



**HAL**  
open science

## Dosage radioimmunométrique de la rénine active : validation analytique et intérêt clinique

Sandrine Brunet

► **To cite this version:**

Sandrine Brunet. Dosage radioimmunométrique de la rénine active : validation analytique et intérêt clinique. Sciences pharmaceutiques. 1992. dumas-03528500

**HAL Id: dumas-03528500**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03528500>**

Submitted on 17 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

1<sup>er</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
Grenoble 1 - Sciences Technologie Médecine

U.F.R. DE PHARMACIE  
Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1992

N° D'ORDRE 7038

**DOSAGE RADIOIMMUNOMETRIQUE  
DE LA RENINE ACTIVE  
VALIDATION ANALYTIQUE  
ET  
INTERET CLINIQUE**

**THESE**

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE 1  
Pour obtenir le titre de : DOCTEUR EN PHARMACIE  
Par :

**Mademoiselle Sandrine BRUNET**

*[Données à caractère personnel]*

Cette thèse sera soutenue publiquement le 28 septembre 1992

Devant Madame le Professeur AGNIUS-DELORD, Président du jury  
et

Madame BERIEL, Professeur

Madame VILLEMMAIN, Maître de conférences

Monsieur HERVE, Pharmacien



115 011159 1



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
Grenoble 1 - Sciences Technologie Médecine

U.F.R. DE PHARMACIE  
Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1992

N° D'ORDRE

DOSAGE RADIOIMMUNOMETRIQUE  
DE LA RENINE ACTIVE  
VALIDATION ANALYTIQUE  
ET  
INTERET CLINIQUE

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE 1

Pour obtenir le titre de : DOCTEUR EN PHARMACIE

Par :

Mademoiselle Sandrine BRUNET

*[Données à caractère personnel]*

Cette thèse sera soutenue publiquement le 28 septembre 1992

Devant Madame le Professeur AGNIUS-DELORD, Président du jury  
et

Madame BERIEL, Professeur

Madame VILLEMANN, Maître de conférences

Monsieur HERVE, Pharmacien



A notre président de thèse:

**Madame le Professeur C. AGNIUS-DELORD**

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant la présidence de cette thèse. Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre très vive et respectueuse gratitude.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer toute notre reconnaissance pour nous avoir fourni le sujet de ce travail, ainsi que pour votre patience et votre compétence sans lesquelles ce travail n'aurait pu aboutir.

A nos juges,

**A Madame le Professeur H. BERIEL,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de siéger dans ce jury et de juger ce travail.

**A Madame D. VILLEMAIN, Maître de Conférences**

Nous vous remercions de votre gentillesse et pour le grand honneur que vous nous avez fait en acceptant de guider et juger ce travail. Acceptez dans ce travail, l'expression de notre gratitude.

**A Monsieur B. HERVE, Pharmacien** qui m'a initié à la vie officinale. Sa confiance et sa gentillesse ont été pour moi d'une aide précieuse. Je le remercie vivement d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

A mes parents,

A mes grands parents,

A toute ma famille,

A tous mes amis.

## P L A N       G E N E R A L

### 1ERE PARTIE : RAPPELS

- I. La rénine
- II. Dosage radioimmunologique : méthodologie appliquée à la rénine
- III. Matériel et méthode
- IV. Autres méthodes d'évaluation de la rénine

### 2EME PARTIE : EVALUATION ANALYTIQUE DE LA METHODE DE DOSAGE

Introduction

- I. Reproductibilité
- II. Exactitude
- III. Limite de détection
- IV. Spécificité

Conclusion

### 3EME PARTIE : INTERET CLINIQUE DU DOSAGE DE LA RENINE

Introduction

- I. Indications du dosage de la rénine
- II. Précautions à prendre lors du dosage de la rénine active
- III. Intérêt du dosage de la rénine dans le diagnostic de certaines pathologies
- IV. Etude expérimentale

CONCLUSION

INTRODUCTION

Les progrès récents du génie génétique tels que la production en masse d'anticorps monoclonaux et le séquençage des protéines (1) ont permis un nouvel essor des techniques de dosage immunologique. Ainsi E.R.I.A Diagnostic Pasteur a mis sur le marché la première méthode de dosage de la rénine active. Mais avant d'introduire ce dosage dans la pratique quotidienne, il est nécessaire d'évaluer ses qualités analytiques ainsi que son intérêt clinique; c'est l'objet de ce travail.

Dans une première partie théorique, nous ferons quelques rappels concernant la rénine et les dosages radioimmunologiques. Nous décrirons ensuite de façon précise le protocole utilisé pour cette méthode de dosage.

Dans une deuxième partie expérimentale, nous nous attacherons à étudier les qualités analytiques de la trousse de réactif c'est à dire la reproductibilité, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité.

Enfin dans une troisième partie à la fois bibliographique et expérimentale, notre objectif sera double:

- faire un recensement des applications possibles de ce dosage

- évaluer son intérêt clinique dans le diagnostic de l'hyperaldostéronisme à partir d'une étude expérimentale.

1ERE PARTIE

GENERALITES

ET

RAPPELS

La pression artérielle, à l'origine de nombreuses pathologies, est maintenue stable grâce à plusieurs mécanismes complexes. La rénine, objet de notre travail, intervient dans le système rénine angiotensine aldostérone qui constitue l'un des ces mécanismes.

