carter G, Grint C, et al.1993.** Relationship between ovarienne steroids, *ActaEndocrinol;129:121-125.*
- Jones, K. (1996).** An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *The Lancet*, 348(9023), 303-305.
- Joseph K.S., Allen A.C., Dodds L., Turner L.A., Scott H., Liston R. (2005).** The perinatal effects of delayed childbearing. *Obstet. Gynecol.;105: 1410-1418.*

- Keren, D. F., Canick, J. A., Johnson, M. Z., Schaldenbrand, J. D., Haning Jr, R. V., & Hackett, R. (1995).** Low maternal serum unconjugated estriol during prenatal screening as an indication of placental steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis. *American journal of clinical pathology*, 103(4), 400-403.
- Katz VL, Chescheir NC, & Cefalo RC (1984)** Unexplained elevations of maternal serum alpha-fetoprotein. Review. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 45(11), 719-726.
- Kirkegaard, I., Uldbjerg, N., & Henriksen, T. B. (2011).** PAPP- A and free  $\beta$ - hCG in relation to admission to neonatal intensive care unit and neonatal disease. *Prenatal diagnosis*, 31(12), 1169-1175.
- Knudsen, U. B., Hansen, V., Juul, S., & Secher, N. J. (1991).** Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, 39(1), 31-36.
- Kohlwes J., Gupta S., Bent S. (2003).** Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C, A systematic review and critical analysis, 139: 46-50.
- Kupesic, S., et Kurjak, A. (1997).** L'évaluation de la fonction lutéale normale et anormale par échographie Doppler couleur transvaginale. *Revue européenne d'obstétrique et de gynécologie et de la biologie de la reproduction*, 72 (1), 83-87.
- Kupfermanc MJ, Daniel Y, Englender T, Baram A, Many A, Jaffa AJ, Gull I, Lessing JB (1997)** Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *American Journal of Reproduction and Immunology*, 38(4), 302-306.
- Krezesinski JM, (1999).** Hypertension et grossesse. *Rev. Med liege* 54:5:415-423.
- Kuo, M. T., Iyer, B., Wu, J. R., Lapeyre, J. N., & Becker, F. F. (1984).** Methylation of the  $\alpha$ -Fetoprotein Gene in Productive and Nonproductive Rat Hepatocellular Carcinomas. *Cancer research*, 44(4), 1642-1647.
- Laufer, N., Simon, A., Samueloff, A., Yaffe, H., Milwidsky, A., & Gielchinsky, Y. (2004).** Successful spontaneous pregnancies in women older than 45 years. *Fertility and sterility*, 81(5), 1328-1332.
- Lemus, A. E., Vilchis, F., Damsky, R., Chávez, B. A., García, G. A., Grillasca, I., & Pérez-Palacios, G. (1992).** Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 41(3-8), 881-890.
- Leporrier, N., Read, M. H., Gruchy, N., & Herrou, M. (2009).** Intérêt de l'oestriol sérique maternel au 2e trimestre de la grossesse. *Méd Fœtale Echographie Gynécol*, 77, 32-5.
- Larsen WL (2003).** *Embryologie humaine*. 2e éd. française, De Boeck, Bruxelles.
- Lepercq, J. (2007).** Diabète et grossesse: quoi de neuf pour l'obstétricien?. *Médecine des*

*maladies Métaboliques*, 1(3), 88-92.

- Leung TN, Chung TK, Madsen G, Lam CW, Lam PK, Walters WA, & Smith R (2000)** Analysis of mid-trimester corticotrophin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations for predicting pre-eclampsia. *Human Reproduction*, **15(8)**, 1813-1818.
- Levallois M.P. (2003)**. Larousse médical. Edition Larousse, Paris. p 499-451.
- Lim AS., Tsakok FH. (1997)**. Age-related decline in fertility: a link to degenerative ovocytes ? . *Fertil Steril*; 68:265-271.
- Lim KH, Friedman SA, Ecker JL, Kao L & Kilpatrick SJ (1998)** The clinical utility of serum uric acid measurements in hypertensive diseases of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **178(5)**, 1067- 1071.
- Lucas, M. J. (2001)**. Diabetes complicating pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 28(3), 513-536.
- Lucas, M. J., Leveno, K. J., Williams, M. L., Raskin, P., & Whalley, P. J. (1989)**. Early pregnancy glycosylated hemoglobin, severity of diabetes, and fetal Malformations. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 161(2), 426-431.
- Lucock, M. (2000)**. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*, 71(1), 121-138.
- Luke B., Brown M. (2007)**. Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcome with increasing maternal age. *Hum. Reprod.* ; 22 : 1264-1272 .
- Lumley, J., Watson, L., Watson, M., & Bower, C. (2001)**. Modelling the potential impact of population- wide periconceptional folate/multivitamin supplementation on multiple births. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 108(9), 937-942.
- Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, & Greer IA (1997)** Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta*, 18(4), 269-276.
- Macri J.N., Kasturi R.V., Krantz D.A., and al. (1990)**, Maternal serum Down syndrome screening: free beta-protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin *Am J Obstet Gynecol*; 163 : 1248-1253 .
- Maher JE, Davis RO, Goldenberg RL, Boots LR, & DuBard MB (1994)**;Unexplained elevation in maternal serum alpha-fetoprotein and subsequent fetal loss. *Obstetrics and Gynecology*, **83(1)**, 138-141.
- Malek-Mellouli M., Ben Amara F., Loussaief W., Reziga H., 2013-** statut du fer chez la femme enceinte et ses variations au cours de la prééclampsie. *La tunisie Medicale*. vol . 91(010 ) : 577-582.
- Matijevic R & Johnston T (1999)** In vivo assessment of failed trophoblastic invasion of the spiral arteries in pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics*

- and Gynaecology*, 106(1), 78-82.
- Marcos J., Craig W.Y., Palomaki G.E., and al. (2009)**, Maternal urine and serum steroid measurements to identify steroid sulfatase deficiency (STSD) in second trimester pregnancies *Prenat Diagn* ; 29 : 771-780
- Matherly, L. H., & Goldman, D. L. (2003)**. Membrane transport of folates. *Vitamins and hormones*, 66, 405-457.
- McDowell, J. M., & Dangl, J. L. (2000)**. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in biochemical sciences*, 25(2), 79-82.
- Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, & van Asshe A (1994)** A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101(8), 669-674.
- Miletić, T., Aberle, N., Mikulandra, F., Karelović, D., Zakanj, Z., Banović, I., ... & Tadić, T. (2002)**. Perinatal outcome of pregnancies in women aged 40 and over. *Collegium antropologicum*, 26(1), 251-258.
- Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG et al.(1988)** Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Eng J Med* ; 319 : 1617-1623.
- Milman N., 2006-** Iron and pregnancy -a delicate balance. *Ann Hematol.* vol. 85 : 559-565.
- Mizejewski, G. J. (2001)**. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental biology and medicine*, 226(5), 377-408.
- Mizejewski, G. J. (2002)**. Biological role of  $\alpha$ -fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert review of anticancer therapy*, 2(6), 709-735.
- Mizejewski, G. J. (2004)**. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. *Experimental Biology and Medicine*, 229(6), 439-463.
- Milunsky, A., Jick, S. S., Bruell, C. L., MacLaughlin, D. S., Tsung, Y. K., Jick, H., ... & Willett, W. (1989)**. Predictive values, relative risks, and overall benefits of high and low maternal serum  $\alpha$ -fetoprotein screening in singleton pregnancies: new epidemiologic data. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 161(2), 291-297.
- Muller, F., Dreux, S., Sault, C., Galland, A., Puissant, H., Couplet, G., ... & Renom, G. (2003)**. Very low alpha- fetoprotein in Down syndrome maternal serum screening. *Prenatal diagnosis*, 23(7), 584-587.
- Mobasheri, E., Keshtkar, A., & Golalipour, M. J. (2010)**. Maternal folate and

- vitamin B12 status and neural tube defects in Northern Iran: a case control study. *Iranian journal of pediatrics*, 20(2), 167.
- Morel CL, Richard CL, , 1992.** *Biologie humaine 8ème DIP*. Genève: Cycle d'Orientation de Genève.
- Morin Y. (2002).** Le petit Larousse de la Médecine. *Edition Larousse*. P 403.
- Munnich, A., Ogier, H., & Saudubray, J. M. (Eds.). (1987).** *Les vitamines: aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques*. Masson.
- Munim, S., & Maheen, H. (2012).** Association of gestational weight gain and pre-pregnancy body mass index with adverse pregnancy outcome. *J Coll Physicians Surg Pak*, 22(11), 694-698.
- Nelen L., Bulten J., Steegers E.A., Blom H.J., Hanselaar A.G., Eskes T.K. (2000).** Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod*, 15, pp. 954-960.
- Nelen, W. L., Blom, H. J., Steegers, E. A., den Heijer, M., & Eskes, T. K. (2000).** Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and sterility*, 74(6), 1196-1199.
- Nelen, W. L., Blom, H. J., Steegers, E. A., Den Heijer, M., Thomas, C. M., & Eskes, T. K. (2000).** Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstetrics & gynecology*, 95(4), 519-524.
- Nepomnaschy, P. A., Welch, K. B., McConnell, D. S., Low, B. S., Strassmann, B. I., & England, B. G. (2006).** Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3938-3942.
- Ness RB & Roberts JM (1996)** Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. Review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 175(5), 1365-1370.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J.** Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000; 320: 1708-1712.
- O'rahilly., Müller F. (2000).** Developmental stages in human embryos, Washington DC. Chapitre 9 : phase embryonnaire in [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch) ».
- Odibo, A. O., Zhong, Y., Longtine, M., Tuuli, M., Odibo, L., Cahill, A. G., ... & Nelson, D. M. (2011).** First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta*, 32(4), 333-338.
- Osser S, Persson K.(1996)** Chlamydial antibodies in women who suffer miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol ; 103 : 137-141.*

- Parvin, C. A., Gray, D. L., & Kessler, G. (1991).** Influence of assay method differences on multiple of the median distributions: maternal serum alpha-fetoprotein as an example. *Clinical chemistry*, 37(5), 637-642.
- Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A.(2003)**Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*;9(4):359–72.
- Patton, P. E. (1994).** Anatomic uterine defects. *Clinical obstetrics and gynecology*, 37(3), 705-721.
- Pelissier, P., Merlin, E., Prieur, F., David, M., Malpuech, G., Forest, M. G., ... & Pena-Rosas JP., Casanueva E. (2006).** Supplémentation en calcium au cours de la grossesse en prévention des troubles hypertensifs et de leurs complications. *Bibliothèque de Santé Généraliste de l'OMS* .
- Perrin A-E, Simon C. (2002).** Nutrition de la femme enceinte. *Cah Nutr Diet*; 37: 559-64.
- Pryszak, M., Lorenz, R. P., & Kisly, A. (1995).** Pregnancy outcome in nulliparous women 35 years and older. *Obstetrics & Gynecology*, 85(1), 65-70.
- Pinto, A. B., Schlein, A. L., & Moley, K. H. (2002).** Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo.*Human Reproduction*, 17(2), 457-462.
- Purdie DW, Young JL, Guthrie KA, & Picton CE (1983)** Fetal growth achievement and elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 90(5), 433-4
- Quere I., Mercier E., Bellet H., Janbon C., Mares P., Gris J.C. (2001).** Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertil Steril* ; 75 : 823-825.
- Ranta J.K., Raatikainen K., Romppanen J., Pulkki K., (2011).** Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 157 : 48-52.
- Rébeillé, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., ... & Ravanel, S. (2006).** Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a  $\gamma$ -cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15687-15692.
- Redline RW & Patterson P (1995)** Preeclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Human Pathology*, 26(6), 594-600.
- Rey J, Sachet P.(1995)** La supplémentation des femmes enceintes durant la grossesse. Résultats d'une enquête auprès de gynécologues-obstétriciens. In Rapport des Xes *Journées de Techniques Avancées en Gynécologie-Obstétrique et Périnatalogie*.
- Risch, N., Stein, Z., Kline, J., & Warburton, D. (1986).** The relationship between

- maternal age and chromosome size in autosomal trisomy. *American journal of human genetics*, 39(1), 68.
- Rozenbaum, H. (2003).** Le déclin de la fertilité féminine avec l'âge. *Reproduction humaine et Hormones*, 16, 5-12.
- Rosenblatt, D. S. (1995).** Inherited disorders of folate transport and metabolism. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, 44(1), 435-451.
- Rissanen, A., Niemimaa, M., Suonpää, M., Rynänen, M., & Heinonen, S. (2006).** Pregnancy-associated plasma protein A, free human chorionic gonadotrophin and nuchal translucency as predictors of miscarriage. *Clinical genetics*, 69(3), 287-289.
- Russell-Jones GJ, Alpers DH (1999)** Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical biotechnology* 12: 493-520
- Sierra, E. E., & Goldman, I. D. (1999).** Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. In *Seminars in oncology* (Vol. 26, No. 2 Suppl 6, pp. 11-23).
- Salafia CM, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Miniior VK, & Vintzileos AM (1995)** Placental pathologic features of preterm preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(4), 1097-1105.
- Salle BJ. (1995).** Adaptation métabolique et besoin en calcium pendant la grossesse. *Rapport des journées de techniques avancées en gynécologie-obstétrique et périnatalogie.* : 647-653.
- Sargent I.L., Wilkins T., Redman C.W. (1988).** Maternal immune responses to the foetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* ; 2 : 1099-1104.
- Savage, D. G., Lindenbaum, J., Stabler, S. P., & Allen, R. H. (1994).** Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *The American journal of medicine*, 96(3), 239-246.
- Schlienger J.L. (2011).** État des lieux des compléments alimentaires chez la femme enceinte. *Medecines des maladies métaboliques. Endocrinologie et nutrition.* ; vol 05- N°5 : 521-532.
- Scholl, T. O., & Hediger, M. L. (1994).** Anemia and iron-deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome. *The American journal of clinical nutrition*, 59(2), 492S-501S.
- Scholl TO., & Johnson WG. (2000).** Folic acid: influence on outcome of pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(suppl), 1295S-1303S.
- Scott RT, Hofmann GE. (1995).** Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril*; 63 : 1-11.
- Sell, S., & Skelly, H. (1976).** Tissue sites of alpha1 fetoprotein synthesis by the rat during pregnancy and hepatoma growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(3), 645-648.
- Sell, S. (1980).** Heterogeneity of alpha-fetoprotein (AFP) and albumin containing cells in

normal and pathological permissive states for AFP production: AFP containing cells induced in adult rats recapitulate the appearance of AFP containing hepatocytes in fetal rats. *Oncodevelopmental biology and medicine: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 1(2), 93-105.

**Sikora J, Magnucki J, Zietek J, Kobielska L, Partyka R, Kokocinska D, et**

**al.(2007)**, Homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentration in patients with recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett* ;28:507–12.

**Silbernagl S., Lang F., 2002-** Atlas de poche de physiopathologie. 1ère édition. Ed.

Corlet.SA.Condé sur-Noireau, France. 406p.

**Smulders, Y. M., & Stehouwer, C. D. (2005).** Folate metabolism and cardiovascular

disease. In *Seminars in vascular medicine* (Vol. 5, No. 02, pp. 87-97). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001 USA.

**Speroff, L., & Fritz, M. A. (Eds.). (2005).** *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. lippincott Williams & wilkins.

**Stegers-Theunissen RP., Van Iersel CA., Peer PG., Nelen WL., Steegers EA.**

**(2004).**Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol*; 104:336-43.

**Stephenson ., Awartani K.A., Robinson W.P. (2002).** Cytogenetic analysis of

miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* ;17 : 446-451.

**Stephan, J. L. (2005).** Adrenal hypoplasia congenita: four new cases in children. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 12(4), 380-384.

**Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, Liyanarachchi S, de la Chapelle A (2012)** Inherited

cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet journal of rare diseases* 7: 56

**Theresa O., Scholl ., Reilly T., 2000-** Anemia, Iron and Pregnancy Outcome. *Nutr.* vol. 130 : 443S-447S.

**Tortora G, Zhang J, Klebanoff MA, Levine RJ, Puri M, Moyer P (2003),** Principes d'anatomie et de physiologie, V2, 1089-1091.

**Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (2001).** *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck Supérieur

**Troadec, M. B., Courselaud, B., Détivaud, L., Haziza-Pigeon, C., Leroyer, P., Brissot, P., & Loréal, O. (2006).** Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle

in mouse hepatocytes. *Journal of hepatology*, 44(2), 391-399.

**Turner M.R., Talbot K. (2009).** Functional vitamin B12 deficiency. *Pract Neurol*; 9: 37-41.

**Van Wijk MJ, Kublickiene K, Boer K, & van Bavel E (2000)** Vascular function in prééclampsia. *Cardiovascular Research*, 47, 38-48.

- Vaulont S., 2014-** Le métabolisme du fer : vers de nouveaux horizons. *Annales d'Endocrinologie*. vol. 75(5-6) : 252.
- Vinatier, D., Maunoury-Lefebvre, C., Debret-Romossier, S., Dufour, P., & Monnier, J. C. (1994).** Avortements spontanés. *Encycl Méd Chir*, 1-12.
- Vinatier, D., Dufour, P., & HATRON, P. (1998).** Le syndrome des antiphospholipides et avortements. *Contraception, fertilité, sexualité*, 26(2), 119-128.
- Wald, Nicholas (1976).** "The detection of neural tube defects by screening maternal blood.". *Prenatal Diagnosis. Les Colloques d'inserm*. pp. 227–38. *ISBN 2855981484*.
- Wald, Nicholas (1977).** "Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy". *Lancet* (1). *doi:10.1016/s0140-6736(77)92549-1*.
- Walters BN, Lao T, Smith V, & De Swiet M (1985)** alpha-Fetoprotein elevation and proteinuric pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **92(4)**, 341-344.
- Weissgerber, T. L., & Wolfe, L. A. (2006).** Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 31(1), 1-11.
- Wenstrom KD, Owen J, Boots LR, & DuBard MB (1994)** Elevated secondtrimester human chorionic gonadotropin levels in association with poor pregnancy outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **171(4)**, 1038-1041.
- Williams MA, Hickok DE, Zingheim RW, Luthy DA, Kimelman J, Nyberg DA, & Mahony BS (1992)** Elevated maternal serum alpha-fetoprotein levels and midtrimester placental abnormalities in relation to subsequent adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(4 Pt 1), 1032-1037.
- Wisborg, K., Kesmodel, U., Bech, B. H., Hedegaard, M., & Henriksen, T. B. (2003).** Maternal consumption of coffee during pregnancy and stillbirth and infant death in first year of life: prospective study. *Bmj*, 326(7386), 420.
- Wright, F., Kirchhoffer, M. O., & Giacomini, M. (1980).** Antiandrogenic activity of progesterone in human skin. *Mauvais-Jarvis P. VCFH, Wepierre J.,(ed.) Percutaneous absorption of steroids. Academic Press, London*, 123-137.
- Wouters M.G., Boers G.H., Blom H.J. et al. (1993).** Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*, 60, pp.820–825.
- Wyman, A., Pinto, A. B., Sheridan, R., & Moley, K. H. (2007).** One-cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology*, 149(2), 466-469.
- Yaron Y, Cherry M, Kramer RL, O'Brien JE, Hallak M, Johnson MP, & Evans MI**

(1999) Second-trimester maternal serum marker screening: maternal serum alpha-fetoprotein, beta-human chorionic gonadotropin, estriol, and their various combinations as predictors of pregnancy outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **181(4)**, 968-974.

**Yekta Z., Ayatollahi H., Porali R., Farzin A. (2006).** The effect of prepregnancy body mass index and gestational weight gain on pregnancy outcomes in urban care settings in Urmia-Iran. *BMC Pregnancy Childbirth*; 6:15.

**Yaron, Y., Ochshorn, Y., Heifetz, S., Lehavi, O., Sapir, Y., & Orr-Urtreger, A. (2002).** First trimester maternal serum free human chorionic gonadotropin as a predictor of adverse pregnancy outcome. *Fetal diagnosis and therapy*, 17(6), 352-356.

**Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, & Damsky CH (1997)** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *Journal of Clinical Investigation*, **99(9)**, 2139-2151.

# *Résumé*

## Résumé

L'avortement spontané est une interruption involontaire de la grossesse avant 22 semaines de gestation ou une expulsion spontanée du fœtus. Dans la population générale le nombre de fausse couche est élevé, il représente environ de 15 à 20 % des grossesses. Selon l'Institut national de santé publique Algérienne (INSPA), le pourcentage des femmes souffrent de complications permanentes au cours de grossesse en Algérie est d'environ 15 %. Notre étude à pour objectif la détermination de quelques analyses biochimiques incluant l'acide folique, vitamine B12, l'Homocystéine (Hcy), fer, calcium, l'alphafoetoprotéine (AFP),  $\beta$ -HCG, progestérone et l'œstradiol, qui sont impliqués dans le dépistage des échecs de grossesse et leurs corrélations avec l'issue des avortements au cours des deux premiers trimestres. Cette étude cas-témoins a été effectuée sur des femmes en voie d'avortement et un groupe de contrôle présentant des grossesses viables dans la région de l'Est Algérien (Batna) au cours de l'année 2015. Soixante neuf femmes enceintes au cours du premier et au deuxième trimestre ont été recrutées comme cas (présentant des fausses couches) ainsi que le groupe de contrôle (n = 69) était composé de femmes qui avaient une échographie normale. Le folate, la vitamine B12, l'alpha-fœtoprotéine, la  $\beta$ -HCG, la progestérone et l'œstradiol (uE3) ont été évalué par une électrochimiluminescence « ECLIA » sur des systèmes d'immunoanalyses (Elecsys 2010 et cobas e 6000) (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne), après une échographie cible. La concentration moyenne d'alpha-fœtoprotéine est significativement faible au cours du 1<sup>er</sup> trimestre, sa valeur est d'ordre de  $0,76 \pm 0,434$  MoM, mais elle est très élevée au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre ( $2,82 \pm 3,29$ ) MoM ( $P < 0,05$ ). Les valeurs médianes de la  $\beta$ -HCG sont très faibles aux cours des deux premiers trimestres ( $0,048 \pm 0,07$  MoM) vs ( $0,18 \pm 0,22$  MoM), ( $P < 0,05$ ), de même pour le taux d'uE3 ( $0,095 \pm 0,08$  MoM) vs ( $0,037 \pm 0,05$  MoM),  $P < 0,05$ ) et de la progestérone ( $0,21 \pm 0,15$  MoM) vs ( $0,17 \pm 0,16$  MoM),  $P < 0,05$ ), qui ont été diminué significativement aux cours des deux premiers trimestres. Par ailleurs une diminution non significative de la concentration moyenne du folate sérique ( $24,44 \pm 11,42$  vs  $28,28 \pm 30,42$  nmol/l,  $P = 0,990$ ) au cours du 1<sup>er</sup> trimestre et de  $29,23 \pm 10,97$  vs  $141,43 \pm 51,75$  pmol/l,  $P = 0,993$  au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre, Au cours des deux premiers trimestres une variation non significative des taux de la vitamine B12 [( $174,49 \pm 83,50$  vs  $176,94 \pm 65,65$  pmol/l,  $P = 0,997$ ) et ( $138,12 \pm 55,12$  vs  $31,88 \pm 5,38$  nmol/l,  $P = 0,987$ ) respectivement] et une augmentation non significative l'Homocystéine (Hcy) [( $8,58 \pm 0,79$  vs  $8,40 \pm 0,76$ )  $\mu$ mol/l,  $P = 0,886$ ) et ( $9,54 \pm 0,85$  vs  $9,47 \pm 1,49$ )  $\mu$ mol/l,  $P = 0,976$ ) respectivement] ont été observé. Le dosage du fer (Fe) et du calcium (ca) révèle une diminution non significatives : fer (Fe) ( $1,60 \pm 0,11$  vs  $1,62 \pm 0,22$  mg/l ;  $P = 0,939$ ) et ( $1,16 \pm 0,781$  vs  $1,22 \pm 0,10$  mg/l ;  $P = 0,781$ ) et le calcium (ca) ( $10,04 \pm 0,58$  vs  $10,71 \pm 0,10$ ,  $P = 0,07$ ) mg/l et ( $9,96 \pm 0,781$  vs  $10,29 \pm 0,13$  ;  $P = 0,33$ ) mg/l.

D'après cette étude; les avortements spontanés sont en association avec les modifications des taux de marqueurs sériques et de la progestérone et les micronutriments, ce qui pourrait constituer un élément important dans le diagnostic précoce des grossesses non viables, alors que les taux des vitamines n'ont pas d'effets significatifs sur ces grossesses.

**Mots-clés:** Micronutriments, Marqueurs sériques, progestérone, grossesse, femme, avortement.

## ملخص

الإجهاض هو انقطاع غير طوعي للحمل قبل انقضاء 22 أسبوعا من فترة الحمل. وفقا للمعهد الوطني الجزائري للصحة العامة، فإن نسبة النساء اللواتي يعانين من مضاعفات أثناء الحمل بلغت حوالي 15 في المائة. تهدف هذه الدراسة الى معايرة بعض التحاليل الكيميائية الحيوية كحمض الفوليك، وفيتامين ب12، ألفافيتوبروتين، الهوموسيسستين، الحديد، الكالسيوم وهرمون البروجسترون و اوستراديول في الكشف عن فشل الحمل و الاجهاض. لقد أجريت هذه الدراسة في المنطقة الشرقية من الجزائر (باتنة) خلال سنة 2015 على مجموعة من النساء الحوامل خلال الثلاثي الأول والثاني من الحمل (69) في طور الإجهاض و (69) بحمل طبيعي، وجرى تقييم حمض الفوليك، فيتامين B12، ألفا فيتو بروتين،  $\beta$ -HCG، البروجسترون والاستراديول (uE3) من خلال "ECLIA" electrochemiluminescence على أنظمة Elecsys 2010 (Roche 6000 immunoanalyser) وكوباس (Germany، Penzberg، Diagnostics)، بعد التصوير بالموجات فوق الصوتية. لقد اظهرت النتائج ان متوسط تركيز ألفا-فيتوبروتين انخفض بشكل ملحوظ خلال الأشهر الثلاثة الأولى (0,76 ± 0,434) MoM، لكنه ارتفع جدا خلال الأشهر الثلاثة الثانية (2,82 ± 3,29) MoM (P <0.05) مقارنة مع مجموعتي الحالات والضوابط. وهرمون البروجسترون (0,21 ± 0,048 MoM) vs (0,17 ± 0,16 MoM), P <0.05) و (0,15 MoM) vs (0,18 ± 0,22 MoM), P <0.05) ( $\beta$ -hCG) تم تسجيل انخفاض بشكل كبير جدا في قيم المتوسطة؛ لم يتغير متوسط تركيز حمض الفوليك في المصل وفيتامين ب 12 بشكل ملحوظ بين الحالات والضوابط في الثلث الأول والثاني. و نفس النتائج تم تسجيلها بالنسبة للهوموسيسستين (8,58±0,79 vs 8,40 ± 0,76)  $\mu\text{mol/l}$ , P = 0,886) والحديد (1,60 ± 0,11 vs 1,62 ± 0,22 mg/l ; P=0,939) et (1,16 ± 0,781 vs 1,22 ± 0,10 mg/l ; P=0,781) والكالسيوم . (10,04 ± 0,58 vs 10,71 ± 0,10, P=0,07) mg /l et (9,96 ± 0,781 vs 10,29 ± 0,13 ; P=0,33) mg/l . أظهرت نتائج هذه الدراسة أنه يمكن تشخيص المبكر لحالات الحمل غير القابلة للحياة وان عمليات الإجهاض التلقائي ترتبط بالتغيرات في معايير المصل، المغذيات الدقيقة والبروجسترون و إن مستويات الفيتامينات لا تؤثر لها على هذه الحالات.

**الكلمات المفتاحية :** المغذيات الدقيقة، علامات المصل، البروجسترون، الحمل، المرأة، الإجهاض

## Summary

Spontaneous abortion is an involuntary interruption of pregnancy before 22 weeks of gestation. According to the Algerian National Institute of Public Health (ANIPH) the percentage of women suffering from permanent complications during pregnancy is about 15%. The aim of this study is the determination of some biochemical analytes, including folic acid, vitamin B12, homocysteine (Hcy), iron (Fe), calcium (Ca), alphafoetoproteine (AFP), beta human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG), progesterone and oestradiol (uE3), which are involved in the detection of pregnancy failures. This case-control study was carried out on women in the process of abortion and a control group with viable pregnancies in the region of Este of Algeria (Batna) during the year 2015. 69 pregnant women during the first and second trimester were recruited as cases (with miscarriages) and the control group (n = 69) was comprised of women who had normal ultrasound. Folate, vitamin B12, alpha-fetoprotein,  $\beta$ -HCG, progesterone and estradiol (uE3) were evaluated by electrochemiluminescence "ECLIA" on immunoanalysis systems (Elecsys 2010 and cobas e 6000) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), after a target ultrasound, the mean concentration of alpha-fetoprotein is significantly low, it is ( $0.76 \pm 0.434$ ) MoM during the first trimester but it is very high during the first trimester. 2<sup>nd</sup> trimester ( $2.82 \pm 3.29$ ) MoM ( $P < 0.05$ ) and median  $\beta$ -HCG values are very low in the first two trimesters ( $0.048 \pm 0.07$  MoM) vs ( $0.18 \pm 0.22$  MoM), ( $P < 0.05$ ), similarly for uE3 ( $0.095 \pm 0.08$  MoM) vs ( $0.037 \pm 0.05$  MoM),  $P < 0.05$ ) and progesterone levels ( $0.21 \pm 0.15$  MoM) vs ( $0.17 \pm 0.16$  MoM),  $P < 0.05$ ), which were significantly decreased during the first two trimesters, by the way, the mean folate concentration was is equal to ( $24.44 \pm 11.42$  vs  $28.28 \pm 30.42$  nmol / l,  $P = 0.990$ ) in the 1st trimester and is ( $29.23 \pm 10.97$  vs  $141.43 \pm 51.75$  pmol / l,  $P = 0.993$ ) during the 2nd trimester and vitamin B12 ( $174.49 \pm 83.50$  vs  $176.94 \pm 65.65$  pmol / l,  $P = 0.997$ ) in the 1st trimesters and ( $138.12 \pm 55.12$  vs  $31.88 \pm 5.38$  nmol / l,  $P = 0.987$ ) in the 2<sup>nd</sup> trimester who changed but not significantly between cases and controls. For Homocysteine (Hcy) our results show a non-significant increase during the first two trimesters and the results are respectively ( $8.58 \pm 0.79$  vs  $8.40 \pm 0.76$ )  $\mu$ mol / l,  $P = 0.886$ ) and ( $9.54 \pm 0.85$  vs  $9.47 \pm 1.49$ )  $\mu$ mol / l,  $P = 0.976$ ). In contrast, iron (Fe) and calcium (ca) show a non-significant decrease: iron (Fe) ( $1.60 \pm 0.11$  vs  $1.62 \pm 0.22$  mg / l,  $P = 0.939$ ) and ( $1.16 \pm 0.781$  vs  $1.22 \pm 0.10$  mg / l,  $P = 0.781$ ) and calcium (ca) ( $10.04 \pm 0.58$  vs  $10.71 \pm 0.10$ ,  $P = 0.07$ ) mg / l and ( $9.96 \pm 0.781$  vs  $10.29 \pm 0.13$ ,  $P = 0.33$ ) mg / l. The results of this study revealed that, spontaneous abortions are associated with changes in serum markers, Micronutrients and progesterone which could form an important part in the early diagnosis of non-viable pregnancies, while vitamins levels have no significant effects on these pregnancies.

**Keywords:** Micronutrients, Serum markers, progesterone, pregnancy, woman, abortion.

# *Annexes*

# *Annexel*

# Accuracy of serum markers, progesterone and vitamins measurements for early screening of abortions in the eastern region of Algeria (Batna)

Sara Mouffouk,<sup>1</sup> Mouloud Yahia,<sup>1</sup> Chaima Mouffouk,<sup>1</sup> Hanane Boukrous,<sup>2</sup> Aicha Saaidia,<sup>3</sup> Fairouz Douha,<sup>1</sup> Naima Achi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology of Bioactive Molecules and Cell Physiopathology, University of Batna 2 Mustapha Benboulaïd; <sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry, Hospital of Batna; <sup>3</sup>Obstetrics Gynecology Service, Hospital of Meriem Bouatoura-Batna, Algeria

## Abstract

Spontaneous abortion is an involuntary interruption of pregnancy before 22 weeks of gestation. According to the Algerian National Institute of Public Health the percentage of women suffering from permanent complications during pregnancy is approximately 15%. The aim of this study is the determination of some biochemical analytes, including folic acid, vitamin B12, alpha-fetoproteine, beta human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG), progesterone and oestradiol (uE3), which are involved in the detection of pregnancy failures. This case-control study was carried out on women in the process of abortion and a control group with viable pregnancies in the East region of Algeria (Batna) during the year 2015. In the present investigation, 69 pregnant women during the first and second trimester were recruited during the first and sec-

ond trimesters as cases (with miscarriages) and the control group (n=69) was constituted of women who had normal ultrasound. The average concentration of alpha-fetoprotein is significantly low during the first trimester, but it is very high during the second trimester between cases and controls. The median values of  $\beta$ -hCG, uE3 and progesterone decrease very significantly. The mean concentration of serum folate and vitamin B12 did not change significantly between cases and controls in the first and second trimesters. The results of this study revealed that, spontaneous abortions are associated with changes in serum markers and progesterone, which could form an important part in the early diagnosis of non-viable pregnancies. However, vitamins levels have no significant effects on these pregnancies.

## Introduction

Abortion is one of the main complications affecting women at the beginning of pregnancy, leading to the interruption and the expulsion of an embryo or fetus before 22 weeks of amenorrhea.<sup>1</sup> There is no systematic diagnosis, but antenatal screening based on the determination of some biological parameters (vitamins, progesterone and serum markers) seems to be interesting in order to identify high-risk pregnancies and participates in the diagnosis of fetal malformations pathologies. Indeed, vitamins are important micronutrients to stimulate the growth and metabolism of the human beings. Some are essential for the synthesis of nucleic acids that are necessary for any cell division, for the formation of body tissues, while others are essential for energy metabolism and gene transcription.<sup>2</sup> A great increase in vitamin B requirements is observed in the start of pregnancy, especially vitamin B12 (cobalamin) and B9 (folate).<sup>3</sup> Cabrol *et al.*<sup>4</sup> reporting that one-third of pregnant women have decreased levels of erythrocyte folate during the beginning of pregnancy, this deficiency may be responsible for the anomalies of neural tube closure after conception. From this effect most vitamins can be limiting factors of fetal growth.<sup>4</sup> In addition, serum markers are biochemical molecules, of fetal or placental origin secreted in maternal serum during pregnancy (Pregnancy associated-plasma protein-A (PAPP-A) and free<sup>5</sup> Alpha-fetoprotein and oestriol). These markers are different from one patient to others depending on the number of weeks of amenorrhea and the status of pregnancy. Several studies have demonstrated the importance of these parameters in the diagnosis of fetal abnormalities and malformations pathologies.<sup>6</sup> Thus, progesterone is a steroid that plays an important role in the establishment of pregnancy. It prepares and maintains the

Correspondence: Sara Mouffouk, Laboratory of Biotechnology of Bioactive Molecules and Cell Physiopathology, University of Batna 2 Mustapha Benboulaïd, 53, Constantine Road. Fesdis, Batna 05078, Algeria.  
Tel.: +213.777359206.

E-mail: saramouff@yahoo.fr

Key words: Serum markers, progesterone, vitamins (B9, B12), abortion.

Contributions: the authors contributed equally: SM, HA, NA, AS, FD participated to the clinical part of the study and followed-up the patients ; SM, CM participated to the editing of the manuscript; MY and CM revised the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgments: the authors wish to express their appreciation for the cooperation of all contributed families.

Received for publication: 21 October 2017.

Revision received: 18 December 2017.

Accepted for publication: 22 December 2017.

©Copyright S. Mouffouk *et al.*, 2017

Licensee PAGEPress, Italy

Journal of Biological Research 2017; 90:7151

doi:10.4081/jbr.2017.7151

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 4.0) which permits any non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

endometrium which will allow the implantation and remove the maternal immune response.<sup>7</sup> In this context, we are interested in the measurement of the following parameters: folate, vitamin B12,  $\beta$ -HCG, alphafoetoproteine (AFP), oestradiol and progesterone with a retrospective manner, of hospitalized patients during the first and the second trimesters suffering from complication of pregnancy in order to determine if these parameters contribute really to the establishment of an early diagnosis of non-progressive pathologic pregnancies.

## Materials and Methods

A retrospective study was carried out during the year 2015 on patients hospitalized Obstetrics Gynecology Service of the Hospital of Meriem Bouatoura, Batna, Algeria. The entire selected patients are bleeding at the first or the second trimester of pregnancy.

Participation consent of women was obtained and agreed to collaborate in the study, which was approved by the ethics committee of each participating hospital (Obstetrics Gynecology Service of the Hospital of Meriem Bouatoura and the laboratory of Biochemistry, Hospital of Batna, Algeria). The inclusion criteria for this study were a single non-progressive pregnancy that resulted in cessation, miscarriage or fetal death before 24 weeks.

Patients were identified through survey including: family history, age, date and place of birth, as well as gynecological and obstetric given to the mother (parity and pregnancy outcomes, premature birth and eventual abortions and death in utero). Any previous congenital malformations have been recorded.

The sample included 138 pregnant women, 69 of whom were hospitalized for the first trimester (n=39) and the second one (n=30) pregnancy complications, and a control group of 69 women, with normal and progressive pregnancy.

Vitamins (B9, B12), progesterone and serum markers (AFP,  $\beta$ -HCG, uE3) are assayed in maternal blood and expressed in MoM

(multiple of the median) for each gestational age. Analysis of these parameters was carried out by the immunoassay system (Elecys 2010 and cobas e 6000) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

## Data analysis

Data were analyzed using the one way of variance (ANOVA) a multiple comparison based on a completely random design.  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Tukey test was applied to determine exactly which treatments were different ( $P < 0.05$ ). All statistical studies were performed using SPSS Version 20-32bit.

## Results

The analyses of demographic, obstetric and clinical data of all the pregnant women studied (138) are not statistically significant and the results are represented in Table 1.

The serum levels of AFP,  $\beta$ -HCG, uE3, progesterone and vitamins (B9 and B12) are dosed in the first two trimesters for both groups' patients (cases and controls) and the results are shown in Tables 2-4.

The serum level of alpha-fetoprotein during the first and the second trimesters was  $(0.762 \pm 0.431)$  vs  $(2.822 \pm 3.293)$  MoM respectively ( $P < 0.05$ ). Compared to the control group, the mean concentration of alpha-fetoprotein is significantly low during the first trimester, but it became very high during the second trimester.

In addition, the median values of  $\beta$ -HCG, uE3, progesterone during the first and the second trimester are respectively:  $(0.047 \pm 0.071)$  and  $(0.181 \pm 0.22)$  MoM, ( $P < 0.05$ ),  $(0.094 \pm 0.079)$  and  $(0.037 \pm 0.485)$  MoM, ( $P < 0.05$ ) and  $(0.047 \pm 0.071)$  and  $(0.181 \pm 0.220)$  MoM, ( $P < 0.05$ ).

The average concentration of seric folate did not change significantly between cases and controls during the first and the second

**Table 1. Demographic and clinical data of studied patients.**

Demographic and clinical data	First trimester (abortion vs control)	Second trimester (abortion vs control)
Age (years)	$(31.95 \pm 5.78)$ vs $(27.50 \pm 4.54)$	$(33 \pm 6.11)$
Weeks of amenorrhea %	5-12 (53.1%) vs 5-12 (55.3%)	13-23 (44.68%) vs 13-23 (62.1%)
Number of pregnancy median (min-max)	1 (0-5) vs 0 (0-4)	2 (0-4) vs 0 (0-4)
Abortion (number) median (min-max)	1 (0-5) vs 0 (0-3)	1 (1-3) vs 0 (0-2)
Number of living children median (min-max)	1 (0-4) vs 0 (0-4)	2 (0-5) vs 1 (0-4)
Number of premature children median (min-max)	0 (0-2) vs 0 (0-1)	0 (0-1) vs 0 (0-1)

**Table 2. Level of AFP,  $\beta$ -HCG, oestradiol (uE3) and progesterone (Mean $\pm$ SD) expressed as MoM in the first trimester.**

Parameters MoM	First trimester Mean $\pm$ SD	Significance (P)*	Confidence interval at 95%
AFP	$0.762 \pm 0.431$	0.001	0.106 to 0.368
$\beta$ -HCG	$0.047 \pm 0.071$	0.001	0.820 to 1.083
uE3	$0.094 \pm 0.079$	0.001	0.772 to 1.035
Prog	$0.216 \pm 0.155$	0.001	0.6513 to 1.884

AFP, alphafoetoproteine;  $\beta$ -hCG, beta human chorionic gonadotropin; uE3, oestradiol; Prog, progesterone. \*, Comparison with the control group: Significant  $P < 0.05$ .

trimesters and the results are respectively  $24.440 \pm 11.421$  vs  $28.279 \pm 30.422$  nmol/l,  $P=0.990$ , for the first trimester and  $29.233 \pm 10.976$  vs  $31.885 \pm 5.382$  nmol/l,  $P=0.993$  for the second semester. The mean concentration of vitamin B12 has not also varied (Table 4).

## Discussion

Several studies have suggested that fluctuations in serum markers and vitamins could affect fetal development and outcome of pregnancy.<sup>8</sup> Indeed, our results showed that during the first and the second trimesters, a low rate of  $\beta$ -HCG which is observed in patients during abortion. It is very important to indicate that these results are in good agreement with the previous studies of Dugoff *et al.* and Rissanen *et al.*<sup>9,10</sup> reporting obviously a low HCG level associated to an increased incidence of spontaneous miscarriage and that extremely low levels of HCG increased the risk of losing pregnancy before 24 weeks.

The same results were previously by Yaron *et al.*<sup>11</sup> who reported in their study that an increased risk of spontaneous miscarriage is related to a low concentration of free  $\beta$ -HCG. According to Gordon *et al.*,<sup>7</sup> placental dysfunction resulting from an angiogenesis defect induces a perturbation of  $\beta$ -HCG secretion, which plays a major role in stimulating maternal and fetal steroidogenesis and maintaining corpus luteum. This ensures a good evolution of pregnancy until the seventh week. From the 7th to the 10th week of pregnancy the steroidogenesis of the corpus luteum is replaced by the placenta.