## I LA RENINE

### I.1. Mécanismes de régulation de la tension artérielle(2)

Les mécanismes de régulation de la tension artérielle sont complexes.

La pression artérielle normale est maintenue en premier lieu par des systèmes de régulation à intervention rapide. Il s'agit principalement de mécanismes réflexes dans lesquels le baroréflexe artériel exerce l'influence prédominante. Ce système est capable de corriger de façon presque instantanée et totale les variations brutales de pression sanguine artérielle occasionnées par les changements de posture, de l'activité ou de l'état physiologique.

Cependant, ce système de régulation rapide est incapable de maintenir durablement et dans toutes les conditions, la stabilité de la pression sanguine artérielle. Cette stabilité est assurée par des mécanismes de régulation à intervention plus lente. Le rein est l'organe de cette régulation à moyen et à long terme.

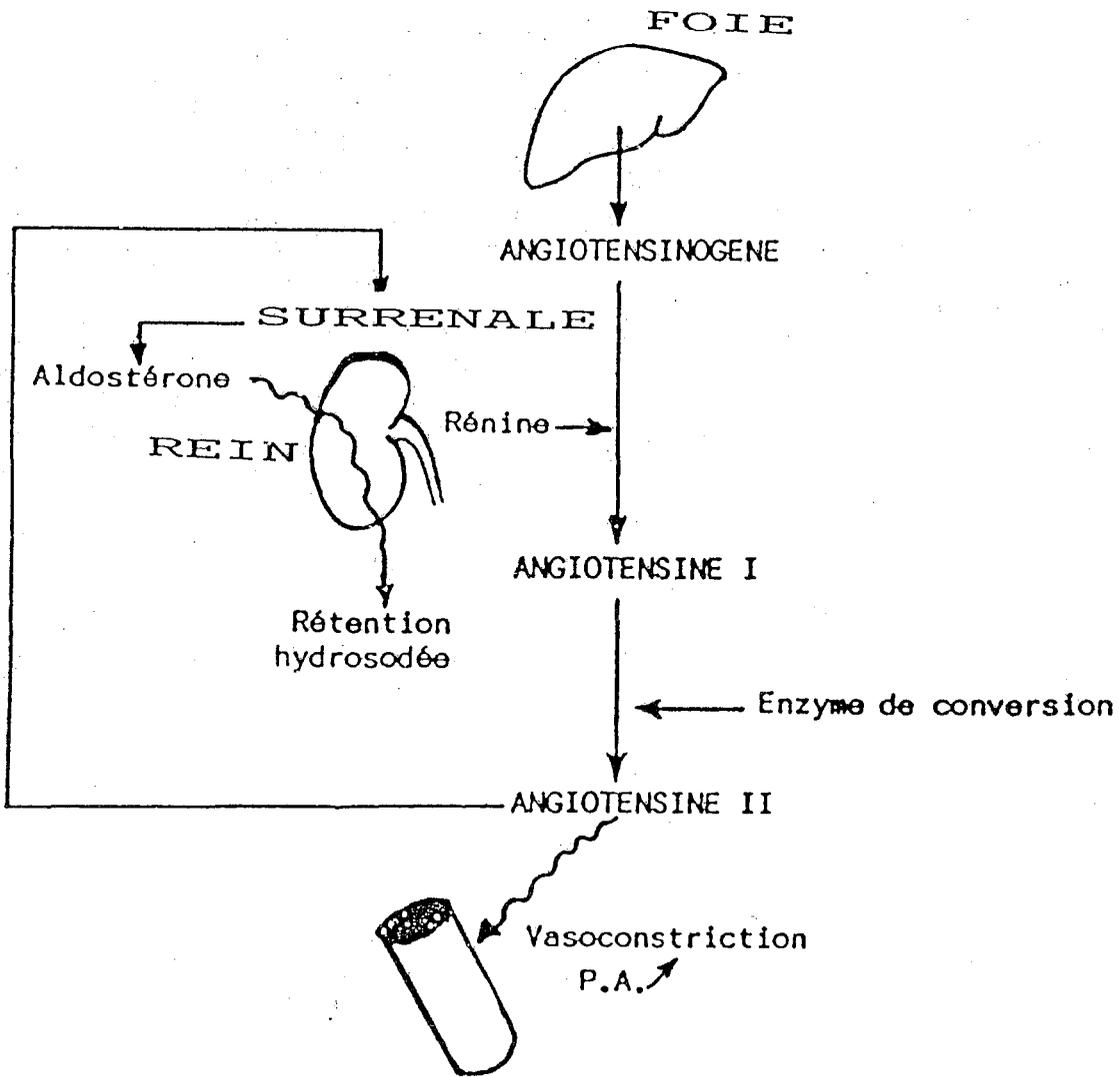
Le système rénine angiotensine aldostérone, que nous étudierons en détail dans le paragraphe suivant, intervient dans le contrôle à moyen terme.

Enfin le rein exerce une fonction antihypertensive à long terme grâce au mécanisme de l'excrétion hydrosodée. En effet, le capital de sodium de l'organisme détermine le volume des liquides extracellulaires et, en particulier le volume plasmatique, l'un des facteurs de régulation de la pression sanguine artérielle. Le capital sodé est maintenu stable chez un sujet normal parce que l'excrétion rénale s'adapte jour après jour aux variations des apports et aux variations des pertes extrarénales de façon à préserver la nullité du bilan.

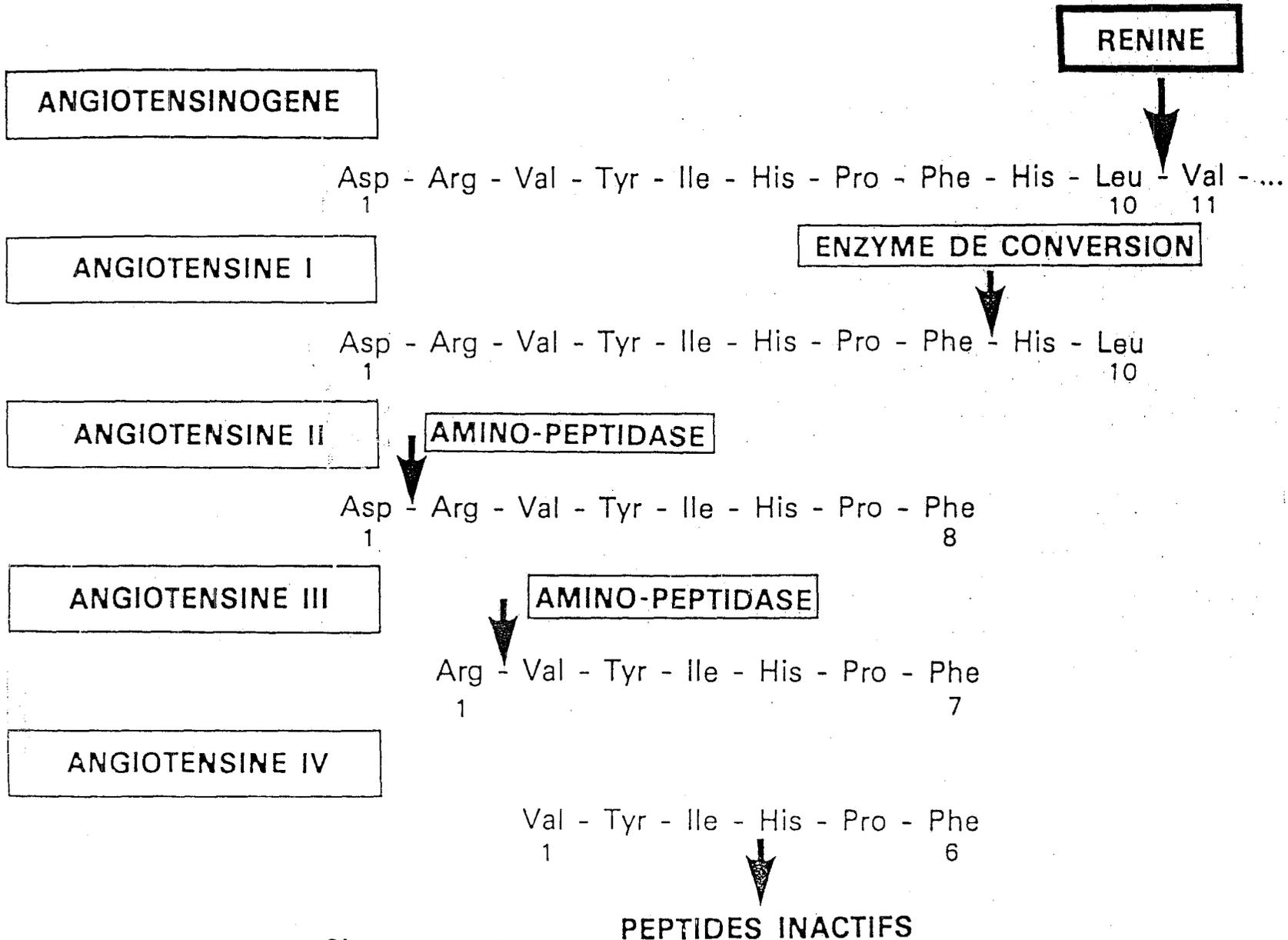
### I.2. Le système rénine angiotensine (2) (3) (4)

Au niveau rénal, l'appareil juxta-glomérulaire sécrète une protéase glycoprotéinique acide de PM 40 000: la rénine. Cette enzyme clive un substrat plasmatique glycoprotéinique d'origine hépatique, l'angiotensinogène, au niveau de la liaison peptidique leucine valine, pour libérer un dipeptide inactif et l'angiotensine I (figures 1 et 2).

L'enzyme de conversion, synthétisée au niveau des parois de l'endothélium vasculaire, agit principalement au niveau de la circulation pulmonaire mais aussi au niveau des parois vasculaires, du plasma sanguin et du rein. Cette



-figure 1- (3)



-figure 2- (7)

carboxypepsidase va cliver le dipeptide C terminal de l'angiotensine I au niveau de la liaison phenyl-alanine histidine. Elle libère le principal produit actif du système l'angiotensine II qui est un octapeptide.

L'angiotensine II est dégradée rapidement par différentes angiotensinases. L'une d'elle, l'aminopeptidase I clive l'acide aspartique de l'extrémité N terminale. La séquence résiduelle de l'angiotensine III possède encore une activité biologique.