The significant decrease of steroid levels reported in our study, is in accordance with data of Bick *et al.*<sup>12</sup> who have correlated the decrease in uE3 with chromosomal abnormalities, anencephalies and fetal death.<sup>12,13</sup> In most of these pathologies, the level of estriol is reported as being undetectable ( $<0.2$  MoM). However, our

results showed abnormally low serum progesterone levels in abortion patients during the two trimesters, which is in agreement with the results of Weissgerber *et al.*<sup>14</sup> indicating especially a marked decrease in progesterone. The extrinsic progesterone administration does not extend the gestation period which explains the early onset resulting from abortion. So, progesterone is a good diagnostic marker of non-viable pregnancies as it is the only hormone to maintain the uterine calm.<sup>15,16</sup> Also a low serum AFP was observed in patients with an abortion in the first trimester. Our results are consistent with several investigations<sup>17,18</sup> showing the correlation between the low levels of AFP and the spontaneous abortions and the presence of chromosomal abnormalities (aneuploid) such as trisomies and especially when combined with a low levels of HCG.<sup>18</sup> During the second trimester, a significant increase in AFP was observed for affected women compared to the controls. This result is consistent with the literature data, which associate the high abnormal levels of maternal AFP with fetal loss, perinatal death, neonatal deaths, hydrocephalus, diaphragmatic hernias, turner's syndrome, choroid plexus cyst, duodermal atresia, renal pyelectasia and fetal growth restriction. However, moderate increases in AFP levels above the normal value were observed during normal pregnancy in the patient with severe fetoplacental dysfunction explained previously with  $\beta$ -HCG. The placental damage allows a rapid diffusion of the AFP from the fetoplacental compartment to the maternal compartment, thus inducing an increase in the serum AFP level. Indeed, several studies associate the significant increase in AFP with the risk of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation (IUGR), retroplacental hematoma with histologic lesions of type thrombotic and inflammatory placental vessels and death in utero (MIU).<sup>19,20</sup> Serum concentrations of folic acid and vitamin B12 showed a small decrease in the serum of affected patients. This is in agreement with the results of Hoffman *et al.*<sup>21</sup> reporting that low levels of folate did not appear to be associated with complicated pregnancies at risk of abortion in the first or second trimesters.

**Table 3. Level of AFP,  $\beta$ -HCG, uE3 and progesterone (Mean $\pm$ SD) expressed in MoM during the second trimester.**

Parameters MoM	First trimester Mean $\pm$ SD	Significance (P)*	Confidence interval at 95%
AFP	2.822 $\pm$ 3.293	0.001	-2.878 to -0.767
$\beta$ -HCG	0.181 $\pm$ 0.221	NS	-0.262 to 1.848
uE3	0.037 $\pm$ 0.485	NS	-0.092 to 2.017
Prog	0.170 $\pm$ 0.159	NS	-0.225 to 1.884

\*. Comparison with the control group: Significant  $P < 0.05$ .

**Table 4. Rate of folic acid nmol/l (Mean $\pm$ SD) in the first and the second trimester.**

Parameters	First trimester (abortion vs control) Mean $\pm$ SD	Significance (P)	Confidence interval at 95%
Folate nmol/l	24.440 $\pm$ 11.421 vs 28.279 $\pm$ 30.422	NS	-28.835 to 36.508
Vitamin B12 pmol/l	174.490 $\pm$ 83.503 vs 176.942 $\pm$ 65.655	NS	30.2232 to 35.1205
Parameters	Second trimester (abortion vs control) Mean $\pm$ SD	Significance (P)	Confidence interval at 95%
Folate nmol/l	29.233 $\pm$ 10.976 vs 31.885 $\pm$ 5.382	NS	-23.1217 to 28.4263
Vitamin B12 pmol/l	138.122 $\pm$ 55.123 vs 141.434 $\pm$ 51.756	NS	-22.460 to 29.087

## Conclusions

The aim of the present study is to find how we can detect early prevent pathological pregnancies by the determination of some biochemical parameters in the maternal blood such as folic acid, alphafetoprotein (AFP), B-HCG, progesterone and oestradiol. This may be an advance in obstetric and neonatal practices because of the high incidence of these complications. Our results show clearly that (alphafetoprotein,  $\beta$ -HCG, progesterone and oestradiol) could be good markers for the early diagnosis of pregnancies in abortion.

## References

1. Chayachinda C, Thamkhantho M, Bhuwathanapun M, Srinilta A. Avortement septique: une expérience de 5 ans à l'hôpital Siriraj. *J Med Assoc Thai* 2012;95:307-12.
2. Costello AM, Osrin D. Micronutrient status during pregnancy and outcomes for newborn infants in developing countries. *J Nut* 2003;133:1757-64.
3. Ayoubi JM, Hirt R, Badiou W, et al. Nutrition et femme enceinte. *J Gynecol Obstet* 2012;5:1-14.
4. Cabrol D, Pons JC, Goffinet JF. *Traité d'obstétrique*. Flammarion, Médecine-Sciences. Paris; 2003.
5. Geyl C, Subtil D, Vaast P, et al. Interprétation des valeurs atypiques des marqueurs sériques. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2014;43:5-11.
6. Gagnon A, Wilson RD, Audibert F, et al. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30:918-49.
7. Gordon JD, Speroff L. *Handbook for clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Lippincott: Williams & Wilkins; 2002.
8. Mobasheri E, Keshtkar A, Ghalipour MJ. Maternal folate and vitamin B12 status and neural tube defects in Northern Iran: a case control study. *Iran J Pediatr* 2010;20:167-73.
9. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, et al. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1446-51.
10. Rissanen A, Niemimaa M, Suonpää M, et al. Pregnancy-associated plasma protein A, free human chorionic gonadotropin and nuchal translucency as predictors of miscarriage. *Clin Genet* 2006;69:287-9.
11. Yaron Y, Ochshorn Y, Heifetz S, et al. First trimester maternal serum free human chorionic gonadotropin as a predictor of adverse pregnancy outcome. *Fetal Diagn* 2002;17:352-6.
12. Bick DP, McCorkle D, Stanley WS, et al. Prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome in a pregnancy with low maternal serum oestriol and a sex-reversed fetus. *Prenat Diagn* 1999;19:68-71.
13. Keren DF, Canick JA, Johnson MZ, et al. Low maternal serum unconjugated estriol during prenatal screening as an indication of placental steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis. *Am J Clin Pathol* 1995;103:400-3.
14. Weissgerber TL, Wolfe LA. Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006;31:1-11.
15. Cunningham DS, Brodnik RM, Rayl DL, et al. Suboptimal progesterone production in pathologic pregnancies. *J Reprod Med* 1993; 38:301-5.
16. Daily CA, Laurent SL, Nunley WC. The prognostic value of serum progesterone and quantitative beta-human chorionic gonadotropin in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:380-3.
17. Muller F, Dreux S, Sault C, et al. Very low alpha-fetoprotein in down syndrome maternal serum screening. *Prenat Diagn* 2003;23:584-7.
18. Cuckle H. Biochemical screening for Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:97-101.
19. Milunsky A, Jick SS, Bruell CL, et al. Predictive values, relative risks, and overall benefits of high and low maternal serum  $\alpha$ -fetoprotein screening in singleton pregnancies: new epidemiologic data. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:291-7.
20. Williams MA, Hickok DE, Zingheim RW, et al. Elevated maternal serum alpha-fetoprotein levels and midtrimester placental abnormalities in relation to subsequent adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1032-7.
21. Hoffman ML, Scoccia B, Kurczynski TW, et al. Abnormal folate metabolism as a risk factor for first-trimester spontaneous abortion. *J Reprod Med* 2008;53:207-12.

# *Annexe. 2*

## Questionnaire de l'enquête

**Thème :** Recherche de marqueurs nutritionnels et génétiques des maladies de la périnatalité chez la population algérienne

### 1/Identification des femmes enceintes :

Nom:..... Prénom :..... Date de naissance : .....

Adresse : ..... Tel : .....

Date de consultation:.....Semestre: .....

Dates des dernières règles.....Date de la dernière grossesse:.....

Activité professionnelle : ..... Activité physique :..... Type d'activité :.....

Tabagisme : ..... Poids avant la grossesse (kg) :..... Poids actuel ..... Taille (m) : .....

Présenter vous des troubles liés à votre grossesse ?..... lesquels.....

Avez-vous des dégoûts depuis que vous êtes enceintes ? ..... Type :.....

Mangez vous plus depuis que vous êtes enceintes ?.....

Avez-vous des envies particulières depuis que vous êtes enceintes ?.....Lesquelles ?.....

Suivez vous un régime spécial ?....., Nature ;.....

### 2/Nombre de grossesses :

- à terme :..... Prématuré :..... Fausse couche :..... Mort pendant l'accouchement.....

Malformations : .....

.....

### 3/Renseignements médicaux personnels :

**Diabète :** (oui) (non) ;

**HTA :** (oui) (non) ;

**Insuffisance rénale :** (oui) (non) ;

**Stressée:** (oui) (non)

**Problèmes digestifs :** (oui) (non) ;

**Anémie :** (oui) (non) ;

**Infection** (oui) (non). **Autres :**.....

### 3 /Catégories d'aliments consommés pendant la grossesse :

Viande-poissons-œufs	Toujours	Souvent	Jamais
Produits laitiers			
Légumes et fruits			
Céréales			
Produits sucrés			
Boissons			

### 4/Prise de suppléments

Nom des suppléments	- Nature du supplément : ( gélules, ampoules, Comprimés)

### 5/Consentement de participation:

Acceptation de participer a cette recherche:.....
---

**Signature**

## Annexes

### Fiches techniques des paramètres biochimiques

#### 1. Dosage du Fer

##### Réactifs

Kit 2 x 100 ml ( Réf. 99 13 42 ) contenu:

A. 2 x 100 ml Solution tampon Réf. 99 06 20

B. 1 x 20 ml Réactif de coloration Réf. 99 04 12

C. 1 x 5 ml Etalon Réf. 99 02 90

Solution aqueuse de fer équivalente à 200 µg/dl (35,8 µmol/l), prêt à l'emploi.

##### Réactifs de travail

Ajouter 1,5 ml de réactif de coloration (Réactif B) à 40 ml de solution tampon (Réactif A).

Les concentrations dans les solutions réactives sont les suivantes:

<b>Réactif A</b> : Tampon acétate pH 4.9 Chlorhydrate de guanidinium Thiouree Hydroxylamine	170 mM
	4M
	80 mM
	255 mM
Conservateurs et stabilisants	-
<b>Réactif B</b> : Acétate de sodium Ferrozine	170 mM
	42 mM

#### 2. Calcium

##### Composition de réactifs

Réactif	Imidazol Tampon pH 6,75..... 100 mmol/l
Arsenazo III	Arsenazo III.....0,120 mmol/l
Standard	Calcium aqueux.....10mg/dl

##### Préparation

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

### **Equipements supplémentaire**

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 620 nm.
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Equipement général de laboratoire

### **Echantillon**

Sérum ou plasma: Séparé des cellules le plus vite possible. Des anticoagulants de sang avec de l'oxalate ou l'EDTA ne sont pas acceptable puisque ces produits chimiques forment des chélates forts avec le calcium.

# *Annexe. 3*

## Folate III

cobas®

REF

07559992 190

100

SYSTEM

MODULAR ANALYTICS E170

cobas e 411

cobas e 601

cobas e 602

## Français

## Domaine d'utilisation

Test de liaison pour la détermination quantitative in vitro de l'acide folique dans le sérum et le plasma humains.

Le test est prévu pour l'utilisation sur les systèmes d'immunoanalyse Elecsys et cobas e.

## Caractéristiques

Les anémies nutritionnelles et macrocytaires peuvent être dues à une carence en acide folique. La carence peut résulter d'un régime dépourvu de fruits crus, de légumes ou autres aliments riches en acide folique et se rencontre chez les alcooliques, les toxicomanes, les personnes âgées, les personnes de milieux sociaux défavorisés, etc. Par ailleurs, un taux sérique faible d'acide folique au cours de la grossesse a été associé à des malformations du tube neural du fœtus.<sup>1</sup> La carence alimentaire et la malabsorption sont les causes principales des déficits en acide folique.<sup>2</sup> L'acide folique est nécessaire pour un métabolisme normal, la synthèse de l'ADN et la régénération des globules rouges. En l'absence de traitement, les carences évoluent en anémie mégalo-blastique.

Comme l'anémie mégalo-blastique peut également être due à une carence en vitamine B<sub>12</sub>, il est recommandé d'effectuer un dosage de la vitamine B<sub>12</sub> parallèlement à celui de l'acide folique pour déterminer l'étiologie de l'anémie. Les premiers tests immunoradiologiques pour la détermination de l'acide folique datent de 1973.<sup>3,4,5,6</sup>

La plupart d'entre eux utilisent comme traceurs l'acide folique radiomarqué à <sup>125</sup>I et des protéines de liaison naturelles (protéine de liaison du lait, protéine de liaison de l'acide folique). Les tests du commerce se distinguent par leurs techniques de séparation (libre ou liée) et par leur méthode de prétraitement de l'échantillon.

Le test Elecsys Folate III fait appel au principe de compétition et utilise une protéine de liaison des folates naturelle (folate binding protein = FBP), spécifique de l'acide folique. L'acide folique contenu dans l'échantillon entre en compétition avec l'acide folique exogène marqué à la biotine pour les sites de liaison libres du complexe FBP marqué au ruthénium<sup>a)</sup>.

a) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>; Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

## Principe

Principe de compétition. Durée totale du cycle analytique: 27 minutes

- 1ère incubation: 25 µL d'échantillon sont incubés avec les réactifs de prétraitement 1 et 2; l'acide folique lié est libéré des FBP endogènes.
- 2ème incubation: L'échantillon prétraité est incubé avec la FBP marquée au ruthénium. Il se forme un complexe dont la quantité dépend de la concentration en analyte dans l'échantillon.
- 3ème incubation: Après addition des microparticules tapissées de streptavidine et de l'acide folique biotinylé, les sites libres de la FBP marquée au ruthénium sont occupés; il se forme un complexe acide folique biotinylé-FBP marquée au ruthénium. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

## Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack de réactifs (M, R1, R2) et les réactifs de prétraitement (PT1, PT2) sont étiquetés Fol III.

- PT1 Réactif de prétraitement 1 (bouchon blanc), 1 flacon contenant 4 mL: Sodium 2-mercaptoéthanesulfonate (MESNA) 40 g/L, pH 5.5
- PT2 Réactif de prétraitement 2 (bouchon gris), 1 flacon contenant 5 mL: Hydroxyde de sodium 25 g/L
- M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6.5 mL: Microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL, conservateur
- R1 FBP-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (bouchon gris), 1 flacon contenant 9 mL: protéine de liaison des folates marquée au ruthénium 75 µg/L; sérumalbumine humaine (stabilisateur); tampon borate/phosphate/citrate 70 mmol/L, pH 5.5; conservateur
- R2 Acide folique-biotine (bouchon noir), 1 flacon contenant 8 mL: acide folique biotinylé 17 µg/L; biotine 120 µg/L; sérumalbumine humaine (stabilisateur); tampon borate 100 mmol/L, pH 9.0; conservateur

## Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

Ce colfret contient des substances classées de la manière suivante selon le règlement CE 1272/2008:



Danger

H290

Peut être corrosif pour les métaux.

H314

Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Prévention:

P280

Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Réponse:

P301 + P330 + P331

EN CAS D'INGESTION: Rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

P303 + P361 + P353

EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.

P304 + P340 + P310

EN CAS D'INHALATION: Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

# Folate III

cobas®

P305 + P351 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P390 Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

L'étiquetage de sécurité du produit est principalement conforme à la réglementation CLP/GHS.

Contact tél.: tous pays: +49-621-7590

Tous les matériaux d'origine humaine doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tous les dérivés de sang humain utilisés ont été préparés uniquement à partir de sang de donneurs où la recherche de l'antigène HBs et des anticorps anti-VHC et anti-VIH a conduit à un résultat négatif. Les méthodes utilisées pour le dépistage étaient approuvées par la FDA ou conformes à la directive européenne 98/79/CE, Annexe II, liste A.

Cependant, comme le risque d'infection ne peut être exclu avec certitude par aucune méthode, ce produit doit être traité avec le même soin que les échantillons de patients. En cas d'exposition, suivre les directives de l'autorité compétente en matière de santé.<sup>7,8</sup>

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

### Préparation des réactifs

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

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

### Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
après ouverture, entre 2 et 8 °C	56 jours (8 semaines)
sur les analyseurs	14 jours (2 semaines) à bord ou 28 jours (4 semaines) en cas de conservation alternée au réfrigérateur et sur l'analyseur pour une durée totale sur l'analyseur n'excédant pas 10 x 8 heures

### Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

Plasma recueilli sur héparinate de lithium. Les tubes de prélèvement du plasma à l'héparinate de lithium contenant un gel séparateur peuvent être utilisés.

Critère d'acceptabilité: comparaison de méthode sérum vs plasma sur héparinate de lithium, pente entre 0.9 et 1.1 + ordonnée à l'origine < ± 2 x Limite du Blanc (LDB), coefficient de corrélation ≥ 0.95.

Sérum: stable 2 heures entre 15 et 25 °C, 48 heures entre 2 et 8 °C, 28 jours entre -15 et -25 °C. Une seule congélation possible. Protéger de la lumière. Conserver les échantillons entre 2 et 8 °C s'ils ne peuvent pas être analysés immédiatement.

Plasma sur héparinate de lithium: stable 2 heures entre 15 et 25 °C, 48 heures entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler les échantillons contenant de l'héparinate de lithium. Protéger de la lumière. Conserver les échantillons entre 2 et 8 °C s'ils ne peuvent pas être analysés immédiatement.

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.

Veiller à ce que les échantillons ne se trouvent pas dégradés par la suite par des additifs (biocides, anti-oxydants ou toute substance pouvant modifier le pH de l'échantillon) afin d'éviter les taux de récupération erronés.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

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

*Remarque:* L'hémolyse peut augmenter considérablement les taux d'acide folique du fait des concentrations élevées de folates dans les globules rouges. Ne pas utiliser d'échantillons présentant une hémolyse. Les échantillons destinés au dosage de l'acide folique doivent être prélevés sur des patients à jeun.

### Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

### Matériel auxiliaire nécessaire

- [REF] 07560001190, Folate III CalSet, pour 4 x 1.0 mL
- [REF] 05618860190, PreciControl Varia: pour 2 x 3 mL de PreciControl Varia 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Varia 2
- [REF] 11732277122, Diluent Universel, 2 x 16 mL diluant pour échantillon ou
- [REF] 03183971122, Diluent Universel, 2 x 36 mL diluant pour échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e

Matériel auxiliaire pour l'analyseur cobas e 411:

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

Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:

- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L, tampon système
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
- [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
- [REF] 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL, solution de lavage avant la détection
- [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
- [REF] 03023150001, WasteLiner (sacs pour déchets)
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean

Pour tous les analyseurs:

# *Annexe. 4*

# HCYS

Homocysteine Enzymatic Assay

Références de commande

cobas®

REF	CONTENT		cobas c pack(s) utilisable(s) sur les analyseurs suivants
05385415 190	Homocysteine Enzymatic Assay 100 tests	System-ID 07 7487 1	Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
05385504 190	HCYS Calibrator Kit (2 x 3 mL)	Code 590	
05142423 190	HCYS Control Kit Control 1 (2 x 3 mL)	Code 254	
	HCYS Control Kit Control 2 (2 x 3 mL)	Code 255	
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3	

## Français

### Informations techniques

Pour les analyseurs cobas c 311/501:

HCYS: ACN 778

Pour l'analyseur cobas c 502:

HCYS: ACN 8778

### Domaine d'utilisation

Test in vitro pour la détermination quantitative de la L-homocystéine totale dans le sérum et le plasma humains sur les systèmes Roche/Hitachi cobas c. Le test peut être une aide dans le diagnostic des patients chez lesquels on suspecte une hyperhomocystéinémie ou une homocystinurie.

### Caractéristiques<sup>1,2,3</sup>

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé possédant un thiol. Elle est synthétisée par déméthylation intracellulaire de la méthionine. L'homocystéine totale (tHcy) représente la somme de toutes les formes d'homocystéine (oxydée, liée à des protéines et libre).

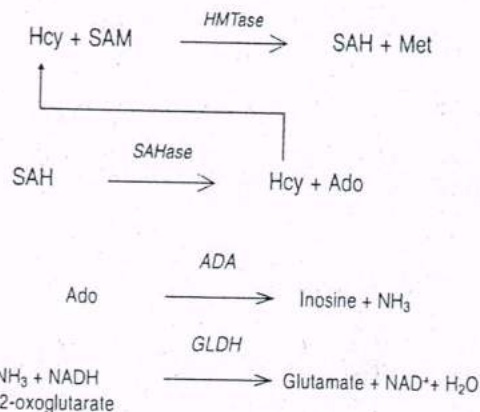
Un taux élevé de tHcy s'est avéré être un important facteur de risque de maladie cardiovasculaire.<sup>1,2,3</sup> En raison de sa nature irritante, un excès d'Hcy dans le sang circulant peut être à l'origine de lésions des vaisseaux artériels, et conduire à une inflammation et à la formation de plaques pouvant conduire au blocage du flux sanguin vers le cœur.