#### I.2.1. Mécanismes d'action (5) (6)

L'angiotensine II est puissamment vasoconstrictrice. Cet effet est rapide, différencié (plus intense au niveau des territoires abdominaux et cutanés qu'au niveau des territoires musculaires cardiaques, et cérébraux) et variable (la sensibilité à l'angiotensine II de la fibre lisse vasculaire est plus grande lorsque le bilan sodé est positif que lorsqu'il est équilibré ou négatif).

Les angiotensines II et III stimulent la synthèse et la sécrétion de l'aldostérone par les cellules glomérulées du cortex surrénal. Cet effet est exercé par de faibles doses, même non pressives d'angiotensine. A l'inverse de l'effet vasculaire, l'effet sur la sécrétion de l'aldostérone est d'autant plus intense que le bilan sodé est plus négatif.

L'angiotensine II stimule le système neurocatécholaminergique. Cet effet participe à l'action pressive des fortes doses d'angiotensine.

L'angiotensine II stimule directement la sécrétion d'A.D.H (hormone antidiurétique) et le centre de la soif: elle accroît la réabsorption rénale et l'ingestion d'eau.

L'angiotensine II exerce des effets spécifiquement intrarénaux. Elle réduit le débit de filtration glomérulaire proportionnellement plus que le débit sanguin rénal et élève ainsi la fraction filtrée. Elle diminue proportionnellement plus le débit sanguin destiné au cortex externe que celui destiné au cortex profond et à la médullaire. Ces modifications de l'hémodynamique intrarénale sont des facteurs d'accroissement de la réabsorption du sodium.

#### I.2.2. Régulation de la sécrétion de rénine.(2) (7)

(8)

Quatre facteurs principaux interviennent:

-La pression rénale de perfusion. L'appareil juxtaglomérulaire peut être considéré comme un tensorécepteur vasculaire : la sécrétion de rénine augmente quand la tension pariétale diminue au niveau de l'artériole éfférente des glomérules, soit par diminution de la pression sanguine artérielle, soit par diminution du rayon artériolaire.

-Le contenu en sodium des urines distales. La macula densa des appareils juxtaglomérulaires fonctionne comme un chemorécepteur stimulé par l'augmentation de la charge sodée intratubulaire et/ou par l'augmentation du transport de sodium à travers des cellules épithéliales qui la composent.

-Le système neurocatécholaminergique: l'appareil juxtaglomérulaire reçoit une riche innervation orthosympathique et est directement sensible à l'action des catécholamines circulantes. Toutes les circonstances physiologiques qui déterminent l'activation du système neurocatécholaminergique (orthostatisme, activité, exposition au froid, hypotension artérielle, stress et agressions) déterminent ainsi une augmentation de la sécrétion.

-Les angiotensines II et III circulantes exercent une action inhibitrice directe sur la sécrétion de rénine ce qui constitue un feed-back négatif.

### I.3. La rénine

#### I.3.1 Historique (5) (9)

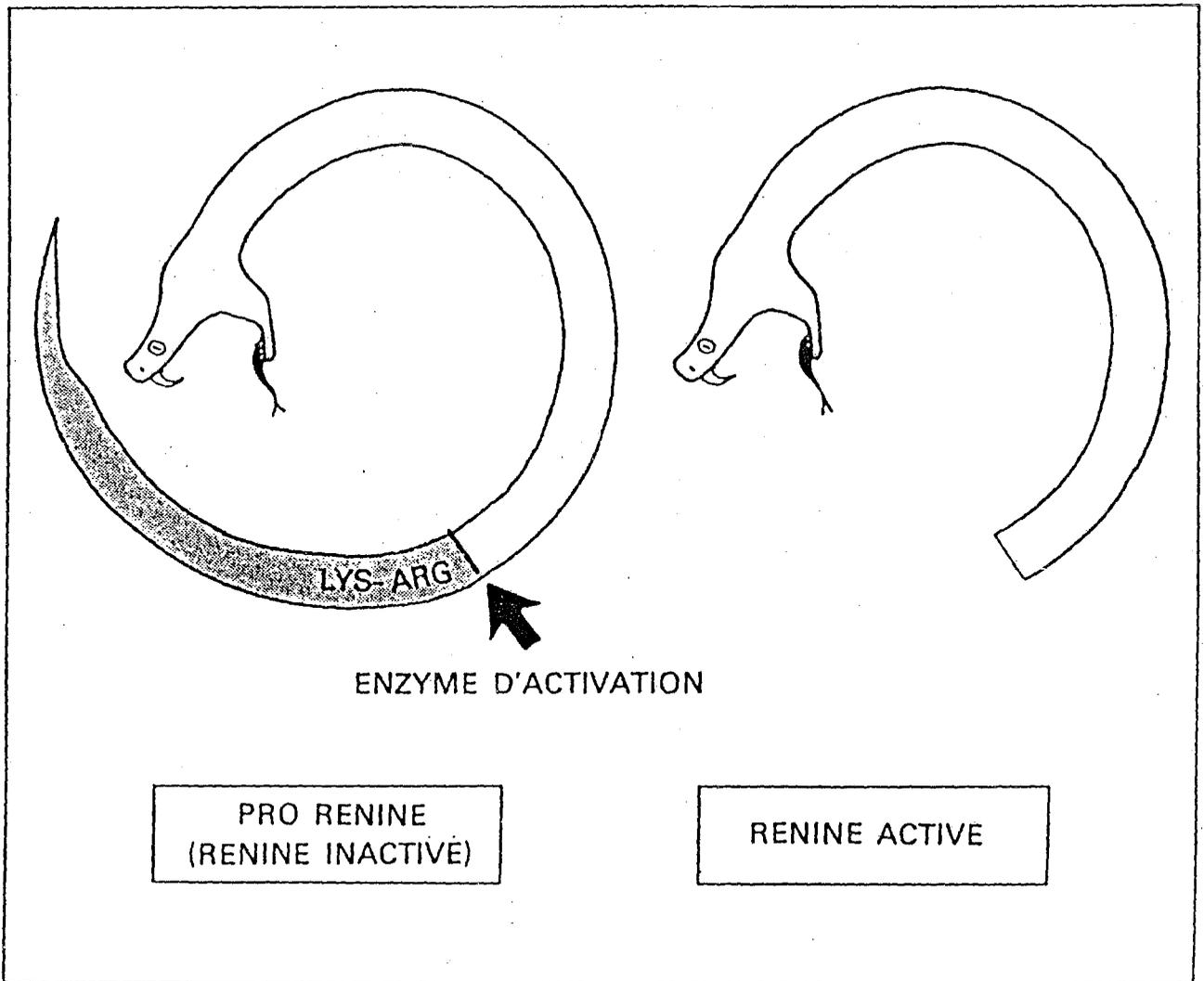
Le problème majeur de la caractérisation de la rénine est sa concentration extrêmement faible dans le rein, environ 1/500.000 éme des protéines rénales.

En 1953, Haas, Lanfon et Golblatt ont réussi à purifier pratiquement à l'état pur la rénine de porc, grâce à des techniques rudimentaires de séparation des protéines.

Dans les années 70, l'équipe de P. Corvol réussit à obtenir une préparation de rénine pure de porc en employant des techniques de chromatographie par affinité. Peu de temps après, la rénine humaine fut elle aussi complètement purifiée, soit à partir de reins de cadavres, soit en utilisant une tumeur juxtaglomérulaire productrice de rénine.

La présence d'une rénine inactive dont l'activité enzymatique n'est décelable qu'après activation par protéolyse partielle a été récemment découverte dans le plasma humain. Elle représente 80 à 90 % de la rénine circulante chez l'homme mais sa structure n'est pas complètement identifiée. Cependant, on sait que la prorénine n'a pas d'activité enzymatique car le site actif de l'enzyme est masqué par le fragment peptidique "pro" (figure n°3).

La séquence en acides aminés de la rénine a pu être établie à partir de rénine synthétisée dans la glande sous maxillaire de souris. Celle ci est en effet très proche de la rénine rénale sur le plan biochimique, enzymatique et immunologique, et se trouve en grande quantité dans cette glande (5% des protéines totales). Sa structure a été établie en utilisant des techniques de génie génétique (figure n°4) : l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour cette enzyme a été isolé, transformé en acide désoxyribonucléique complémentaire et cloné dans E.Coli. Après expression des recombinants porteurs du gène rénine, il a été possible de séquencer les acides nucléiques et de déduire la séquence en acides aminés de la rénine. La structure de l'enzyme rénale, bien qu'encore inconnue, semble peu différente de la rénine sous maxillaire



-figure 3- (5)

b

MetAspArgArgArgMetProLeuTrpAlaLeuLeuLeuLeuTrpSer  
TCTGGGCTACACAGCTCTTAGAAAGCCTTGGCTGAACCAGATGGACAGGAGGAGGATGCCTCTCTGGGCACTCTTGTGCTCTGGAGT 00

20 30 40  
ProCysThrPheSerLeuProThrGlyThrThrPheGluArgIleProLeuLysLysMetProSerValArgGluIleLeuGluGluArg  
CCTTGCACCTTCAGTCTCCCAACGGGCACCACCTTTGAACGAATCCCCTCAAGAAAATGCCCTCTGTCCGGGAAATCCTGGAGGAGCGG 100

50 60 70  
GlyValAspMetThrArgLeuSerAlaGluTrpAspValPheThrLysArgSerSerLeuThrAspLeuIleSerProValValLeuThr  
GGAGTGGACATGACCAGGCTCAGTGTGAATGGGACGTATTACAAAGAGGCTTCTCTGACTGATCTATCTCCCCCGTGGTCTCACC 200

80 90 100  
AsnTyrLeuAsnSerGlnTyrTyrGlyGluIleGlyIleGlyThrProProGlnThrPheLysValIlePheAspThrGlySerAlaAsn  
AACTACCTGAATAGCCAGTACTATGGCGAGATCGGCATTGGTACCCACCCAGACCTTCAAAGTCATGTTTGACACGGGCTCCGCCAAC 300

110 120 130  
LeuTrpValProSerThrLysCysSerArgLeuTyrLeuAlaCysGlyIleHisSerLeuTyrGluSerSerAspSerSerSerTyrMet  
CTCTGGGTSCCTCCACCAAGTGCAGCCGCTCTACCTTGCTTGTGGGATTACAGCCTCTATGAGTCCTCTGACTCCTCCAGCTACATG 400

140 150 160  
GluAsnGlyAspAspPheThrIleHisTyrGlySerGlyArgValLysGlyPheLeuSerGlnAspSerValThrValGlyGlyIleThr  
GAGAATGGAGACGACTTCACCATCCACTACGGATCAGGGAGAGTCAAAGGTTTCTCAGCCAGGACTCGGTGACTGTGGGTGGAATCACT 500