L'augmentation des taux de tHcy est due à quatre facteurs principaux:

1. anomalies enzymatiques génétiques impliquées dans le métabolisme de l'Hcy: déficit en cystathionine bêta-synthase (CBS), en méthionine-synthase (MS) et en méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR),
2. carence nutritionnelle en vitamines B (B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et folates),
3. insuffisance rénale entravant la clairance efficace des acides aminés,
4. interactions médicamenteuses (oxyde nitrique, méthotrexate, phénytoïne) interférant avec le métabolisme de l'Hcy. Il existe également un lien entre les taux élevés de tHcy et la maladie d'Alzheimer<sup>4</sup>, les maladies neuropsychiatriques<sup>5</sup> et l'ostéoporose.<sup>6</sup> Des directives pour la détermination de la tHcy en laboratoire clinique ont été établies.<sup>7,8</sup>

### Principe

Le test Homocysteine Enzymatic Assay est basé sur un principe d'analyse innovant qui utilise un cycle enzymatique permettant d'évaluer le produit de conversion du co-substrat plutôt que le co-substrat lui-même ou les produits de conversion homocystéinés de l'Hcy. L'Hcy oxydée est d'abord réduite en Hcy libre qui réagit par la suite avec un co-substrat, la S-adénosyl-méthionine (SAM), pour former de la méthionine (Mét) et de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) dans une réaction catalysée par une Hcy S-méthyltransférase. La SAH est déterminée par une réaction enzymatique couplée lors de laquelle elle est hydrolysée en adénosine (Ado) et Hcy en présence de SAH-hydrolase. L'Hcy est réinjectée dans le cycle de conversion, ce qui induit une amplification du signal de détection. L'Ado formée est immédiatement hydrolysée en inosine et ammoniac. Dans la dernière étape, l'enzyme glutamate déshydrogénase (GLDH) catalyse la réaction de l'ammoniac en présence de 2-oxoglutarate et de NADH pour former du NAD<sup>+</sup>. La concentration en Hcy de l'échantillon est directement proportionnelle à la quantité de NADH converti en NAD<sup>+</sup> ( $\Delta A_{340\text{ nm}}$ ).



### Réactifs - composition et concentrations

- R1 Réactif NADH  
S-adénosylméthionine 0.1 mmol/L, TCEP\* > 0.5 mmol/L, 2-oxoglutarate < 5.0 mmol/L, NADH > 0.2 mmol/L, tampon, pH 9.1 (25 °C), conservateur, stabilisateur
- R2 Réactif enzyme  
Homocystéine S-méthyltransférase (HMTase) 5.0 kU/L, glutamate déshydrogénase (GLDH) 10 kU/L, caséine (bovine) ≤ 0.2 %, tampon, pH 7.2 (25 °C), conservateur, détergent
- R3 Réactif de démarrage  
Adénosine désaminase (bovine) 5.0 kU/L, S-adénosyl-homocystéine hydrolase (SAHase) 3.0 kU/L, caséine (bovine) ≤ 0.2 %, tampon, pH 7.2 (25 °C), conservateur, stabilisateur

\* Tris[2-carboxyéthyl]prospine

R1 est en position A, R2 en position B et R3 en position C.

### Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.  
Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales. Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

### Préparation des réactifs

Prêt à l'emploi.

### Conservation et stabilité

#### HCYS

Avant ouverture, entre 2 et 8 °C:

Voir date de péremption sur l'étiquette du cobas c pack.

A bord, en cours d'utilisation et réfrigéré sur l'analyseur:

4 semaines

# HCYS

Homocysteine Enzymatic Assay

cobas®

Diluent NaCl 9 %

Avant ouverture, entre 2 et 8 °C:

Voir date de  
péremption sur  
l'étiquette du  
cobas c pack.  
12 semaines

A bord, en cours d'utilisation et réfrigéré sur  
l'analyseur.

Ne pas congeler.

## 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 indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

Sérum

Plasma: Plasma recueilli sur héparinate de lithium, EDTA dipotassique et EDTA tripotassique.

Il est important de centrifuger les échantillons de sang immédiatement après le prélèvement pour séparer le plasma des éléments figurés. Si une centrifugation immédiate n'est pas possible, les échantillons de sang doivent être conservés sur de la glace et centrifugés dans l'heure qui suit le prélèvement. L'analyse d'échantillons présentant une hémolyse, un précipité ou une forte lipémie n'est pas recommandée avec le test Hcy.

Les différents types d'échantillons indiqués ci-dessous 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.

Stabilité: 8, 9, 10

4 jours entre 15 et 25 °C

4 semaines entre 2 et 8 °C

10 mois à -20 °C

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

## Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

## Matériel auxiliaire nécessaire

• Voir paragraphe « Références de commande ».

Équipement habituel de laboratoire

## Réalisation du test

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

En cas d'utilisation de tests non validés par Roche, les performances analytiques ne sont pas garanties et doivent être définies par l'utilisateur.

## Application pour le sérum et le plasma

### cobas c 311 Définition du test

Mode de mesure	Point Final 2	
Temps de dosage/points de mesure	10 / 36-57	
Longueur d'ondes (sec/princ)	700/340 nm	
Sens de la réaction	Décroissant	
Unités	µmol/L	
Pipetage des réactifs		Diluant (H <sub>2</sub> O)
R1	176 µL	-
R2	28 µL	-
R3	20 µL	-

### Volumes échantillon

	Echantillon	Dilution échantillon	
		Echantillon	Diluant (NaCl)
Normal	14 µL	-	-
Diminué	14 µL	30 µL	120 µL
Augmenté	14 µL	-	-

### cobas c 501/502 Définition du test

Mode de mesure	Point Final 2
Temps de dosage/points de mesure	10 / 51-70
Longueur d'ondes (sec/princ)	700/340 nm
Sens de la réaction	Décroissant
Unités	µmol/L

### Pipetage des réactifs

		Diluant (H <sub>2</sub> O)
R1	176 µL	-
R2	28 µL	-
R3	20 µL	-

### Volumes échantillon

	Echantillon	Dilution échantillon	
		Echantillon	Diluant (NaCl)
Normal	14 µL	-	-
Diminué	14 µL	30 µL	120 µL
Augmenté	14 µL	-	-

## Calibration

### Calibrateurs

S1-5: HCYS Calibrator Kit

Facteurs multiplicateurs de la valeur du calibrateur HCYS Calibrator Kit pour le calcul des concentrations des standards de la courbe de calibration (calibration en 5 points):

S1: 0.050	S4: 0.500
S2: 0.100	S5: 1.00
S3: 0.250	

### Type calibration

RCM

### Fréquence des calibrations

Calibration complète

- tous les 7 jours
- à chaque nouveau lot de réactifs
- et si le contrôle de qualité l'exige

Traçabilité: La méthode a été standardisée par rapport au matériel de référence NIST SRM 1955.

## Contrôle de qualité

Pour le contrôle de qualité, utiliser les matériaux de contrôle indiqués dans la section « Références de commande ».

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 des limites définies.

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

## Calcul des résultats

Les systèmes Roche/Hitachi cobas c calculent automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon.

## Limites d'utilisation - interférences

Critère d'acceptabilité: Recouvrement  $\pm 10\%$  de la valeur initiale pour des concentrations en analyte  $> 15 \mu\text{mol/L}$  ou  $\pm 1.5 \mu\text{mol/L}$  pour des concentrations en analyte  $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ .

Ictère:<sup>11</sup> Pas d'interférence significative jusqu'à un indice I de 20 pour la bilirubine conjuguée et non conjuguée (concentration approximative en bilirubine conjuguée et non conjuguée: 342 µmol/L ou 20 mg/dL).

Hémolyse:<sup>11</sup> Pas d'interférence significative jusqu'à un indice H de 100 (concentration approximative d'hémoglobine: 62 µmol/L ou 100 mg/dL).

Lipémie (Intralipid):<sup>11</sup> Pas d'interférence significative jusqu'à un indice L de 250. Il n'y a pas de concordance satisfaisante entre la turbidité (indice L) et la concentration en triglycérides.

Médicaments: Aucune interférence n'a été trouvée aux concentrations thérapeutiques dans un panel de médicaments fréquemment administrés.<sup>12, 13</sup>

Exceptions: Glutathione 0.5 mmol/L, Cystathionine 100 µmol/L, Pyruvate 0.5 mmol/L.

Chez les patients traités par le méthotrexate, la carbamazépine, la phénytoïne, l'oxyde nitrique, les anticonvulsifs ou le 6-azuridine triacétate, les taux de Hcy peuvent être augmentés en raison d'une interférence avec le métabolisme de l'Hcy.<sup>7, 10</sup>

La S-adénosylhomocystéine (SAH) conduit à une interférence positive significative. Néanmoins, la SAH n'est détectable dans le plasma normal qu'à des concentrations sub-nanomolaires et ne devrait pas gêner.<sup>14</sup>

L'addition de 3-déazaadénosine pour inhiber la production de Hcy dans les érythrocytes a été suggérée. Les échantillons contenant de la 3-déazaadénosine ne peuvent pas être analysés avec le test Homocysteine Enzymatic Assay, celle-ci inhibant une des enzymes clé utilisées dans le test.

Dans de très rares cas, la gammopathie, en particulier de type IgM (macroglobulinémie de Waldenström), peut conduire à des résultats erronés.<sup>15</sup>

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.

#### ACTION NÉCESSAIRE

Programmation de lavages spéciaux: Sur les analyseurs Roche/Hitachi cobas c, certaines combinaisons de tests nécessitent la programmation d'étapes de lavage spéciales. La dernière version de la liste de prévention des contaminations (Carry over evasion list) figure dans les fiches techniques de NaOH-SMS-SmpCln1+2-SCCS. Pour de plus amples instructions, se référer au manuel de l'utilisateur. Analyseur cobas c 502: Toutes les programmations de lavages spéciaux pour la prévention des contaminations se font via cobas link. Aucune entrée manuelle n'est nécessaire.

Le cas échéant, la programmation des lavages spéciaux/de prévention des contaminations doit être implémentée avant d'effectuer le rapport de ce test.

#### Limites et intervalles

##### Domaine de mesure

3-50 µmol/L

Déterminer les échantillons ayant des concentrations plus élevées via la fonction Réanalyse. La dilution des échantillons déterminés par la fonction réanalyse est de 1/5. Les résultats des échantillons dilués pour la réanalyse sont automatiquement multipliés par 5.

#### Limites inférieures de mesure

Limite du Blanc (LdB), Limite de Détection (LdD) et Limite de Quantification (LdQ)

Limite du Blanc = 3 µmol/L

Limite de Détection = 3 µmol/L

Limite de Quantification = 5.5 µmol/L

La Limite du Blanc et la Limite de Détection ont été déterminées conformément aux recommandations du protocole EP17-A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

La Limite du Blanc correspond au 95<sup>ème</sup> percentile d'au moins 60 déterminations d'échantillons exempts d'analyte dans plusieurs séries indépendantes. La Limite du Blanc correspond à la concentration au-dessous de laquelle on obtient des échantillons exempts d'analyte avec une probabilité de 95 %.

La Limite de Détection a été déterminée sur la base de la Limite du Blanc et la déviation standard des échantillons de faible concentration.

La Limite de Détection correspond à la concentration en analyte la plus basse détectable (valeur située au-dessus de la Limite du Blanc avec une probabilité de 95 %).

La Limite de Quantification est définie comme étant la concentration en analyte la plus basse, mesurable de manière reproductible avec une erreur totale de 30 %. Elle a été déterminée à l'aide d'échantillons ayant une faible concentration en homocystéine.

#### Valeurs de référence

Dans la plupart des laboratoires des USA, la valeur seuil utilisée pour les taux normaux de Hcy chez l'adulte est 15 µmol/L.

Dans les laboratoires européens, la valeur seuil utilisée pour les taux normaux de Hcy chez l'adulte est 12 µmol/L.<sup>8</sup>

L'âge, la grossesse et la fonction rénale ont une influence importante. L'acide folique absorbé sous forme de compléments alimentaires ou par supplémentation doit être pris en considération:

Population	Supplément acide folique	Sans supplément folique
(Hcy à jeun/conc. basale, en µmol/L)		
Grossesse	8	10
Enfants < 15 ans	8	10
Adultes: 15 à 65 ans	12	15
Personnes âgées > 65 ans	16	20

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

#### Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

#### Précision

La précision a été déterminée à l'aide d'échantillons humains et de contrôles selon les directives EP5 du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): répétabilité (n = 21) et précision intermédiaire (2 aliquotes par série, 2 séries par jour, 21 jours). Les résultats suivants ont été obtenus:

Répétabilité	Moyenne	SD	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.2	1.5
Homocysteine Control 2	39.1	0.7	1.8
Sérum humain 1	8.26	0.16	2.0
Sérum humain 2	13.1	0.2	1.8
Sérum humain 3	30.0	0.4	1.4
Sérum humain 4	44.4	0.9	2.0
Précision intermédiaire	Moyenne	SD	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.3	2.1
Homocysteine Control 2	39.1	0.8	2.0
Sérum humain 1	8.26	0.19	2.3
Sérum humain 2	13.1	0.3	2.1
Sérum humain 3	30.0	0.5	1.8
Sérum humain 4	44.4	1.0	2.2

#### Comparaison de méthodes

Les taux de Hcy déterminés dans des échantillons de sérum humains sur l'analyseur cobas c 501 (y) ont été comparés à ceux obtenus avec le réactif correspondant sur un analyseur COBAS INTEGRA 400 (x).

n = 56

# *Annexe. 5*

REF	Σ	SYSTEM
07713207 190	100	MODULAR ANALYTICS E170 cobas e 411 cobas e 601 cobas e 602

## Français

## Informations techniques

Pour l'analyseur cobas e 411: test n° 1550  
Pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602: code d'application (ACN) 167

## Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de la vitamine B12 active (holotranscobalamine) dans le sérum humain. Le test est une aide au diagnostic et au traitement des carences en vitamine B12. Ce test par électrochimiluminescence « ECLIA » s'utilise sur les systèmes d'immunoanalyse Elecsys et cobas e.

## Caractéristiques

La vitamine B12 est un micronutriment hydrosoluble essentiel qui ne peut être produit par l'organisme humain.<sup>1,2,3</sup> Trois protéines porteuses interviennent dans le transport et l'absorption de la vitamine B12 (cobalamine): le facteur intrinsèque, la transcobalamine (TC) et l'haptocorrine (HC).<sup>1</sup> La majeure partie (70 à 90 %) de la vitamine B12 sérique totale circulante est fixée à HC.<sup>4,5</sup> Environ 20 à 30 % de la vitamine B12 totale circulante sont fixés à la TC (connue sous le nom de holoTC).<sup>4</sup> Sa libération depuis la circulation portale vers les cellules se fait par l'intermédiaire de l'holoTC, la fraction biologiquement active.<sup>4,5</sup> Cette isoforme capable de pénétrer dans les cellules pour exercer l'action biologique de la vitamine B12 est qualifiée de « vitamine B12 active ».<sup>4,6</sup>

La vitamine B12 est essentielle dans le métabolisme des hydrates de carbone, des graisses et des protéines, de même que dans la synthèse des acides nucléiques.<sup>2</sup> Elle sert de cofacteur pour les enzymes et joue un rôle central dans deux réactions métaboliques importantes: la conversion de l'homocystéine en méthionine et celle du méthylmalonyl-coenzyme A en succinyl-coenzyme A.<sup>7</sup> La vitamine B12 est donc vitale dans des processus tels que la division des cellules, le maintien du fonctionnement du système nerveux central et la formation et régénération des globules rouges.<sup>2,8</sup>

Une carence en vitamine B12 peut avoir des répercussions cliniques majeures et, non traitée, causer des lésions irréversibles.<sup>1,7,9</sup> Les manifestations de carence en vitamine B12 les plus communes sont les troubles hématologiques touchant en particulier la formation des érythrocytes (anémie mégaloblastique, par ex.)<sup>7,9</sup> et les troubles neurologiques, comme la démyélinisation de la moelle épinière et le déclin cognitif.<sup>7</sup> La carence en vitamine B12 a également été associée à des troubles du métabolisme osseux<sup>10</sup> et certaines neuropathies optiques, bien que ceux-ci soient moins fréquents.<sup>9</sup>

Les causes les plus communes de carence en vitamine B12 sont le fait d'une malabsorption due à une anémie pernicieuse (gastrite auto-immune) ou au vieillissement, d'un apport alimentaire insuffisant et d'autres dysfonctionnements acquis du métabolisme de la vitamine B12.<sup>7,8,11</sup>

L'holoTC étant la part active de la vitamine B12<sup>5</sup> et ayant une demi-vie circulante plus courte que l'holoHC,<sup>5</sup> de nombreuses publications considèrent le dosage de l'holoTC comme un meilleur indicateur diagnostique et clinique de carence en vitamine B12 que celui de la vitamine B12 sérique totale.<sup>3,6,11,12,13</sup> Contrairement à la vitamine B12 sérique totale, l'holoTC est supposée être stable au cours de la grossesse.<sup>6,8,11</sup> Par ailleurs, l'holoTC s'est montrée être le meilleur indicateur du statut de la vitamine B12 dans la population âgée, suggérant de doser la vitamine B12 active en première intention pour dépister les carences en vitamine B12.<sup>12</sup>

## Principe

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique: 18 minutes

- 1ère incubation: 30 µL d'échantillon, un anticorps monoclonal anti-holotranscobalamine marqué à la biotine et un anticorps monoclonal anti-transcobalamine marqué au ruthénium<sup>a)</sup> réagissent pour former un « sandwich ».

- 2ème incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans l'étiquette code-barres ou le e-code-barres du réactif.

a) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

## Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack réactif est étiqueté ACTB12.

- M Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon, 6,5 mL:  
Microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL; conservateur
- R1 Ac anti-holotranscobalamine-biotine, 1 flacon, 9 mL:  
Anticorps monoclonal (souris) anti-holotranscobalamine biotinylé 2 mg/L; tampon HEPES<sup>b)</sup> 50 mmol/L, pH 6.8; conservateur
- R2 Ac anti-transcobalamine-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, 1 flacon, 9 mL:  
Anticorps monoclonal (souris) anti-transcobalamine ruthénylé 0.5 mg/L; tampon HEPES 50 mmol/L, pH 6.8; conservateur

b) HEPES = acide [(hydroxy-2 éthyl)-4 pipérazinyl-1]-2 éthanesulfonique

## Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

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

## Préparation des réactifs

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

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

## Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
sur les analyseurs	48 jours

## Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

# Elecsys Active B12

cobas®

Stabilité: 5 jours entre 15 et 25 °C, 14 jours entre 2 et 8 °C, 6 mois à -20 °C (± 5 °C). Les échantillons peuvent être congelés 5 fois.

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.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients et des calibrateurs se situe entre 20 et 25 °C.

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

## Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

## Matériel auxiliaire nécessaire

- [REF] 07726350190, CalSet Active B12, pour 4 x 1.0 mL
- [REF] 07713223190, PreciControl Active B12, pour 4 x 3.0 mL
- [REF] 05192943190, Diluent Universel 2, 2 x 36 mL, diluant pour échantillon

- Equipement habituel de laboratoire
- MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e

Matériel auxiliaire pour l'analyseur cobas e 411:

- [REF] 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL, tampon système
- [REF] 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL, additif à la solution de lavage
- [REF] 11933159001, Adaptateur pour SysClean
- [REF] 11706802001, AssayCup, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
- [REF] 11706799001, AssayTip, 30 x 120 embouts de pipette
- [REF] 11800507001, Clean-Liner

Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:

- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L, tampon système
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
- [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
- [REF] 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL, solution de lavage avant la détection
- [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup, 48 blocs de 84 cuvettes réactionnelles/ embouts de pipettes, sacs pour déchets
- [REF] 03023150001, Wasteliner (sacs pour déchets)
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean

Pour tous les analyseurs:

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

## Réalisation du test

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

L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les paramètres spécifiques du test mémorisés dans le code-barres doivent être saisis. Si, exceptionnellement, le code-barres ne peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette (excepté pour l'analyseur cobas e 602).

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602: L'utilisation de la solution PreClean M est nécessaire.

Amener les réactifs réfrigérés à environ 20 °C et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

## Calibration

Traçabilité: La méthode a été standardisée par rapport au standard international de l'OMS du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control), code 03/178.

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

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

La fréquence de calibration peut être réduite après une vérification acceptable de la calibration par le laboratoire.

Une nouvelle calibration est recommandée:

- après 8 semaines pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même coffret de réactif resté sur l'analyseur
- si nécessaire: par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies.

## Contrôle de qualité

Utiliser PreciControl Active B12.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

Le cas échéant, retirer une analyse des échantillons concernés.

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

## Remarque:

Pour des raisons techniques, les valeurs cibles réattribuées uniquement à une combinaison de lot de réactifs et de contrôles spécifique, doivent être saisies manuellement sur tous les analyseurs (excepté pour l'analyseur cobas e 602). A cet effet, toujours se référer aux indications figurant sur la fiche de valeurs jointe au coffret de réactifs ou de PreciControl, pour s'assurer de bien utiliser les valeurs cibles correctes. Au prochain nouveau lot de réactifs ou de contrôles, l'analyseur lira automatiquement les valeurs encodées dans les code-barres.

## Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en pmol/L.

## Limites d'utilisation - interférences

L'influence des substances endogènes et médicamenteuses suivantes sur les performances analytiques du test a été recherchée. Les interférences ont été testées jusqu'aux concentrations indiquées. Aucune influence sur les résultats n'a été observée.

## Substances endogènes

Substance	Concentration testée
Bilirubine	≤ 1129 µmol/L ou ≤ 66 mg/dL
Hémoglobine	≤ 0.621 mmol/L ou ≤ 1000 mg/dL
Intralipid	≤ 2000 mg/dL
Biotine	≤ 164 nmol/L ou ≤ 40 ng/mL

# Elecsys Active B12

Substance	Concentration testée
Facteur rhumatoïde	≤ 1200 UI/mL
Sérumalbumine humaine	≤ 7 g/dL

Critère d'acceptabilité: Pour les concentrations comprises entre 3 et 8 pmol/L, la déviation est ≤ 0,8 pmol/L. Pour les concentrations entre > 8 et 100 pmol/L, la déviation est ≤ 10 %. Pour les concentrations > 100 pmol/L, la déviation est ≤ 15 %.

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

On n'a pas observé d'effet crochet jusqu'à des concentrations en holotranscobalamine de 1000 pmol/L.

#### Substances pharmaceutiques

L'influence de 16 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Aucune interférence n'a été observée.

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

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.

Les mutations ou les polymorphismes génétiques apparentés, périphériques ou même non apparentés au métabolisme de la vitamine B12 peuvent avoir une influence sur les résultats du test.<sup>10</sup> En particulier, des cas rapportés récemment ont montré que des modifications génétiques du gène de la transcobalamine (TCN2) peuvent avoir une influence sur les résultats de tests d'HoloTC et donner des taux d'HoloTC faussement bas.<sup>14, 15</sup>

#### Limites et intervalles

##### Domaine de mesure

3,0-150 pmol/L (défini par la Limite de Détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la Limite de Détection sont exprimés de la manière suivante: < 3,0 pmol/L. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante: > 150 pmol/L.

##### Limites inférieures de mesure

Limite du Blanc, Limite de Détection et Limite de Quantification

Limite du Blanc = 2,0 pmol/L

Limite de Détection = 3,0 pmol/L

Limite de Quantification = 5,0 pmol/L

La Limite du Blanc, la Limite de Détection et la Limite de Quantification ont été déterminées conformément aux exigences EP17-A2 du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

La Limite du Blanc correspond au 95<sup>ème</sup> centile d'au moins 60 déterminations d'échantillons exempts d'analyte dans plusieurs séries indépendantes. La Limite du Blanc correspond à la concentration au-dessous de laquelle on obtient des échantillons exempts d'analyte avec une probabilité de 95 %.

La Limite de Détection a été déterminée sur la base de la Limite du Blanc et la déviation standard des échantillons de faible concentration. La Limite de Détection correspond à la concentration en analyte la plus basse détectable (valeur située au-dessus de la limite du blanc avec une probabilité de 95 %).

La Limite de Quantification est définie comme étant la quantité la plus faible d'analyte dans l'échantillon pouvant être quantifiée exactement avec une imprécision acceptable totale ≤ 10 %.

#### Dilution

Les échantillons présentant une concentration en holotranscobalamine située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avec Diluent Universel 2. Rapport de dilution recommandé: 1/2 (dilution automatique sur les analyseurs ou manuelle). La concentration de l'échantillon dilué doit être ≥ 65 pmol/L.

Si la dilution est effectuée manuellement, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Si la dilution est effectuée par l'analyseur, le logiciel tient compte automatiquement de la dilution lors du calcul du résultat.

Remarque: une non linéarité échantillon-dépendante peut être observée pour les échantillons dilués présentant des concentrations en analyte situées au-dessus du domaine de mesure. Comme Diluent Universel 2 peut contenir de faibles quantités de vitamine B12, il est recommandé d'utiliser, pour les études de linéarité, un pool de sérum contenant connu pour son taux très faible d'analyte. Les échantillons dont les concentrations sont situées au-delà du domaine de mesure peuvent être dilués au 1/2 avec Diluent Universel 2. À ces concentrations, la vitamine B12 endogène est sans influence.

#### Valeurs de référence

Compte tenu de l'hétérogénéité des populations et des habitudes alimentaires, il est recommandé au laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales sur une période adéquate et à partir d'un nombre d'échantillons statistiquement significatif avant d'attribuer une signification clinique aux résultats.

Les valeurs indiquées ci-dessous ont été déterminées à l'aide du test Elecsys Active B12 sur des échantillons provenant d'une population apparemment en bonne santé. Le calcul est basé sur 214 échantillons de sérum (99 hommes, 115 femmes). Les sujets étaient âgés de 20 à 79 ans. Les échantillons de femmes enceintes ont été exclus. La population de référence a été sélectionnée avec des taux d'homocystéine normaux.

n	Médiane	Intervalle de concentrations (2,5 <sup>ème</sup> -97,5 <sup>ème</sup> centile)
	pmol/L	pmol/L
214	77,0	37,5-188

Ces valeurs sont données à titre d'orientation.

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

#### Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

#### Précision

La précision a été déterminée à l'aide de réactifs Elecsys, de pools de sérum humain et de contrôles, selon un protocole (EP05-A3) du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Chaque échantillon a été dosé en double dans 2 séries par jour pendant 21 jours (n = 84). Les résultats suivants ont été obtenus:

Analyseur cobas e 411					
Échantillon	Moyenne pmol/L	Répétabilité		Précision intermédiaire	
		SD pmol/L	CV %	SD pmol/L	CV %
Sérum humain 1	7,37	0,136	1,8	0,267	3,6
Sérum humain 2	26,9	0,414	1,5	1,02	3,8
Sérum humain 3	48,7	0,833	1,7	1,58	3,2
Sérum humain 4	70,1	1,32	1,9	2,25	3,2
Sérum humain 5	138	3,72	2,7	6,26	4,5
PC <sup>c)</sup> Active B12 1	33,9	0,640	1,9	1,35	4,0
PC Active B12 2	54,6	0,823	1,5	2,10	3,8

c) PC = PreciControl

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602					
Échantillon	Moyenne pmol/L	Répétabilité		Précision intermédiaire	
		SD pmol/L	CV %	SD pmol/L	CV %
Sérum humain 1	6,74	0,116	1,7	0,211	3,1
Sérum humain 2	27,5	0,329	1,2	0,775	2,8
Sérum humain 3	53,0	0,810	1,5	1,44	2,7
Sérum humain 4	73,1	0,807	1,1	1,71	2,3

# Elecsys Active B12

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602					
Échantillon	Moyenne pmol/L	Répétabilité		Précision intermédiaire	
		SD pmol/L	CV %	SD pmol/L	CV %
Sérum humain 5	140	2.17	1.6	4.47	3.2
PC Active B12 1	34.0	0.586	1.7	1.01	3.0
PC Active B12 2	58.9	0.775	1.3	1.52	2.6

## Comparaison de méthodes

Une comparaison du test Elecsys Active B12, [REF] 07713207190 (y) avec un test du commerce (x), effectuée sur des échantillons cliniques, a donné les corrélations suivantes (en pmol/L):

Nombre d'échantillons analysés: 289

Passing/Bablok<sup>16</sup> Régression pondérée de Deming  
 $y = 0.883x + 10.9$   $y = 0.963x + 8.59$   
 $r = 0.787$   $r = 0.937$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 7.3 et 119 pmol/L.

## Références bibliographiques

- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:345–354.
- Kozyraki R, Cases O. Vitamin B12 absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochi* 2013;95:1002–1007.
- Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen A. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Front Mol Biosci* 2016;27:3:27.
- Remacha AF, Sardà MP, Canals C, et al. Role of serum holotranscobalamin (holoTC) in the diagnosis of patients with low serum cobalamin. Comparison with methylmalonic acid and homocysteine. *Ann Hematol* 2014;93:565–569.
- European Food Safety Authority. Scientific opinion on dietary reference values for cobalamin (vitamin B12). *EFSA Journal* 2015;13:4150.
- Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94:359S–365S.
- Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med* 2013;368:149–160.
- Greibe E, Andreassen BH, Lildballe DL, et al. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1877–1882.
- Briani C, Dalla Torre C, Citton V, et al. Cobalamin deficiency: clinical picture and radiological findings. *Nutrients* 2013;5:4521–4539.
- Swart KMA, van Schoor NM, Lips P. Vitamin B12, folic acid, and bone. *Curr Osteoporos Rep* 2013;11:213–218.
- Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014;166:496–513.
- Valente E, Scott JM, Ueland P, et al. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011;57:856–863.
- Heil SG, de Jonge R, de Rotte MCFJ, et al. Screening for metabolic vitamin B12 deficiency by holotranscobalamin in patients suspected of vitamin B12 deficiency: a multicentre study. *Ann Clin Biochem* 2012;49:184–189.
- Sobczynska-Malefora A, Pangilinan F, Plant GT, et al. Association of a transcobalamin II genetic variant with falsely low results for the holotranscobalamin immunoassay. *Eur J Clin Invest* 2016;46:434–439.
- Keller P, Rufener J, Schild C, et al. False low holotranscobalamin levels in a patient with a novel TCN2 mutation. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1739–1743.

16 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783–790.

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

Dans cette fiche technique, le séparateur décimal pour partager la partie décimale de la partie entière d'un nombre décimal est un point. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

## Symboles

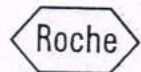
Roche Diagnostics utilise les signes et les symboles suivants en plus de ceux de la norme ISO 15223-1 (pour les USA: voir <https://usdiagnostics.roche.com> pour la définition des symboles utilisés):

	Contenu du coffret
	Analyseurs/appareils compatibles avec les réactifs
	Réactif
	Calibrateur
	Volume après reconstitution ou homogénéisation
	Code article international

Les ajouts, modifications ou suppressions sont signalés par une barre verticale dans la marge.  
 © 2017, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim  
[www.roche.com](http://www.roche.com)



# *Annexe. 6*



04481798 190

100

Elecsys 2010  
 MODULAR ANALYTICS E170  
 cobas e 411  
 cobas e 601  
 cobas e 602

Français

### Remarque

La concentration en AFP d'un échantillon de patient peut varier selon le test pratiqué. Le compte rendu du laboratoire doit donc toujours préciser la méthode de dosage d'AFP utilisée. Les taux d'AFP d'un patient obtenus à partir de différentes méthodes ne peuvent être comparés, ceci pouvant conduire à des erreurs d'interprétation médicale. En cas de changement de méthode au cours du suivi thérapeutique, les taux d'AFP doivent être confirmés pendant une période transitoire en effectuant des dosages en parallèle par les deux méthodes.

### Domaine d'utilisation:

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de l' $\alpha$ 1-fœtoprotéine dans le sérum et le plasma humains.

Ce test est une aide:

- pour le suivi thérapeutique de patients atteints de tumeurs germinales non-séminomateuses,
- pour l'évaluation du risque de trisomie 21 (Syndrome de Down) en association avec d'autres paramètres. Pour le diagnostic d'aberrations chromosomiques, le recours à d'autres analyses est nécessaire.

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

### Caractéristiques

L' $\alpha$ 1-fœtoprotéine est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 70000 daltons et de structure proche de l'albumine. Elle est synthétisée dans les cellules non différenciées du foie, dans le sac amniotique ainsi que dans le tractus gastro-intestinal du fœtus.<sup>1,2</sup>

70 à 95 % des patients atteints de carcinome hépatocellulaire présentent des taux élevés d'AFP.<sup>3</sup>

Plus le stade d'une tumeur germinale non séminomateuse est avancé, plus le taux d'AFP est élevé. La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et l'AFP sont des indicateurs importants de survie des patients atteints de tumeurs germinales non séminomateuses.<sup>4,5,6</sup>

Jusqu'à présent, aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux d'AFP et la taille de la tumeur, le stade d'évolution et le degré de gravité. Des taux très élevés d'AFP indiquent de manière générale un carcinome hépatocellulaire. En cas de métastases, les taux d'AFP sont généralement inférieurs à 350-400 UI/mL. On observe également une légère élévation du taux d'AFP en cas d'hépatite alcoolique, de cirrhose alcoolique du foie, d'hépatite virale aiguë et chez les porteurs de l'antigène HBs.<sup>7</sup>

Le dosage de l'AFP n'est pas une méthode de dépistage du cancer.

Des taux d'AFP élevés dans le sang de la mère ou le liquide amniotique pendant la grossesse peuvent indiquer un spina bifida, une anencéphalie, une atresie œsophagienne ou une grossesse multiple.<sup>8,9,10,11</sup>

Déterminée au cours du deuxième trimestre de la grossesse en association avec l'hCG $\beta$  et d'autres paramètres, comme l'âge gestationnel exact et le poids maternel, l'AFP contribue à l'évaluation du risque de trisomie 21. Dans les grossesses trisomiques, la concentration en AFP dans le sérum maternel est diminuée tandis que la concentration en hCG $\beta$  est approximativement deux fois plus élevée que la médiane des grossesses normales.<sup>12</sup> Le risque de trisomie 21 peut être calculé dans le deuxième trimestre de la grossesse au moyen d'un logiciel approprié (voir paragraphe « Matériel auxiliaire nécessaire ») en utilisant l'algorithme décrit par Wald<sup>13</sup> et les paramètres spécifiques respectifs.<sup>12,13,14,15,16,17,18</sup>

### Principe

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique: 18 minutes

- 1ère incubation: 10  $\mu$ L d'échantillon sont mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-AFP spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-AFP spécifique marqué au ruthénium.<sup>1)</sup> Il se forme un « sandwich ».
- 2ème incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

a) Re(III): Tris(2,2-bipyridyl)ruthénium(II)

### Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack réactif est étiqueté AFP.

- M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6.5 mL: microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL, conservateur
- R1 Ac anti-AFP-biotine (bouchon gris), 1 flacon contenant 10 mL: anticorps (monoclonal de souris) anti-AFP biotinylé 4.5 mg/L; tampon phosphate 100 mmol/L, pH 6.0; conservateur
- R2 Ac anti-AFP-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (bouchon noir), 1 flacon contenant 10 mL: anticorps (monoclonal de souris) anti-AFP marqué au ruthénium 12.0 mg/L; tampon phosphate 100 mmol/L, pH 6.0; conservateur

### Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

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

### Préparation des réactifs

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

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

### Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
après ouverture, entre 2 et 8 °C	12 semaines

Stabilité:	
sur Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 411 et cobas e 601	8 semaines
sur cobas e 602	4 semaines

**Prélèvement et préparation des échantillons**

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

Plasma recueilli sur héparinate de lithium, de sodium, EDTA tripotassique et citrate de sodium. En cas d'utilisation de citrate de sodium, les résultats obtenus doivent être corrigés de +10 %.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement entre 90 et 110 % de la valeur du sérum ou pente entre 0.9 et 1.1 + ordonnée à l'origine  $\pm 2 \times$  limite inférieure de détection (sensibilité analytique) + coefficient de corrélation  $> 0.95$ .

Stabilité: 7 jours entre 2 et 8 °C, 3 mois à -20 °C.<sup>19</sup>

L'applicabilité des échantillons de plasma pour l'estimation du risque de trisomie 21 n'a pas été évaluée.

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.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

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

**Matériel fourni**

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

**Matériel auxiliaire nécessaire**

- [REF] 04487761190, AFP CalSet II, pour 4 x 1 mL
  - [REF] 11776452122, PreciControl Tumor Marker, pour 2 x 3 mL de PreciControl Tumor Marker 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Tumor Marker 2
  - [REF] 11731416190, PreciControl Universal, pour 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Universal 2
  - [REF] 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL, diluant pour échantillon ou
  - [REF] 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL, diluant pour échantillon
  - Equipement habituel de laboratoire
  - Analyseur Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e
- Pour le calcul du risque de trisomie 21:

- Logiciel de calcul approprié, par ex. [REF] 05126193, SsdwLab (V5.0 ou suivantes), licence propriétaire [REF] 05195047, SsdwLab (V5.0 ou suivantes), licence multi-utilisateurs

- [REF] 03271749190, HCG+ $\beta$ , 100 tests

- [REF] 03302652190, HCG+ $\beta$  CalSet, pour 4 x 1 mL

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

- [REF] 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL, tampon système
- [REF] 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL, solution de lavage pour la cellule de mesure

- [REF] 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL, additif à la solution de lavage
  - [REF] 11933159001, Adaptateur pour SysClean
  - [REF] 11706802001, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
  - [REF] 11706799001, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 embouts de pipette
- Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:
- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L, tampon système
  - [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
  - [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
  - [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
  - [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
  - [REF] 03023150001, WasteLiner (sacs pour déchets)
  - [REF] 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean
- Pour tous les analyseurs:
- [REF] 11298500316, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL solution de lavage du système

**Réalisation du test**

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

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

Amener les réactifs réfrigérés à environ 20 °C et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

**Calibration**

Tracabilité: La méthode a été standardisée par rapport à la première préparation internationale: 1st IRP WHO référence 72/225.

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

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

- après 1 mois (28 jours) pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même flacon de réactif resté sur l'analyseur
- si nécessaire: par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies.

**Contrôle de qualité**

Pour le contrôle de qualité, utiliser PreciControl Tumor Marker ou PreciControl Universal.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

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

**Calcul des résultats**

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en UI/mL, ng/mL, kUI/L + en UI/L sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170 et cobas e 601.

Facteurs de conversion: UI/mL x 1.21 = ng/mL  
ng/mL x 0.83 = UI/mL

**Limites d'utilisation - interférences**

Le test n'est pas influencé par l'ictère (bilirubine < 1112 µmol/L ou < 65 mg/dL), l'hémolyse (Hb < 1.4 mmol/L ou < 2.2 g/dL), la lipémie (Intralipid < 1500 mg/dL) et la biotine < 246 nmol/L ou < 60 ng/mL.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement ± 10 % de la valeur initiale.

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

Le résultat n'est pas influencé par le facteur rhumatoïde jusqu'à une concentration de 1500 UI/mL.

On n'a pas observé d'effet crochet jusqu'à des concentrations en AFP de 1 million UI/mL (1.21 million ng/mL).

L'influence de 26 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro: Aucune interférence n'a été observée.

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

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

**Limites et intervalles**

**Domaine de mesure**

0.500-1000 UI/mL ou 0.605-1210 ng/mL (défini par la limite inférieure de détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la limite inférieure de détection sont exprimés de la manière suivante: < 0.500 UI/mL ou < 0.605 ng/mL. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante: > 1000 UI/mL (> 1210 ng/mL) ou jusqu'à 50000 UI/mL (60500 ng/mL) pour les échantillons dilués au 1/50.

**Limites inférieures de mesure**

**Limite inférieure de détection du test**

Limite inférieure de détection: 0.50 UI/mL (0.61 ng/mL)

La limite inférieure de détection correspond à la plus faible concentration mesurable en analyte pouvant être distinguée de zéro. Elle est obtenue par le calcul et représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2 écarts-type (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, répétabilité, n = 21).

**Dilution**

Les échantillons présentant une concentration en AFP située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avec Diluent Universel. Rapport de dilution recommandé: 1/50 (dilution manuelle ou automatique sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et cobas e). La concentration obtenue avec les échantillons dilués doit être > 20 UI/mL (> 24 ng/mL).

Si la dilution est effectuée manuellement, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Si la dilution est effectuée par l'analyseur, les logiciels des analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et cobas e tiennent compte de la dilution lors du calcul du résultat.

**Valeurs de référence**

Résultats d'études avec le test Elecsys AFP:

a) Etude multicentrique « Analyseur Elecsys 2010 », septembre 1997 et Evaluation des domaines de référence, réalisée en Allemagne et en France, septembre 1998.

Les taux d'AFP suivants ont été obtenus à partir d'échantillons de sérum provenant de 646 sujets sains:

≤ 5.8 UI/mL ou ≤ 7.0 ng/mL pour 95 % des résultats

Médianes des taux d'AFP en fonction des semaines de grossesse révolues à compter du premier jour de la dernière menstruation:

Semaines	14	15	16	17	18	19
n	382	1782	2386	975	353	146
UI/mL	23.2	25.6	30.0	33.5	40.1	45.5
ng/mL	27.9	30.9	36.1	40.4	48.3	54.8

b) Etude multicentrique pour établir des valeurs de référence en vue de l'évaluation du risque de trisomie 21 dans le sérum maternel (Etude BO1P019, mars 2003).

Les concentrations d'échantillons de sérum provenant de 1753 femmes enceintes (semaine de grossesse entre 14 et 18) ont été évaluées.

Des dosages avec le test Elecsys HCG+β et le test Elecsys AFP ont été effectués dans 5 centres hospitaliers de Belgique, de France et d'Allemagne.

L'âge gestationnel (en jours), déterminé par ultrason, était donné pour chaque échantillon. A partir d'une analyse de régression log-linéaire de toutes les valeurs d'AFP (1753) en fonction de l'âge gestationnel, les valeurs moyennes suivantes ont été calculées pour le milieu de la semaine respective (par ex. semaine 14 + 3 jours):

Semaines	14	15	16	17	18
UI/mL	20.9	24.0	27.6	31.7	36.4
ng/mL	25.3	29.0	33.3	38.3	44.0

Remarque: Pour le diagnostic prénatal, il est recommandé de réévaluer les valeurs moyennes périodiquement (tous les 1 à 3 ans), de même qu'à chaque changement de méthodologie.

La transférabilité des valeurs de référence sur les échantillons de plasma n'a pas été vérifiée.