170 180 190  
ValThrGlnThrPheGlyGluValThrGluLeuProLeuIleProPheMetLeuAlaGlnPheAspGlyValLeuGlyMetGlyLeuSer  
GTGACACAGACCTTTGGAGAGGTACCGAGCTGCCCTGATCCCTTTCATGCTGGCCAGTTTGACGGGGTCTAGGCATGGGCCCTTCC 600

200 210 220  
ArgSerAlaValGlyGlyValThrProValPheAspHisIleLeuSerGlnGlyValLeuLysGluLysValPheSerValTyrTyrAsn  
CGCTCAECCTCGGGGGGTCACCCCTGTCTTTGACCACATTCTCTCCAGGGGGTGTGAAGGAGAAAAGTGTCTCTGTCTACTACAAC 700

230 240 250  
ArgGlyProHisLeuGlyGlyGluValValLeuGlyGlySerAspProGluHisTyrGlnGlyAspPheHisTyrValSerLeuSer  
AGGGTCCCCACTGCTGGGGGGCAGGTGGTGTAGGAGGCAGCGACCCGGAGCATTACCAAGGCATTTTCACJATGTGAGCCTCAGC 800

260 270 280  
LysThrAspSerTrpGlnIleThrMetLysGlyValSerValGlySerSerThrLeuLeuCysGluGluGlyCysGluValValValAsp  
AAGACTGATTCCTGGCAGATCACAATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTCTTCCACCCTACTGTGTGAAGAAGGCTGTGAGGTAGTGGTGGAC 900

290 300 310  
ThrGlySerSerPheIleSerAlaProThrSerSerLeuLysLeuIleMetGlnAlaLeuGlyAlaLysGluLysArgLeuHisGluTyr  
ACTGGTTCATCCTTTATCTCGGCTCCTACGAGCTCCCTGAAGTTGATCATGCAAGCCCTGGGAGCCAAGGAGAAGAGACTACATGAATAT 1000

320 330 340  
ValValSerCysSerGlnValProThrLeuProAspIleSerPheAsnLeuGlyGlyArgAlaTyrThrLeuSerSerThrAspTyrVal  
GTTGTGAGCTGTAGCCAGGTGCCACCTCCCGACATCTCCTTCAACCTGGGAGGCAGGGCCCTACACACTCAGCAGTACGGACTACGTG 1100

350 360 370  
LeuGlnTyrProAsnArgArgAspLysLeuCysThrValAlaLeuHisAlaMetAspIleProProProThrGlyProValTrpValLeu  
CTACAGTATCCCAACAGGAGAGACAAGCTGTGCACAGTGGCTCTCCATGCCATGGACATCCCAACCACCTGGGCTGTCTGGGTCTCTG 1200

380 390 400  
GlyAlaThrPheIleArgLysPheTyrThrGluPheAspArgHisAsnAsnArgValGlyPheAlaLeuAlaArg  
GGTGCCACCTTCATCCGAAGTCTATACAGAGTTTGATCGGCATAACAATCGGCTTGATTGCGCTTGGCCCGCTAAGGCCCTCTGCCA 1300

CCCAGTAACCTAGGCCAAGCCAAGCTGGCACTCTGGGGGCCATTTGTCTGGCTTTGTCCCAACATAGGGCACTGGACACAGAGACCC 1400

TAACGAGTGTGGCCCTTACCTGCACCTCACCTTCCCTGCCTTTAAGGGAAAACCGAATAAAGATTTTCATGTTT 1500

-figure 4- (9)

La purification de la rénine à partir de la glande sous maxillaire de souris a aussi permis d'identifier tout un segment protéique, qui est rapidement clivé, très probablement à l'intérieur de la cellule sécrétrice, ce qui confirme l'existence d'une prorénine.

### I.3.2 La rénine : une hormone et une enzyme (6) (10)

La rénine exerce une activité enzymatique qui est l'hydrolyse de l'angiotensinogène en angiotensine I. La séquence des acides aminés de la rénine montre une analogie frappante avec les protéases acides (famille de la pepsine, cathepsine D, chymosine). Ces enzymes ont en commun:

- Deux acides aminés aspartiques impliqués dans le site de catalyse.

- Des ponts disulfures localisés au même endroit.

- Une structure cristalline similaire.

- Une extension peptidique N terminale d'environ quarante acides aminés qui doit être clivée pour permettre l'activation de l'enzyme.

Mais par d'autres aspects, la rénine est aussi une hormone:

-son activation (maturation de la prorénine en rénine) rappelle l'activation des prohormones en hormones. Le site d'activation de la prorénine en rénine se situe après une paire d'acides aminés basiques (lysine arginine) comme dans le cas de la proinsuline convertie en insuline.

-La rénine agit sur un substrat plasmatique pour produire un peptide qui agira sur de nombreuses cellules cibles.

-Enfin la régulation de la rénine dépend de nombreux facteurs via des barorécepteurs, des adrénorecepteurs et des chémorécepteurs.

-La rénine est synthétisée au niveau de la cellule juxtaglomérulaire qui est une cellule endocrine.

La rénine est la seule des protéases acides à posséder ces propriétés qui en font un cas tout à fait particulier de protéine hormone.

### I.3.3 Biosynthèse, maturation et excrétion. (5)

(11)

L'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour la rénine est traduit dans le réticulum endoplasmique en une protéine, la préprorénine, précurseur de la rénine ( figure n° 5 ) .

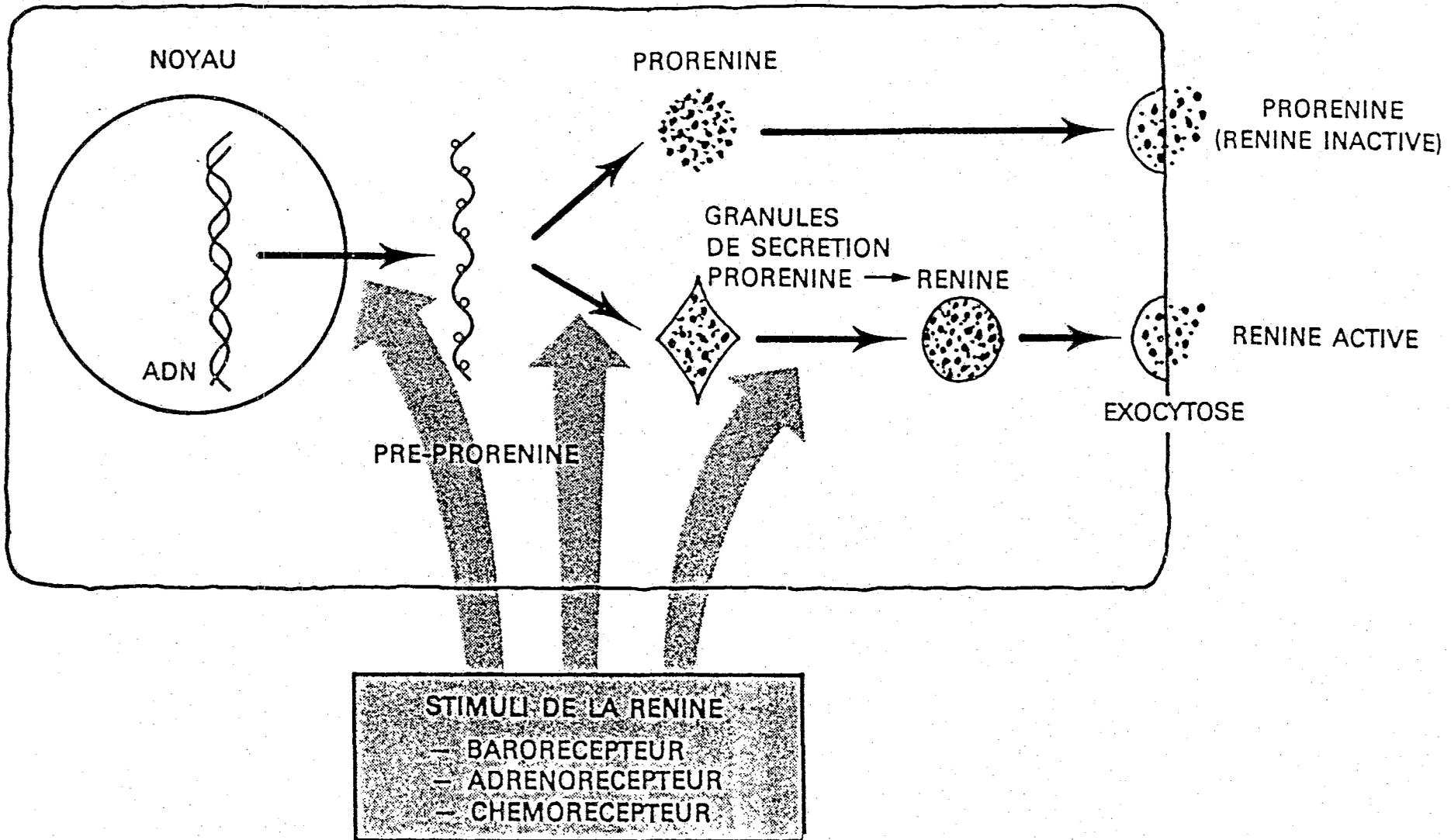
Rapidement, au niveau de l'appareil de Golgi, le segment pré est clivé par une protéase au niveau de la partie N-terminale.

La prorénine (rénine inactive) pourrait alors suivre deux voies:

- Accumulation dans le réticulum endoplasmique sans formation de rénine et sécrétion dans le plasma par exocytose en prorénine (rénine inactive).

- Stockage dans des granules rhomboédriques puis sphériques. A l'intérieur des ces granules, la prorénine serait activée en rénine. La rénine serait alors libérée sous forme active par exocytose.

Au cours d'une stimulation par les barorécepteurs, adréno-récepteurs ou chémorécepteurs, la rénine serait synthétisée et libérée à partir des granules de stockage. Comme nous l'avons déjà cité précédemment, l'activation du système neurocatécholaminergique entraîne une augmentation de la sécrétion de rénine tandis que les angiotensines II et III sont les agents d'un feed back négatif.



-figure 5 - (7)

## II. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE : METHODOLOGIE APPLIQUEE A LA RENINE

Les dosages radioimmunologiques sont basés sur la réaction antigène-anticorps sur laquelle il nous a semblé utile de faire quelques rappels.