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

**Performances analytiques**

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

**Précision**

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

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411								
Echantillon	Répétabilité					Précision intermédiaire		
	Médiane		SD		CV	SD		CV
	UI/mL	ng/mL	UI/mL	ng/mL	%	UI/mL	ng/mL	%
SH <sup>b)</sup> 1	12.8	15.5	0.26	0.31	2.0	0.39	0.47	3.1
SH 2	42.6	51.5	0.63	0.76	1.5	1.02	1.24	2.4
SH 3	566	685	11.2	13.5	2.0	15.6	18.9	2.8
PC TM <sup>c)</sup> 1	8.01	9.69	0.22	0.27	2.8	0.28	0.33	3.4
PC TM2	86.8	105.0	1.92	2.33	2.2	2.33	2.82	2.7

b) SH = Sérum humain

c) PC TM = PreciControl Tumor Marker

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602										
Echantillon	Répétabilité					Précision intermédiaire				
	Moyenne		SD		CV	Moyenne		SD		CV
	UI/mL	ng/mL	UI/mL	ng/mL	%	UI/mL	ng/mL	UI/mL	ng/mL	%
SH 1	14.8	17.8	0.27	0.33	1.8	14.1	17.0	0.53	0.64	3.8

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602										
Échantillon	Répétabilité					Précision intermédiaire				
	Moyenne		SD		CV	Moyenne		SD		CV
	UI/ mL	ng/ mL	UI/ mL	ng/ mL	%	UI/ mL	ng/ mL	UI/ mL	ng/ mL	%
SH 2	46.7	56.5	0.65	0.79	1.4	44.6	53.9	1.14	1.38	2.6
SH 3	745	901	11.7	14.2	1.6	711	860	23.4	28.3	3.3
PC TM1	9.35	11.3	0.21	0.25	2.2	9.1	11.0	0.26	0.31	2.8
PC TM2	104	126	2.49	3.01	2.4	103	125	2.54	3.07	2.5

#### Comparaison de méthodes

Une comparaison entre le test Elecsys AFP (y) et le test Enzymun-Test AFP (x), effectuée sur des échantillons cliniques, a donné les corrélations suivantes (en UI/mL):

Nombre d'échantillons analysés: 77

Passing/Bablok<sup>20</sup>

$$y = 0.92x - 1.51$$

$$r = 0.975$$

Régression linéaire

$$y = 0.90x + 0.35$$

$$r = 0.998$$

Les concentrations étaient situées entre environ 2 et 500 UI/mL (2.4 et 600 ng/mL).

#### Références bibliographiques

- 1 Taketa K. Alpha-Fetoprotein in the 1990s. In: Sell SS. Serological cancer markers. Humana Press 1992;31-46. ISBN: 0-89603-279-4.
- 2 Ruoslahti E, Engvall E, Kessler MJ. Chemical Properties of Alpha-Fetoprotein. In: Herberman RB, McIntire KR (eds). Immunodiagnosis of Cancer. New York: Marcel Dekker Inc 1979:101-117.
- 3 Ramsey WH, Wu GY. Hepatocellular carcinoma: update on diagnosis and treatment. Dig-Dis 1995;13,2:81-91.
- 4 Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. N Engl J Med 1993;328(25):1802-1806.
- 5 Klepp O. Serum tumor markers in testicular and extragonadal germ cell malignancies. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1991;206:28-41.
- 6 Sturgeon C. Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. Clin Chem 2002;48(8):1151-1159.
- 7 Stuart KE, Anand AJ, Jenkins RL. Hepatocellular Carcinoma in the United States. Cancer 1996;77,11:2217-2222.
- 8 Brewer JA, Tank ES. Yolk sac tumors and alpha-fetoprotein in first year of life. Urology 1993;42,1:79-80.
- 9 Wald NJ, Kennard A, Densem JW, et al. Antenatal maternal serum screening for Down's syndrome: results of a demonstration project. BMJ 1992;305:391-394.
- 10 Canick JA, Saller DN Jr. Maternal serum screening for aneuploidy and open fetal defects. Obstet Gynecol Clin North Am 1993;20,3:443-454.
- 11 Bendon RW. The anatomic basis of maternal serum screening. Ann Clin Lab Sci 1991;(21)1:36-39.
- 12 Schlebush H. Prenatal screening for Down's syndrome. In: Thomas L (ed.). Clinical Laboratory Diagnosis, TH-Books, Frankfurt, 1st English edition 1998:1124-1125, deutsche Auflage 1998:1149-1150.
- 13 Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. Br J Obstet Gynaecol 1987;94:387-402.
- 14 Reynolds TM, Penney MD. The mathematical basis of multivariate risk screening: with special reference to screening for Down's syndrome associated pregnancy. Ann Clin Biochem 1989;26:452-458.
- 15 Cuckle HS, Wald NJ, Nanchahal K, et al. Repeat maternal serum alpha-fetoprotein testing in antenatal screening programmes for Down's syndrome. Br J Obstet Gynaecol 1989;96:52-60.

- 16 Dunstan FDJ, Gray JC, Nix ABJ, et al. Detection rates and false positive rates for Down's Syndrome screening: How precisely can they be Estimated and what factors influence their value? Statistics Medicine 1997;16:1481-1495.
- 17 Lamson SH, Hook B. Comparison of Mathematical Models for the Maternal Age Dependence of Down's Syndrome Rates. Hum Genet Vol 1981;59:232-234.
- 18 Cuckle HS. Improved parameters for risk estimation in Down's syndrome screening. Prenat Diagn 1995;15:1057-1065.
- 19 Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. List of Analytes; Preanalytical Variables. Brochure in: Samples: From the Patient to the Laboratory. GIT-Verlag, Darmstadt 1996:10. ISBN 3-928865-22-6.
- 20 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

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

Dans cette fiche technique, le séparateur décimal pour partager la partie décimale de la partie entière d'un nombre décimal est un point. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

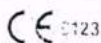
#### Symboles

Roche Diagnostics utilise les signes et les symboles suivants en plus de ceux de la norme ISO 15223-1.

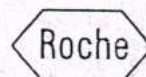
	Contenu du coffret
	Analyseurs/appareils compatibles avec les réactifs
	Réactif
	Calibrateur
	Volume après reconstitution ou homogénéisation

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

© 2012, Roche Diagnostics



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



# *Annexe.7*

# HCG+β

Gonadotrophine chorionique humaine intacte + sous-unité β

cobas®

RCF

Σ

SYSTEM

03271749 190

100

Elecsys 2010  
MODULAR ANALYTICS E170  
cobas e 411  
cobas e 601  
cobas e 602

## Français

### Remarque

La concentration en hCG d'un échantillon de patient peut varier selon le test pratiqué. Le compte rendu du laboratoire doit donc toujours préciser la méthode de dosage de l'hCG utilisée. Les taux d'hCG d'un patient obtenus à partir de différentes méthodes ne peuvent être comparés, ceci pouvant conduire à des erreurs d'interprétation médicale.

En cas de changement de méthode au cours du suivi thérapeutique, les taux d'hCG doivent être confirmés pendant une période transitoire en effectuant des dosages en parallèle par les deux méthodes.

### Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et de sa sous-unité β dans le sérum et le plasma humains.

Ce test est une aide:

- pour le dépistage précoce et la surveillance de la grossesse. Le test s'utilise également, en association avec d'autres paramètres, pour évaluer le risque de trisomie 21 (syndrome de Down). Pour le diagnostic d'aberrations chromosomiques, le recours à d'autres analyses est nécessaire.
- en oncologie, comme aide au suivi des patients présentant des maladies trophoblastiques. Le test est utile pour la détection et le suivi de cellules tumorales hCG sécrétantes d'origine ovarienne, placentaire et testiculaire.

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

### Caractéristiques

Referencés<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17</sup>

Comme la LH, la FSH et la TSH, l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) fait partie de la famille des glycoprotéines où l'holohormone est formée de 2 sous-unités (chaînes α et β). Les chaînes α de ces 4 hormones glycoprotéiques sont identiques, tandis que les chaînes β ont des structures différentes et sont responsables des fonctions hormonales spécifiques de chacune d'entre elles.

L'hCG est produite dans le placenta au cours de la grossesse. En dehors de la grossesse, la sécrétion d'hCG est le fait de tumeurs trophoblastiques ou de tumeurs germinales à composante trophoblastique. Certaines tumeurs non trophoblastiques peuvent sécréter également de l'hCG.

Plusieurs isoformes de même activité biologique mais de poids moléculaire différent forment la gonadotrophine chorionique. L'action biologique de l'hCG est de maintenir le corps jaune durant la grossesse. Elle influence également la production des stéroïdes. Le sérum de la femme enceinte contient principalement de l'hCG intacte.<sup>7</sup>

Les taux élevés sont une indication de choriocarcinome, de mole hydatiforme ou de grossesse multiple.

Les taux trop faibles peuvent être le signe d'un avortement spontané, d'une grossesse ectopique ou de mort in utero.

Déterminée au cours du deuxième trimestre de la grossesse en association avec l'AFP et d'autres paramètres, comme l'âge gestationnel exact et le poids maternel, l'hCG+β apporte une contribution dans l'évaluation du risque de trisomie 21. Dans les grossesses trisomiques, la concentration en AFP dans le sérum maternel est diminuée tandis que la concentration en hCG+β est approximativement deux fois plus élevée que la médiane des grossesses normales.<sup>8</sup> Le risque de trisomie 21 peut être calculé dans le deuxième trimestre de la grossesse au moyen d'un logiciel approprié (voir paragraphe « Matériel auxiliaire nécessaire ») en utilisant l'algorithme décrit par Wald<sup>10</sup> et les paramètres spécifiques respectifs du test.<sup>8,9,10,11,12,13,14,15</sup>

En dehors de la grossesse, des taux d'hCG augmentés ont été trouvés chez des patients présentant différents types de cancer (cancers des cellules germinales, de l'ovaire, de la vessie, du pancréas, cancers gastrique, pulmonaire, hépatique).<sup>5,6</sup>

La prévalence (en %) de l'augmentation des taux sériques d'hCG + β dans différents cancers est la suivante: choriocarcinome testiculaire ou placentaire (100), mole hydatiforme (97), tumeurs germinales testiculaires non séminomateuses (48-86), séminome (10-22), cancer pancréatique (adénocarcinome (11-80), tumeurs insulaires (22-50)), cancer gastrique (0-52), cancer ovarien, épithélial (18-41), cancer du côlon (0-37), cancer pulmonaire (0-36), cancer mammaire (7-25), hépatome, cancer hépatique (17-21), tumeurs de l'intestin grêle (13) et cancer du rein (10).<sup>15,16</sup>

Les tests pour la détection de l'hCG intacte et de sa sous-unité libre β sont des marqueurs tumoraux bien établis dans le suivi des patients présentant des tumeurs trophoblastiques et, en association avec l'AFP, celui des patients présentant des tumeurs testiculaires non séminomateuses.<sup>17</sup>

Les anticorps monoclonaux spécifiques utilisés dans le test Elecsys HCG+β reconnaissent l'holo-hCG, des formes clivées (nicked hCG), le fragment β-core et la sous-unité β libre. Les anticorps biotinylés et les anticorps marqués au ruthénium utilisés sont dirigés contre différents épitopes de la molécule d'hCG.

### Principe

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique: 18 minutes

- 1<sup>ère</sup> incubation: 10 µL d'échantillon sont mis en présence d'anticorps monoclonaux anti-hCG biotinylés et d'un anticorps monoclonal anti-hCG marqué au ruthénium.<sup>a)</sup> Il se forme un « sandwich ».
- 2<sup>ème</sup> incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

a) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

### Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack réactif est étiqueté HCG-BETA.

- M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6.5 mL:  
Microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL, conservateur
- R1 Ac anti-hCG-biotine, 1 flacon contenant 9 mL (bouchon gris):  
Anticorps monoclonal (de souris) anti-hCG biotinylé 2.6 mg/L; tampon phosphate 40 mmol/L, pH 7.5; conservateur
- R2 Ac anti-hCG-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, 1 flacon contenant 10 mL (bouchon noir):  
Anticorps monoclonal (de souris) anti-hCG marqué au ruthénium 4.6 mg/L; tampon phosphate 40 mmol/L, pH 6.5; conservateur

### Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

# HCG+β

Gonadotrophine chorionique humaine intacte + sous-unité β

cobas®

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

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

### Préparation des réactifs

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

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

### Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
après ouverture, entre 2 et 8 °C	12 semaines
sur les analyseurs	4 semaines

### Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

Plasma recueilli sur héparinate de lithium, de sodium, d'ammonium, EDTA disodique, EDTA tripotassique, citrate de sodium et fluorure de sodium/oxalate de potassium.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement entre 90 et 110 % de la valeur du sérum ou pente entre 0.9 et 1.1 + coefficient de corrélation > 0.95 (Pearson).

Stabilité: 3 jours entre 2 et 8 °C, 12 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.

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.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

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

### Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

### Matériel auxiliaire nécessaire

- REF 03302652190, HCG+β CalSet, pour 4 x 1 mL
- REF 11731416190, PreciControl Universal, pour 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Universal 2
- REF 11776452122, PreciControl Tumor Marker, pour 2 x 3 mL de PreciControl Tumor Marker 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Tumor Marker 2

- REF 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL, diluant pour échantillon ou
  - REF 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL, diluant pour échantillon
  - Équipement habituel de laboratoire
  - Analyseur Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e
- Pour le calcul du risque de trisomie 21:

- Logiciel de calcul approprié, par ex.
    - REF 05126193, SsdwLab (V5.0 ou suivantes), licence propriétaire
    - REF 05195047, SsdwLab (V5.0 ou suivantes), licence multiutilisateurs
  - REF 04481798190, AFP, 100 tests
  - REF 04491742190, AFP, 200 tests
  - REF 04497761190, AFP CalSet II, pour 4 x 1 mL
- Matériel auxiliaire pour les analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411:

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

Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:

- REF 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L, tampon système
  - REF 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
  - REF 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
  - REF 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
  - REF 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL, solution de lavage avant la détection
  - REF 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
  - REF 030231500G1, WasteLiner (sacs pour déchets)
  - REF 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean
- Pour tous les analyseurs:
- REF 11298500316, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL solution de lavage du système

### Réalisation du test

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

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

Analyseurs: MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602. L'utilisation de la solution PreClean M est nécessaire.

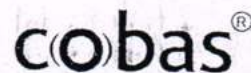
Amener les réactifs réfrigérés à env. 20 °C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

### Calibration

Traçabilité: La méthode a été standardisée par rapport à la 4<sup>ème</sup> préparation internationale de référence n°75/589 pour la gonadotrophine chorionique du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control).

# HCG+β

Gonadotrophine chorionique humaine intacte + sous-unité β



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

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

- après 1 mois (28 jours) pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même flacon de réactif resté sur l'analyseur
- si nécessaire: par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies.

### Contrôle de qualité

Pour le contrôle de qualité, utiliser PreciControl Universal ou PreciControl Tumor Marker.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

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

### Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en mUI/mL ou en UI/L.

### Limites d'utilisation - interférences

Le test n'est pas influencé par l'ictère (bilirubine < 410 μmol/L ou < 24 mg/dL), l'hémolyse (Hb < 0.621 mmol/L ou < 1.0 g/dL), la lipémie (Intralipid < 1400 mg/dL) et la biotine < 327 nmol/L ou < 80 ng/mL.

**Critère d'acceptabilité:** Recouvrement ± 10 % de la valeur initiale.

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

Le résultat n'est pas influencé par le facteur rhumatoïde jusqu'à 3400 UI/mL. Le dosage peut être réalisé sur les échantillons de patients dialysés.

On n'a pas observé d'effet crochet jusqu'à 750000 mUI d'hCG/mL.

L'influence de 15 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Aucune interférence n'a été observée.

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

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

### Limites et intervalles

#### Domaine de mesure

0.100-10000 mUI/mL (défini par la limite inférieure de détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la limite inférieure de détection sont exprimés de la manière suivante: < 0.100 mUI/mL. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante: > 10000 mUI/mL (ou jusqu'à 1000000 mUI/mL pour les échantillons dilués (1/100)).

#### Limites inférieures de mesure

**Limite inférieure de détection du test**

Limite inférieure de détection: < 0.1 mUI/mL

La limite inférieure de détection correspond à la plus faible concentration mesurable en analyte pouvant être distinguée de zéro. Elle est obtenue par le calcul et représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2 écarts-type (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, répétabilité, n = 21).

### Dilution

Les échantillons présentant une concentration en hCG située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avec Diluent Universel. Rapport de dilution recommandé: 1/100 (dilution manuelle ou automatique sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 ou cobas e). La concentration de l'échantillon dilué doit être > 100 mUI/mL.

Si la dilution est effectuée manuellement, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Si la dilution est effectuée par l'analyseur, les logiciels des analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et cobas e tiennent compte de la dilution lors du calcul du résultat.

### Valeurs de référence

Résultats d'une étude multicentrique réalisée avec le test HCG+β (REF 03271749) dans des centres hospitaliers de Belgique, de France et d'Allemagne (étude BO1P019, mars 2003):

#### Echantillons sériques de sujets sains:

- hCG ≤ 1 mUI/mL pour 181 femmes saines préménopausées, non enceintes (97.5 % des résultats) La limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 % correspondant se situe à 5.3 mUI/mL.
- hCG ≤ 7 mUI/mL pour 143 femmes saines postménopausées (97.5 % des résultats) La limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 % correspondant se situe à 8.3 mUI/mL.
- < 2 mUI d'hCG/mL pour 290 hommes (97.5 % des résultats). La limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 % correspondant se situe à 2.6 mUI/mL.
- Les taux indiqués dans le tableau suivant ont été déterminés à différentes semaines de la grossesse à compter du premier jour de la dernière menstruation (semaines d'aménorrhée = SA).

Les résultats sont uniquement indiqués pour les semaines de grossesse où le nombre de cas (n) était supérieur à 10.

SA	n	hCG mUI/mL	
		Médiane	5-95 <sup>ème</sup> percentile
3	25	17.5	5.8-71.2
4	43	141	9.5-750
5	23	1398	217-7138
6	19	3339	158-31795
7	13	39759	3697-163563
8	23	90084	32065-149571
9	23	106257	63803-151410
10	20	85172	46509-186977
12	17	66676	27832-210612
14*	67	34440	13950-62530
15*	666	28962	12039-70971
16*	766	23930	9040-56451
17*	190	20860	8175-55868
18*	64	19817	8099-58176

\* Pour les semaines 14 à 18, période intéressante pour l'évaluation du risque de trisomie 21, les taux sériques de 1753 femmes enceintes ont été évalués avec Elecsys HCG+β et Elecsys AFP dans 5 centres hospitaliers.

L'âge, le poids maternel et l'âge gestationnel étaient précisés pour chaque échantillon.

Les résultats ont été analysés pour la distribution normale des valeurs log MdM (Multiple of Median). L'écart-type des valeurs MdM est comparable à celui publié dans la littérature.

Les valeurs médianes et les 5<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles ont été calculés pour les semaines de grossesse révolues (voir tableau ci-dessus).

**Distribution des taux mesurés chez des sujets sains et des sujets présentant des affections bénignes et malignes avec Elecsys HCG+β:**

Les taux des sujets présentant des affections bénignes et malignes sont les résultats de déterminations effectuées avec le test HCG+β (REF 03271749) et le test: HCG+β (REF 11973193).

# HCG+β

Gonadotrophine chorionique humaine intacte + sous-unité β



Concentration mUI/mL	n	Pourcentage (%)				
		≤ 2	> 2 - ≤ 7	> 7 - ≤ 100	> 100	> 1000
Sujets sains	614					
Hommes	290	97.9	2.1	0	0	0
Femmes préménopause	181	98.9	1.1	0	0	0
Femmes postménopause	143	53.1	46.2	0.7	0	0
Affection maligne	839					
Choriocarcinome	64	10.9	10.9	21.9	10.9	45.3
Séminome	29	89.7	3.4	6.9	0	0
Tumeur germinale	109	78.0	3.7	0.9	5.5	11.9
Tumeur sac vitellin	45	20.0	6.7	22.2	8.9	42.2
Cancer ovarien	38	76.3	18.4	5.3	0	0
Maladies trophoblastiques	169	19.5	10.7	29.6	20.1	20.1
Mole	72	1.4	4.2	26.4	27.8	40.3
Autres	313	52.7	13.1	8.6	11.8	13.7

Remarque: Pour le diagnostic prénatal, il est recommandé de réévaluer les valeurs moyennes périodiquement (tous les 1 à 3 ans), de même qu'à chaque changement de méthodologie.

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

### Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

### Précision

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

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
Echantillon	Moyenne mUI/mL	Répétabilité		Précision intermédiaire	
		SD mUI/mL	CV %	SD mUI/mL	CV %
Sérum humain 1	4.81	0.21	4.4	0.22	4.6
Sérum humain 2	880	11.7	1.3	22.9	2.6
Sérum humain 3	7949	132	1.7	249	3.1
PreciControl U <sup>b)</sup> 1	9.14	0.19	2.1	0.24	2.6
PreciControl U2	24.0	0.96	4.0	1.11	4.6
PreciControl TM <sup>c)</sup> 1	25.7	0.63	2.4	0.82	3.2
PreciControl TM2	2365	37.0	1.6	62.8	2.7

b) U = Universel

c) TM = Tumor Marker

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602						
Echantillon	Répétabilité			Précision intermédiaire		
	Moyenne mUI/mL	SD mUI/mL	CV %	Moyenne mUI/mL	SD mUI/mL	CV %
Sérum humain 1	8.52	0.24	2.8	4.73	0.35	7.4
Sérum humain 2	796	13.6	1.7	899	29.4	3.3
Sérum humain 3	7012	188	2.7	8082	344	4.3
PreciControl U1	7.20	0.18	2.5	8.49	0.29	3.4
PreciControl U2	19.6	0.55	2.8	22.5	1.05	4.6
PreciControl TM1	21.4	0.39	1.8	24.2	1.11	4.6
PreciControl TM2	2012	47.0	2.3	2316	84.2	3.6

### Comparaison de méthodes

Une comparaison du test Elecsys HCG+β (y) avec le test Elecsys HCG STAT (x), effectuée à partir d'échantillons de sérum humain, a donné les corrélations suivantes:

Nombre d'échantillons analysés: 81

• Passing/Bablok <sup>19</sup>	Régression linéaire
y = 1.00x + 7.40	y = 0.95x + 53.4
r = 0.986	r = 0.999

Les concentrations des échantillons étaient situées entre env. 3 et 8550 mUI/mL.

### Spécificité analytique

Les anticorps monoclonaux utilisés présentent les réactions croisées suivantes:

TSH: non détectable, LH: 0.12 %, FSH: < 0.1 %.

### Sensibilité fonctionnelle

< 0.6 mUI/mL

La sensibilité fonctionnelle est définie comme étant la concentration en analyte la plus basse, mesurable de manière reproductible et donnant un CV inter-séries de 20 %.

### Références bibliographiques

- 1 Thomas CMG, Reijnders FJL, Segers MFG, et al. Human Chorionic Gonadotropin (HCG): Comparisons between Determinations of Intact HCG, Free HCG β-Subunit, and "Total" HCG + β in Serum during the First Half of High-Risk Pregnancy. *Clinical Chemistry* 1990;36(4):651-655.
- 2 Hoermann R, Berger P, Spoettl G, et al. Immunological Recognition and Clinical Significance of Nicked Human Chorionic Gonadotropin in Testicular Cancer. *Clin Chem* 1994;40(12):2306-2312.
- 3 Schwarz S, Berger P, Wick G. The Antigenic Surface of Human Chorionic Gonadotropin as Mapped by Murine Monoclonal Antibodies. *Endocrinology* 1986;118(1):189-197.
- 4 Runnebaum B, Rabe T. *Gynäkologische Endokrinologie, Grundlagen, Physiologie, Pathologie, Prophylaxe, Diagnostik, Therapie*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer Verlag, 1987;3:43,489-541.
- 5 Sturgeon CM, McAllister EJ. Analysis of hCG: clinical applications and assay requirements. *Ann Clin Biochem* 1998;35:460-491.
- 6 Marcillac I, Troalen F, Bidart JM, et al. Free Human Chorionic Gonadotropin β Subunit in Gonadal and Nongonadal Neoplasms. *Cancer Res* 1992;52:3901-3907.
- 7 Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997;43(12):2233-2243.
- 8 Schlebusch H. Prenatal screening for Down's syndrome. In: Thomas L (ed.). *Clinical Laboratory Diagnosis*, TH-Books, Frankfurt, 1st English edition 1998:1124-1125, deutsche Auflage 1998:1149-1150.
- 9 Reynolds TM, Penney MD. The mathematical basis of multivariate risk screening: with special reference to screening for Down's syndrome associated pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1989;26:452-458.

# HCG+β

Gonadotrophine chorionique humaine intacte + sous-unité β

cobas®






- 10 Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:387-402.
- 11 Cuckle HS, Wald NJ, Nanchahal K, et al. Repeat maternal serum alpha-fetoprotein testing in antenatal screening programmes for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:52-60.
- 12 Dunstan FDJ, Gray JC, Nix ABJ, et al. Detection rates and false positive rates for Down's Syndrome screening: How precisely can they be estimated and what factors influence their value? *Statistics Medicine* 1997;16:1481-1495.
- 13 Lamson SH, Hook B. Comparison of Mathematical Models for the Maternal Age Dependence of Down's Syndrome Rates. *Hum Genet Vol* 1981;59:232-234.
- 14 Cuckle HS. Improved parameters for risk estimation in Down's syndrome screening. *Prenat Diagn* 1995;15:1057-1065.
- 15 Thomas L. Human chorionic gonadotropin (hCG). In: Thomas L (ed.). *Clinical Laboratory Diagnosis*, TH-Books, Frankfurt, 1st English edition 1998:1119-1121, deutsche Auflage 1998:1144-1146.
- 16 Mann K, Hörmann R. hCG (human chorionic gonadotropin). In: Thomas L (ed.). *Clinical Laboratory Diagnosis*, TH-Books, Frankfurt, 1st English edition 1998:971-976, deutsche Auflage 1998:992-997.
- 17 Sturgeon C. Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. *Clin Chem* 2002;48(8):1151-1159.
- 18 Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. List of Analytes; Preanalytical Variables. Brochure in: *Samples: From the Patient to the Laboratory*. GIT-Verlag, Darmstadt 1996:16. ISBN 3-928865-22-6.
- 19 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

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

Dans cette fiche technique, le séparateur décimal pour partager la partie décimale de la partie entière d'un nombre décimal est un point. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

## Symboles

Roche Diagnostics utilise les signes et les symboles suivants en plus de ceux de la norme ISO 15223-1.

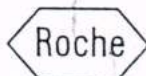
	Contenu du coffret
	Analyseurs/appareils compatibles avec les réactifs
	Réactif
	Calibrateur
	Volume après reconstitution ou homogénéisation

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

© 2013, Roche Diagnostics

CE 0123

Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-66305 Mannheim  
www.roche.com



# *Annexe. 8*

# Estradiol II

Estradiol - E2

cobas®

REF	Σ		SYSTEM
03000079 190	100		Elecsys 2010 MODULAR ANALYTICS E170 cobas e 411 cobas e 601 cobas e 602

## Français

### Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de l'estradiol dans le sérum et le plasma humains.

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

### Caractéristiques

Les estrogènes jouent un rôle important dans le développement des caractères sexuels femelles. Ils contrôlent, avec les progestatifs, tous les processus importants de la reproduction chez la femme.

L'estrogène biologiquement le plus actif est le 17β-estradiol. Il s'agit d'une hormone stéroïdienne d'un poids moléculaire de 272 daltons.

Les estrogènes sont principalement synthétisés dans l'ovaire (follicule, corps jaune), mais également en faible quantité dans les cellules interstitielles de Leydig des testicules. Lors de la grossesse, les estrogènes sont principalement synthétisés dans le placenta. Environ 98 % de l'estradiol est lié à des protéines de transport (SHBG = sex hormone-binding globulin).<sup>1</sup>

Au cours du cycle menstruel, la sécrétion d'estrogènes se fait en deux phases. Le dosage de l'estradiol est utilisé pour déterminer les causes des troubles de la fertilité au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope, en cas de gynécomastie, de tumeurs de l'ovaire ou des testicules produisant des estrogènes et en cas d'hyperplasie du cortex. Il est également utile pour le suivi de traitements de l'infertilité féminine et pour déterminer le moment de l'ovulation dans le cadre d'une fécondation in vitro (FIV).<sup>2,3,4</sup>

Le test Elecsys Estradiol II fait appel au principe de compétition en utilisant un anticorps polyclonal spécifique dirigé contre le 17β-estradiol. L'estradiol endogène, libéré de l'échantillon sous l'action de la mestérolone, entre en compétition avec l'estradiol exogène marqué au ruthénium<sup>a)</sup> pour les sites de liaison de l'anticorps biotinylé.

a) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

### Principe

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

- 1ère incubation: 35 µL d'échantillon sont incubés avec un anticorps anti-estradiol spécifique biotinylé. Il se forme un complexe immun en relation avec la concentration en estradiol contenue dans l'échantillon.
- 2ème incubation: un dérivé d'estradiol marqué au ruthénium est ajouté dans la cuvette réactionnelle avec les microparticules tapissées de streptavidine et vient se fixer sur les sites encore disponibles de l'anticorps biotinylé avec formation d'un complexe anticorps-haptène. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

### Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack réactif est étiqueté E2 II.

- M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6.5 mL:  
 Microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL, conservateur

- R1 Ac anti-estradiol-biotine, 1 flacon contenant 8 mL (bouchon gris): anticorps polyclonal (de lapin) anti-estradiol biotinylé 45 ng/mL; mestérolone 130 ng/mL; tampon MES 50 mmol/L, pH 6.0; conservateur
- R2 Peptide-estradiol-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, 1 flacon contenant 8 mL (bouchon noir): dérivé d'estradiol marqué au ruthénium 2.75 µg/mL; tampon MES 50 mmol/L, pH 6.0; conservateur

### Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

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

### Préparation des réactifs

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

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

### Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
après ouverture, entre 2 et 8 °C	56 jours (8 semaines)
sur les analyseurs	56 jours (8 semaines)

### Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

Plasma recueilli sur héparinate de lithium, EDTA dipotassique, EDTA tripotassique ou sur tubes de prélèvement contenant un gel séparateur de plasma.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement entre 70 et 130 % de la valeur sérique > 100 pg/mL, recouvrement ± 20 pg/mL de la valeur sérique ≤ 100 pg/mL et pente 0.91.1 + ordonnée à l'origine < ± 2x la limite inférieure de détection (sensibilité analytique) + coefficient de corrélation > 0.95.

Stabilité: 2 jours entre 2 et 8 °C, 6 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.<sup>5</sup>

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.

# Estradiol II

Estradiol - E2

cobas®

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

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

## Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

## Matériel auxiliaire nécessaire

- [REF] 03064921122, Estradiol II CalSet II, pour 4 x 1 mL
- [REF] 11731416190, PreciControl Universal, pour 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Universal 2
- [REF] 11731416160, PreciControl Universal, pour 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Universal 2 (pour les USA)
- [REF] 03009987190, Diluent MultiAssay, 2 x 16 mL, diluant pour échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- Analyseur Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e

## Matériel auxiliaire pour les analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411:

- [REF] 11562988122, ProCell, 6 x 380 mL, tampon système
- [REF] 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL, additif à la solution de lavage
- [REF] 11933159001, Adaptateur pour SysClean
- [REF] 11706802001, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
- [REF] 11706799001, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 embouts de pipette

## Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:

- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L, tampon système
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
- [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 godets pour la thermorégulation de ProCell M et CleanCell M avant emploi
- [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL, solution de lavage de l'aiguille en fin de série et entre les changements de réactifs
- [REF] 03004890190, Elecsys SysClean, 5 x 600 mL solution de lavage du système
- [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimazine M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
- [REF] 03023150001, WasteLiner (sacs pour déchets)
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean

## Pour tous les analyseurs:

- [REF] 11293500316, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL solution de lavage du système
- [REF] 11298500160, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL, solution de lavage du système (pour les USA)

## Réalisation du test

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

L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les paramètres spécifiques du test mémorisés dans le code-barres doivent être saisis. Si, exceptionnellement, le code-barres ne

peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série des 15 chiffres inscrits sur l'étiquette.

Analyseurs: MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602. L'utilisation de la solution PreClean M est nécessaire.

Amener les réactifs réfrigérés à env. 20 °C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

## Calibration

Traçabilité: La méthode a été standardisée par rapport à la DI-CG-SM (dilution isotopique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et révélée en spectrométrie de masse).<sup>6</sup>

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

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

- après 1 mois (28 jours) pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même flacon de réactif resté sur l'analyseur
- si nécessaire: par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies.

## Contrôle de qualité

Utiliser PreciControl Universal.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coil et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

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

## Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en pmol/L, pg/mL, ng/L et en nmol/L sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602.

## Facteurs de conversion:

$$\text{pmol/L} \times 0.273 = \text{pg/mL (ng/L)}$$

$$\text{pg/mL} \times 3.67 = \text{pmol/L}$$

## Limites d'utilisation - interférences

Le test n'est pas influencé par l'ictère (bilirubine < 1129 µmol/L ou < 66 mg/dL), l'hémolyse (Hb < 0.621 mmol/L ou < 1.0 g/dL), la lipémie (Intralipid < 1000 mg/dL) et la biotine < 147 nmol/L ou < 36 ng/mL.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement ± 10 % de la valeur initiale.

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

Le résultat n'est pas influencé par le facteur rhumatoïde jusqu'à une concentration de 1200 UI/mL.

L'influence de 18 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Aucune interférence n'a été observée.

Chez les patients ayant reçu des vaccins contenant du sérum de lapin ou possédant un lapin d'appartement, les résultats du test peuvent être erronés.

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

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

référer au  
manuel aux résultats

# Estradiol II

Estradiol - E2

cobas®

## Limites et intervalles

### Domaine de mesure

18.4-15781 pmol/L ou 5.00-4300 pg/mL (défini par la limite inférieure de détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la limite inférieure de détection sont exprimés de la manière suivante: < 18.4 pmol/L ou < 5.00 pg/mL. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante: > 15781 pmol/L ou > 4300 pg/mL (jusqu'à 78905 pmol/L ou 21500 pg/mL pour les échantillons dilués 1/5).

### Limites inférieures de mesure

#### Limite inférieure de détection du test

Limite inférieure de détection: 18.4 pmol/L (5.00 pg/mL)

La limite inférieure de détection correspond à la plus faible concentration en analyte pouvant être distinguée de zéro. Elle est obtenue par le calcul et représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2 écarts-type (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, répétabilité, n = 21).

### Dilution

Les échantillons présentant une concentration en estradiol située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués à l'aide de Diluent MultiAssay. Rapport de dilution recommandé: 1/5 (dilution manuelle ou automatique sur les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 ou cobas e). La concentration de l'échantillon dilué doit être > 1835 pmol/L (> 500 pg/mL).

Si la dilution est effectuée par l'analyseur, les logiciels des analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 et cobas e tiennent compte de la dilution lors du calcul du résultat.

La concentration en analyte du diluant (< 220 pmol/L ou < 60.0 pg/mL) n'est pas prise en compte pour les dilutions situées au-delà du domaine de mesure.

### Valeurs de référence

Des études effectuées avec le test Elecsys Estradiol II dans 4 centres hospitaliers (Allemagne, Autriche) sur un total de 520 échantillons de sujets sains ont permis d'établir les valeurs de référence suivantes (études No. B00P023 et C00P032, décembre 2001):

Sujets testés	n	Percentiles			
		50 <sup>ème</sup>		5-95 <sup>ème</sup>	
		pmol/L	pg/mL	pmol/L	pg/mL
Hommes	109	76.2	28.0-156	20.8	7.63-42.6
Femmes					
• Phase folliculaire	88	228	46.0-607	62.2	12.5-166
• Phase ovulatoire	49	812	315-1828	221	85.8-498
• Phase lutéale	83	389	161-774	106	43.8-211
• Postménopause	32	44.0	< 18.4-201*	12.0	< 5.00-54.7*
Grossesse					
• 1 <sup>er</sup> trimestre	20	3685	789-> 15781	1004	215-> 4300
Enfants (1 à 10 ans):					
• Garçons	74	40.4	< 18.4-73.4*	11.0	< 5.00-20.0*
• Filles	65	47.7	22.0-99.1	13.0	6.00-27.0

\*18.4 pmol/L (5.00 pg/mL) est la limite inférieure de détection du test.

Informations détaillées sur demande et dans le dossier Product Information Elecsys Estradiol II.

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

### Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

### Précision

La précision a été déterminée à l'aide de réactifs Elecsys, de pools de sérum humain et de contrôles, selon un protocole (EP5-A2) du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Chaque échantillon a été dosé

en double dans 2 séries par jour pendant 21 jours (n = 84). Les résultats suivants ont été obtenus:

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411								
Echantillon	Moyenne		Répétabilité			Précision intermédiaire		
	pmol/L	pg/mL	SD	CV	SD	CV	SD	CV
SH <sup>b)</sup> 1	149	40.6	6.37	1.74	4.3	14.8	4.02	9.9
SH 2	334	91.1	8.03	2.19	2.4	19.4	5.29	5.8
SH 3	3337	909	125	34.0	3.7	143	39.0	4.3
SH 4	10639	2899	341	93.0	3.2	651	177	6.1
SH 5	13785	3756	631	172	4.6	874	238	6.3
PC U <sup>c)</sup> 1	345	94.1	14.1	3.84	4.1	24.4	6.66	7.1
PC U2	2026	552	83.5	22.8	4.1	99.6	27.1	4.9

b) SH = Sérum humain

c) PC U = ProControl Universal

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602								
Echantillon	Moyenne		Répétabilité			Précision intermédiaire		
	pmol/L	pg/mL	SD	CV	SD	CV	SD	CV
SH 1	143	39.1	8.71	2.37	6.1	10.0	2.73	7.0
SH 2	282	79.6	10.1	2.75	3.5	13.1	3.58	4.5
SH 3	3220	878	41.7	11.4	1.3	61.5	16.8	1.9
SH 4	10309	2809	221	60.2	2.1	294	80.0	2.8
SH 5	13261	3804	333	90.7	2.4	522	142	3.7
PC U1	378	103	9.87	2.69	2.6	14.2	3.88	3.8
PC U2	2037	555	38.2	10.4	1.9	42.6	11.6	2.1

### Comparaison de méthodes

Comparaison des résultats obtenus pour 34 échantillons déterminés avec le test Elecsys Estradiol II (y) et par DI-CG-SM (x) (en pg/mL):

Passing/Bablok<sup>7</sup>

$$y = 0.98x + 4.15$$

$$r = 0.989$$

Régression linéaire

$$y = 0.921x + 28.1$$

$$r = 0.996$$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre env. 14.1 et 11667 pmol/L (env. 3.83 et 3179 pg/mL).

### Spécificité analytique

Les anticorps monoclonaux utilisés pour le test Estradiol II présentent les réactions croisées suivantes (en %):

a) Substance rajoutée à raison de 0.1 µg/mL:

Aldostérone	0.005
Androsténone	0.007
Equiline	0.071
Estriol	0.218
Estrone	0.811
Estrone-3β-glucuronide	0.002
Estrone-3-sulfate	0.006
Ethistérone	0.005
Acétate de norethindrone	0.014
Prégnénone	0.003
Progestérone	0.001

# *Annexe.9*

# Progesterone II

Progesterone

cobas®

REF

12145383 122



100

SYSTEM

Elecsys 2010  
 MODULAR ANALYTICS E170  
 cobas e 411  
 cobas e 601  
 cobas e 602

## Français

### Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de la progesterone dans le sérum et le plasma humains.

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

### Caractéristiques

La progesterone est une hormone stéroïdienne d'un poids moléculaire d'environ 314.5 daltons. La progesterone est synthétisée essentiellement dans le corps jaune et le placenta.

Le taux de progesterone est en corrélation avec le développement et la dégradation du corps jaune. A peine détectable dans la phase folliculaire du cycle menstruel, le taux de progesterone augmente le jour qui précède l'ovulation pour voir sa synthèse s'accroître pendant la phase lutéale. Au cours de la deuxième partie du cycle, le prégnandiol, produit principal de sa dégradation, est excrété dans l'urine.<sup>1</sup>

La progesterone provoque une transformation glandulaire dans la muqueuse utérine (phase de sécrétion) et prépare ainsi la nidation intra-utérine éventuelle d'un œuf fécondé. Lors de la grossesse, la progesterone empêche la contraction du muscle utérin. Elle stimule, conjointement avec les œstrogènes, le développement des seins et la capacité de sécrétion des alvéoles mammaires.<sup>1,2</sup>

Le dosage de la progesterone est utilisé dans le bilan de fertilité pour déterminer la période de l'ovulation et la phase lutéale.<sup>2,3</sup>

### Principe

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

- 1ère incubation: 30 µL d'échantillon sont mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-progesterone biotinylé et d'un peptide progesterone marqué au ruthénium<sup>a)</sup>, et incubés avec le danazol pour libérer la progesterone. La progesterone endogène et la progesterone exogène entrent en compétition vis à vis des sites de liaison de l'anticorps.
- 2ème incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine. La quantité de progesterone fixée à la phase solide est inversement proportionnelle à la concentration en progesterone dans l'échantillon.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell ou ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

a) (Ru(bpy)<sub>3</sub>)<sup>2+</sup>: Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

### Réactifs - composition et concentrations

Le rackpack réactif est étiqueté PROG II.

- M Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon (bouchon transparent), 6.5 mL:  
 Microparticules tapissées de streptavidine 0.72 mg/mL, conservateur
- R1 Ac anti-progesterone-biotine, 1 flacon (bouchon gris), 10 mL:  
 Anticorps monoclonal (de souris) anti-progesterone biotinylé 0.15 mg/L; tampon phosphate 25 mmol/L, pH 7.0; conservateur

R2 Peptide progesterone-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, 1 flacon (bouchon noir), 8 mL:

Peptide-progesterone synthétique marqué au ruthénium et couplé à de la progesterone végétale 10 ng/mL; tampon phosphate 25 mmol/L, pH 7.0; conservateur

### Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic in vitro.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

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

### Préparation des réactifs

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

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

### Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

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

Stabilité:	
avant ouverture, entre 2 et 8 °C	jusqu'à la date de péremption indiquée
après ouverture, entre 2 et 8 °C	12 semaines
sur les analyseurs	8 semaines

### Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

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

Plasma recueilli sur héparinate de sodium, de lithium, EDTA tripotassique, citrate de sodium et fluorure de sodium/oxalate de potassium. En cas d'utilisation de citrate de sodium, les résultats obtenus doivent être corrigés de + 10 %.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement entre 90 et 110 % de la valeur du sérum ou pente entre 0.9 et 1.1 + ordonnée à l'origine < ± 2x limite inférieure de détection (sensibilité analytique) + coefficient de corrélation > 0.95.

Stabilité: 5 jours entre 2 et 8 °C, 6 mois à -20 °C. Ne congeler qu'une fois.<sup>4</sup>

Stabilité du sérum recueilli sur tube à gel séparateur: 48 heures entre 2 et 8 °C (voir les indications données par le fabricant des tubes).

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.

# Progesterone II

Progesterone

cobas®

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azide ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients, des calibrateurs et des contrôles se situe entre 20 et 25 °C.

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

## Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

## Matériel auxiliaire nécessaire

- [REF] 12145391122, Progesterone II CalSet, pour 4 x 1 mL
- [REF] 11731416190, PreciControl Universal, pour 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 et 2 x 3 mL de PreciControl Universal 2
- [REF] 03028542122, Diluent Estradiol/Progesterone, 2 x 22 mL, diluant pour échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- Analyseur Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 ou cobas e

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

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

Matériel auxiliaire pour les analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602:

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

Pour tous les analyseurs:

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

## Réalisation du test

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

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

Amener les réactifs réfrigérés à env. 20 °C avant le chargement et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20 °C. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

## Calibration

Traçabilité: La méthode a été standardisée par rapport à la DI-CG-SM (dilution isotopique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et révélée en spectrométrie de masse).<sup>5</sup>

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

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

- après 1 mois (28 jours) pour un même lot de réactif
- après 7 jours pour un même flacon de réactif resté sur l'analyseur
- si nécessaire: par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies.

## Contrôle de qualité

Utiliser PreciControl Universal.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

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

## Calcul des résultats

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

Facteurs de conversion:  $\text{nmol/L} \times 0.314 = \text{ng/mL} (\mu\text{g/L})$   
 $\text{ng/mL} \times 3.18 = \text{nmol/L}$

## Limites d'utilisation - interférences

Le test n'est pas influencé par l'ictère (ditaure de bilirubine < 923 µmol/L ou < 54 mg/dL), l'hémolyse (Hb < 0.621 mmol/L ou < 1.0 g/dL), la lipémie (Intralipid < 720 mg/dL) et la biotine < 82 nmol/L ou < 20 ng/mL.

Critère d'acceptabilité: Recouvrement ± 10 % de la valeur initiale.

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

Le résultat n'est pas influencé par le facteur rhumatoïde jusqu'à une concentration de 2000 UI/mL.

L'influence de 18 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Seul le phénylbutazone conduit, aux doses thérapeutiques journalières, à des taux de progesterone par défaut.

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

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

## Limites et intervalles

### Domaine de mesure

0.095-191 nmol/L ou 0.030-60.0 ng/mL (défini par la limite inférieure de détection et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la limite inférieure de détection sont exprimés de la manière suivante: < 0.095 nmol/L ou < 0.030 ng/mL. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante: > 191 nmol/L ou > 60.0 ng/mL.

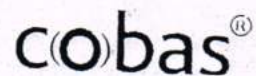
### Limites inférieures de mesure

Limite inférieure de détection du test

Limite inférieure de détection: 0.095 nmol/L (0.030 ng/mL)

# Progesterone II

Progesterone



La limite inférieure de détection correspond à la plus faible concentration mesurable en analyte pouvant être distinguée de zéro. Elle est obtenue par le calcul et représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2 écarts-type (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, répétabilité, n = 21).

### Dilution

Les échantillons présentant une concentration en progesterone au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avec Diluent Estradiol/Progesterone ou du sérum humain contenant une faible concentration d'analyte. Rapport de dilution recommandé: 1/10. La concentration de l'échantillon dilué doit être > 6 nmol/L (> 2 ng/mL). Après dilution, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Selon la variance biologique de l'échantillon de patient dilué et de la matrice de sérum humain utilisée pour la production de Diluent Estradiol/Progesterone, le taux de récupération des échantillons dilués peut être diminué.

### Valeurs de référence

Des études réalisées avec le test Elecsys Progesterone II ont permis d'établir les résultats suivants:

Sujets testés	n	Percentiles			
		50 <sup>ème</sup>		5-95 <sup>ème</sup>	
		nmol/L		ng/mL	
Hommes	33	1.8	0.7-4.3	0.6	0.2-1.4
Femmes					
• Phase folliculaire	192	2.1	0.6-4.7	0.7	0.2-1.5
• Phase ovulatoire	13	3.9	2.4-9.4	1.2	0.8-3.0
• Phase lutéale	158	36	5.3-86	11	1.7-27
• Postménopause	89	1.0	0.3-2.5	0.3	0.1-0.8

Evaluation multicentrique Elecsys Progesterone II, 5/99

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

### Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

### Précision

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

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
Echantillon	Moyenne		Répétabilité		
			SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Sérum humain 1	4.99	1.57	0.13	0.04	2.4
Sérum humain 2	38.2	12.0	0.54	0.17	1.5
Sérum humain 3	96.0	30.2	2.42	0.76	2.7
PreciControl U <sup>b)</sup> 1	28.1	8.83	0.60	0.19	2.3
PreciControl U2	66.1	20.8	1.11	0.35	1.7

b) U = Universal

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
Echantillon	Moyenne		Précision intermédiaire		
			SD		CV
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	%
Sérum humain 1	4.99	1.57	0.29	0.09	5.4

Analyseurs Elecsys 2010 et cobas e 411					
Echantillon	Moyenne		Précision intermédiaire		CV
			SD		
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	
Sérum humain 2	38.2	12.0	1.53	0.48	4.1
Sérum humain 3	96.0	30.2	4.90	1.54	5.5
PreciControl U1	28.1	8.83	1.21	0.38	4.6
PreciControl U2	66.1	20.8	2.45	0.77	3.7

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602					
Echantillon	Moyenne		SD		CV
			SD		
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	
Sérum humain 1	2.31	0.73	0.07	0.02	2.9
Sérum humain 2	9.57	3.01	0.13	0.04	1.4
Sérum humain 3	103	32.4	0.96	0.30	0.9
PreciControl U1	15.6	4.89	0.17	0.05	1.1
PreciControl U2	61.5	19.3	0.45	0.14	0.7

Analyseurs MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 et cobas e 602					
Echantillon	Moyenne		SD		CV
			SD		
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL	
Sérum humain 1	2.52	0.79	0.12	0.04	4.6
Sérum humain 2	10.0	3.13	0.28	0.09	2.9
Sérum humain 3	112	35.3	2.23	0.70	2.0
PreciControl U1	16.7	5.26	0.55	0.17	3.3
PreciControl U2	64.7	20.4	1.19	0.38	1.8

### Comparaison de méthodes

Une comparaison du test Elecsys Progesterone II (y) avec le test Elecsys Progesterone (x), effectuée sur des échantillons cliniques, a donné les corrélations suivantes (ng/mL):

Nombre d'échantillons analysés: 88

Passing/Bablok<sup>6</sup>

$$y = 0.91x + 0.29$$

$$r = 0.933$$

Régression linéaire

$$y = 0.90x + 0.50$$

$$r = 0.998$$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre environ 0.6 et 140 nmol/L (environ 0.2 et 44 ng/mL).

### Spécificité analytique

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

Androstendiol	0.002
Androstendione	0.136
Corticostérone	0.687
Cortisol	0.005
Danazol	0.002
DHEA-S	0.009
D-(-)-Norgestrel	0.008
Estradiol	0.009
Ethistérone	0.002
Diacétate d'éthinoldiol	n.d. <sup>7)</sup>
Médroxyprogesterone	0.812

# Progesterone II

Progéstérone

cobas®

Noréthindrone	0.010
Acétate de norethindrone	n.d.
Testostérone	0.020
4-Prégnène-11β-17α-diol-3,20-dione	0.338
11-Désoxycorticostérone	0.296
11-Désoxycortisol	0.392
5-α-Dihydrotestostérone	0.040
5-β-Dihydroprogéstérone	20.7
5α-Prégnène-3β-ol-20-one	0.858
5β-Prégnane-3α-ol-20-one	0.211
6α-Méthyl-17α-hydroxy-acétate de progéstérone	0.257
6α-Méthylprednisolone	n.d.
17α-Hydroxyprégnénolone	0.018
17α-Hydroxyprogéstérone	1.30
20α-Hydroxy-4-prégnène-3-one	0.016

c) n.d. = non détectable

### Sensibilité fonctionnelle

0.48 nmol/L (0.15 ng/mL)

La sensibilité fonctionnelle est définie comme étant la concentration en analyte la plus basse, mesurable de manière reproductible et donnant un CV inter-séries < 20 %.

### Références bibliographiques

- 1 Johnson MR, Carter G, Grint C, et al. Relationship between ovarian steroids, gonadotrophins and relaxin during the menstrual cycle. *Acta Endocrinol* 1993;129:121-125.
- 2 Runnebaum B, Rabe T. *Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin* Springer Verlag 1994; Band 1:36-38,70,116 Band 2:137,360,398-399,408-409,422-423. ISBN 3-540-57345-3, ISBN 3-540-57347-x.
- 3 Guillaume J, Benjamin F, Sicuranza D, et al. Maternal serum levels of estradiol, progesterone and h-Choriongonadotropin in ectopic pregnancy and their correlation with endometrial histologic findings. *Surg Gynecol Obstet* 1987;165:9-12.
- 4 Wu AHB. *Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests*, 4th Edition, WB Saunders Co, 2006:894 pp.
- 5 Thienpont LM, Verheghe PG, Van Brussel KA, et al. Efforts by industry toward standardization of serum estradiol-17β measurements. *Clin Chem* 1998;44(3):671-674.
- 6 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

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

Dans cette fiche technique, le séparateur décimal pour partager la partie décimale ou la partie entière d'un nombre décimal est un point. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

### Symboles

Roche Diagnostics utilise les signes et les symboles suivants en plus de ceux de la norme ISO 15223-1.

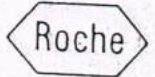
	Contenu du coffret
	Analyseurs/appareils compatibles avec les réactifs
	Réactif
	Calibrateur
	Volume après reconstitution ou homogénéisation

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

© 2013, Roche Diagnostics



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



## Résumé

L'avortement spontané est une interruption involontaire de la grossesse avant 22 semaines de gestation ou une expulsion spontanée du fœtus. Dans la population générale le nombre de fausse couche est élevé, il représente environ de 15 à 20 % des grossesses. Selon l'Institut national de santé publique Algérienne (INSPA), le pourcentage des femmes souffrent de complications permanentes au cours de grossesse en Algérie est d'environ 15 %. Notre étude a pour objectif la détermination de quelques analyses biochimiques incluant l'acide folique, vitamine B12, l'Homocystéine (Hcy), fer, calcium, l'alphafoetoprotéine (AFP),  $\beta$ -HCG, progestérone et l'œstradiol, qui sont impliqués dans le dépistage des échecs de grossesse et leurs corrélations avec l'issue des avortements au cours des deux premiers trimestres. Cette étude cas-témoins a été effectuée sur des femmes en voie d'avortement et un groupe de contrôle présentant des grossesses viables dans la région de l'Est Algérien (Batna) au cours de l'année 2015. Soixante neuf femmes enceintes au cours du premier et au deuxième trimestre ont été recrutées comme cas (présentant des fausses couches) ainsi que le groupe de contrôle (n = 69) était composé de femmes qui avaient une échographie normale. Le folate, la vitamine B12, l'alpha-fetoprotéine, la  $\beta$ -HCG, la progestérone et l'œstradiol (uE3) ont été évalué par une électrochimiluminescence « ECLIA » sur des systèmes d'immunoanalyses (Elecys 2010 et cobas e 6000) (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne), après une échographie ciblée. La concentration moyenne d'alpha-fetoprotéine est significativement faible au cours du 1<sup>er</sup> trimestre, sa valeur est d'ordre de  $0,76 \pm 0,434$  MoM, mais elle est très élevée au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre ( $2,82 \pm 3,29$ ) MoM (P <0.05). Les valeurs médianes de la  $\beta$ -HCG sont très faibles aux cours des deux premiers trimestres ( $0,048 \pm 0,07$  MoM) vs ( $0,18 \pm 0,22$  MoM), (P <0.05), de même pour le taux d'uE3 ( $0,095 \pm 0,08$  MoM) vs ( $0,037 \pm 0,05$  MoM), P <0.05) et de la progestérone ( $0,21 \pm 0,15$  MoM) vs ( $0,17 \pm 0,16$  MoM), P <0.05), qui ont été diminués significativement au cours des deux premiers trimestres. Par ailleurs une diminution non significative de la concentration moyenne du folate sérique ( $24,44 \pm 11,42$  vs  $28,28 \pm 30,42$  nmol/l, P = 0,990) au cours du 1<sup>er</sup> trimestre et de  $29,23 \pm 10,97$  vs  $141,43 \pm 51,75$  pmol/l, P = 0,993 au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre. Au cours des deux premiers trimestres une variation non significative des taux de la vitamine B12 [ $174,49 \pm 83,50$  vs  $176,94 \pm 65,65$  pmol/l, P = 0,997] et [ $138,12 \pm 55,12$  vs  $31,88 \pm 5,38$  nmol/l, P = 0,987] respectivement] et une augmentation non significative l'Homocystéine (Hcy) [ $8,58 \pm 0,79$  vs  $8,40 \pm 0,76$   $\mu$ mol/l, P = 0,886] et ( $9,54 \pm 0,85$  vs  $9,47 \pm 1,49$ )  $\mu$ mol/l, P = 0,976] respectivement] ont été observés. Le dosage du fer (Fe) et du calcium (ca) révèle une diminution non significatives : fer (Fe) ( $1,60 \pm 0,11$  vs  $1,62 \pm 0,22$  mg/l ; P=0,939) et ( $1,16 \pm 0,781$  vs  $1,22 \pm 0,10$  mg/l ; P=0,781) et le calcium (ca) ( $10,04 \pm 0,58$  vs  $10,71 \pm 0,10$ , P=0,07) mg /l et ( $9,96 \pm 0,781$  vs  $10,29 \pm 0,13$  ; P=0,33) mg/l.

D'après cette étude; les avortements spontanés sont en association avec les modifications des taux de marqueurs sériques et de la progestérone et les micronutriments, ce qui pourrait constituer un élément important dans le diagnostic précoce des grossesses non viables, alors que les taux des vitamines n'ont pas d'effets significatifs sur ces grossesses.

**Mots-clés:** Micronutriments, Marqueurs sériques, progestérone, grossesse, femme, avortement.

## ملخص

الإجهاض هو انقطاع غير طوعي للحمل قبل انقضاء 22 أسبوعاً من فترة الحمل. وفقاً للمعهد الوطني الجزائري للصحة العامة، فإن نسبة النساء اللواتي يعانين من مضاعفات أثناء الحمل بلغت حوالي 15 في المائة. تهدف هذه الدراسة إلى معايرة بعض التحاليل الكيميائية الحيوية كحمض الفوليك، وفيتامين B12، ألفا فيتوبروتين، الهوموسيسستين، الحديد، الكالسيوم وهرمون البروجسترون و أوستراديول في الكشف عن فشل الحمل و الإجهاض. لقد أجريت هذه الدراسة في المنطقة الشرقية من الجزائر (باتنة) خلال سنة 2015 على مجموعة من النساء الحوامل خلال الثلثي الأول والثاني من الحمل (69) في طور الإجهاض و (69) بحمل طبيعي، وجرى تقييم حمض الفوليك، فيتامين B12، ألفا فيتوبروتين،  $\beta$ -HCG، البروجسترون و الأسترايول (uE3) من خلال "ECLIA" electrochemiluminescence على أنظمة (Elecys 2010 و Roche 6000) (Roche Diagnostics، Penzberg، Germany)، بعد التصوير بالموجات فوق الصوتية. لقد أظهرت النتائج أن متوسط تركيز ألفا فيتوبروتين انخفض بشكل ملحوظ خلال الأشهر الثلاثة الأولى ( $0,76 \pm 0,434$ ) MoM (P <0.05)، لكنه ارتفع جداً خلال الأشهر الثلاثة الثانية ( $2,82 \pm 3,29$ ) MoM (P <0.05). مقارنة مع مجموعتي الحالات والضوابط. وهرمون البروجسترون ( $0,21 \pm 0,15$  MoM) vs ( $0,17 \pm 0,16$ ) MoM، P <0.05) و ( $0,095 \pm 0,08$  MoM) vs ( $0,037 \pm 0,05$  MoM)، P <0.05) و ( $0,18 \pm 0,22$  MoM) vs ( $0,048 \pm 0,07$  MoM) respectively] و ( $9,54 \pm 0,85$  vs  $9,47 \pm 1,49$ )  $\mu$ mol/l، P = 0,976] و ( $8,58 \pm 0,79$  vs  $8,40 \pm 0,76$ )  $\mu$ mol/l، P = 0,886] و ( $1,60 \pm 0,11$  vs  $1,62 \pm 0,22$  mg/l ; P=0,939) et ( $1,16 \pm 0,781$  vs  $1,22 \pm 0,10$  mg/l ; P=0,781) و الحديد = 0,886) و الكالسيوم ( $10,04 \pm 0,58$  vs  $10,71 \pm 0,10$ , P=0,07) mg /l et ( $9,96 \pm 0,781$  vs  $10,29 \pm 0,13$  ; P=0,33) mg/l . عمليات الإجهاض التلقائي ترتبط بالتغيرات في معايير المصل المغذيات الدقيقة والبروجسترون و إن مستويات الفيتامينات لا تأثير لها على هذه الحالات.

**الكلمات المفتاحية :** المغذيات الدقيقة، علامات المصل، البروجسترون، الحمل، المرأة، الإجهاض

## Summary

Spontaneous abortion is an involuntary interruption of pregnancy before 22 weeks of gestation. According to the Algerian National Institute of Public Health (ANIPH) the percentage of women suffering from permanent complications during pregnancy is about 15%. The aim of this study is the determination of some biochemical analytes, including folic acid, vitamin B12, homocysteine (Hcy), iron (Fe), calcium (Ca), alphafoetoprotein (AFP), beta human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG), progesterone and oestradiol (uE3), which are involved in the detection of pregnancy failures. This case-control study was carried out on women in the process of abortion and a control group with viable pregnancies in the region of Este of Algeria (Batna) during the year 2015. 69 pregnant women during the first and second trimester were recruited as cases (with miscarriages) and the control group (n = 69) was comprised of women who had normal ultrasound. Folate, vitamin B12, alpha-fetoprotein,  $\beta$ -HCG, progesterone and estradiol (uE3) were evaluated by electrochemiluminescence "ECLIA" on immunoanalysis systems (Elecys 2010 and cobas e 6000) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), after a target ultrasound, the mean concentration of alpha-fetoprotein is significantly low, it is ( $0,76 \pm 0,434$ ) MoM during the first trimester but it is very high during the 2<sup>nd</sup> trimester ( $2,82 \pm 3,29$ ) MoM (P <0.05) and median  $\beta$ -HCG values are very low in the first two trimesters ( $0,048 \pm 0,07$  MoM) vs ( $0,18 \pm 0,22$  MoM), (P <0.05), similarly for uE3 ( $0,095 \pm 0,08$  MoM) vs ( $0,037 \pm 0,05$  MoM), P <0.05) and progesterone levels ( $0,21 \pm 0,15$  MoM) vs ( $0,17 \pm 0,16$  MoM), P <0.05), which were significantly decreased during the first two trimesters, by the the mean concentration of folate was is equal to ( $24,44 \pm 11,42$  vs  $28,28 \pm 30,42$  nmol / l, P = 0,990) in the 1st trimester and is ( $29,23 \pm 10,97$  vs  $141,43 \pm 51,75$  pmol / l, P = 0,993) during the 2<sup>nd</sup> trimester and vitamin B12 ( $174,49 \pm 83,50$  vs  $176,94 \pm 65,65$  pmol / l, P = 0,997) in the 1st trimesters and ( $138,12 \pm 55,12$  vs  $31,88 \pm 5,38$  nmol / l, P = 0,987) in the 2<sup>nd</sup> trimester who changed but not significantly between cases and controls. For Homocysteine (Hcy) our results show a non-significant increase during the first two trimesters and the results are respectively ( $8,58 \pm 0,79$  vs  $8,40 \pm 0,76$ )  $\mu$ mol / l, P = 0,886) and ( $9,54 \pm 0,85$  vs  $9,47 \pm 1,49$ )  $\mu$ mol / l, P = 0,976). In contrast, iron (Fe) and calcium (ca) show a non-significant decrease: iron (Fe) ( $1,60 \pm 0,11$  vs  $1,62 \pm 0,22$  mg / l, P = 0,939) and ( $1,16 \pm 0,781$  vs  $1,22 \pm 0,10$  mg / l, P = 0,781) and calcium (ca) ( $10,04 \pm 0,58$  vs  $10,71 \pm 0,10$ , P = 0,07) mg / l et ( $9,96 \pm 0,781$  vs  $10,29 \pm 0,13$ , P = 0,33) mg / l. The results of this study revealed that, spontaneous abortions are associated with changes in serum markers, Micronutrients and progesterone which could form an important part in the early diagnosis of non-viable pregnancies, while vitamins levels have no significant effects on these pregnancies.

**Keywords:** Micronutrients, Serum markers, progesterone, pregnancy, woman, abortion.