### II.1. Définitions (12) (13)

#### II.1.1. L'antigène

Un antigène est une substance capable de se combiner avec un anticorps spécifique. La partie de l'antigène qui se lie à l'anticorps et qui lui est spécifique est appelée site antigénique ou déterminant antigénique ou épitope.

On définit deux types d'antigène :

- Ceux qui introduits chez l'homme ou l'animal induisent la production d'anticorps spécifiques. Ils sont appelés immunogènes.

- Ceux qui introduits chez l'homme ou l'animal n'induisent pas la production d'anticorps spécifiques. Ce sont des haptènes.

### II.1.2. Les anticorps

Quand on injecte à un animal une substance immunogène, il y a synthèse par les plasmocytes et lymphocytes de molécules glycoprotéiques, capables de se combiner spécifiquement avec l'immunogène. Ces molécules sont appelées anticorps ou, immunoglobulines.

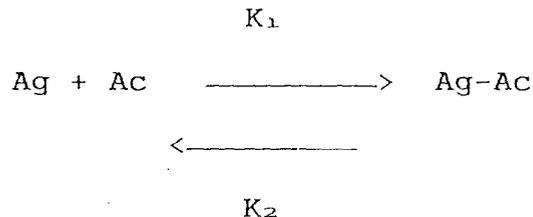
La partie de la molécule qui se lie à l'antigène est appelée site anticorps.

Il existe cinq classes d'immunoglobulines qui sont les Ig A, Ig D, Ig E, Ig G, Ig M.

### II.1.3. Réaction antigène-anticorps

Dès que l'antigène est mis en présence son anticorps spécifique, il s'unit avec cet anticorps.

La réaction antigène-anticorps peut-être représentée de la façon suivante:



Il s'agit d'un équilibre dynamique :  $K_1$  est la constante d'association et  $K_2$  la constante de dissociation.

$K = K_1/K_2$  est la constante d'équilibre ou d'affinité.

Les forces mises en jeu lors de la réaction antigène-anticorps sont de quatre types :

- liaisons ioniques,
- liaisons hydrogène,
- forces de Van der Waals,
- liaisons hydrophobes.

Ces forces dépendent de la proximité des molécules ; elles augmentent lorsque la distance intermoléculaire diminue. Cependant, ces forces sont insuffisantes pour assurer par elles-mêmes la cohésion des complexes antigènes-anticorps. Mais leur puissance est considérablement accrue parce qu'elles s'exercent entre deux fractions de molécules spécifiquement complémentaires : le site antigène d'une part et le site anticorps d'autre part. Plus la concordance entre ces deux sites est étroite, plus la liaison antigène-anticorps est puissante.

La réaction antigène-anticorps subit l'influence du milieu dans lequel se fait la réaction.

Les facteurs essentiels sont le pH et la concentration. Leurs effets dépendent de l'antigène et de l'anticorps mis en jeu.

La température joue un rôle à la fois sur la constante d'affinité et sur la vitesse de réaction antigène-anticorps.

## II.2. Les méthodes d'analyse quantitatives basées sur la réaction antigène-anticorps (14) (15)

Ces méthodes sont basées sur la quantification du complexe antigène-anticorps. Pour cela, il est nécessaire de marquer soit l'antigène, soit l'anticorps. Nous pouvons le faire grâce à un isotope radioactif, une enzyme, ou un fluorophore. Dans le cas de la radioanalyse, c'est la première possibilité qui est utilisée.

Les méthodes d'analyse peuvent être classées en deux groupes :

- les méthodes par compétition (ou défaut d'anticorps),
- les méthodes non compétitives (ou excès d'anticorps) ou immunoradiométriques.

### II.2.1. Les méthodes par compétition

Dans le milieu réactionnel, il y a :

- un anticorps (Ac) dirigé contre un antigène (Ag),
- l'antigène stable (Ag) ou froid,
- l'antigène marqué (Ag\*).

L'anticorps est en quantité inférieure à celle de l'antigène stable et de l'antigène marqué réunis. Il y a alors compétition entre l'antigène stable et l'antigène marqué, pour la formation du complexe antigène-anticorps, vis-à-vis des sites anticorps.

Dans le milieu réactionnel, nous avons donc en présence Ag-Ac, Ag\*-Ac, Ag\*, Ag.

L'augmentation de la concentration en antigène froid entraînera l'augmentation de la concentration en complexe Ag-Ac au détriment de la formation du complexe Ag\*-Ac.

Cependant, les concentrations respectives de Ag\*-Ac et Ag restent dans le même rapport que les concentrations de Ag-Ac et Ac, quelque soit la concentration en antigène marqué et en antigène stable.

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

Pour déterminer la concentration d'une solution en antigène froid, il suffit donc d'établir une courbe d'étalonnage à l'aide de solutions standards de concentration connue en antigène froid (15).

Les grandeurs portées en ordonnée peuvent être indistinctement : la radioactivité de la fraction libre (F) ou liée (B) ou les rapports B/F, B/T, B/Bo (ce dernier cas étant le plus fréquemment rencontré).

### II.2.2. Les méthodes immunoradiométriques

C'est la méthode utilisée pour le dosage de la rénine active.

Dans ce cas, la réaction antigène-anticorps se fait en présence d'un excès d'anticorps. La molécule marquée est non plus l'antigène mais l'anticorps.

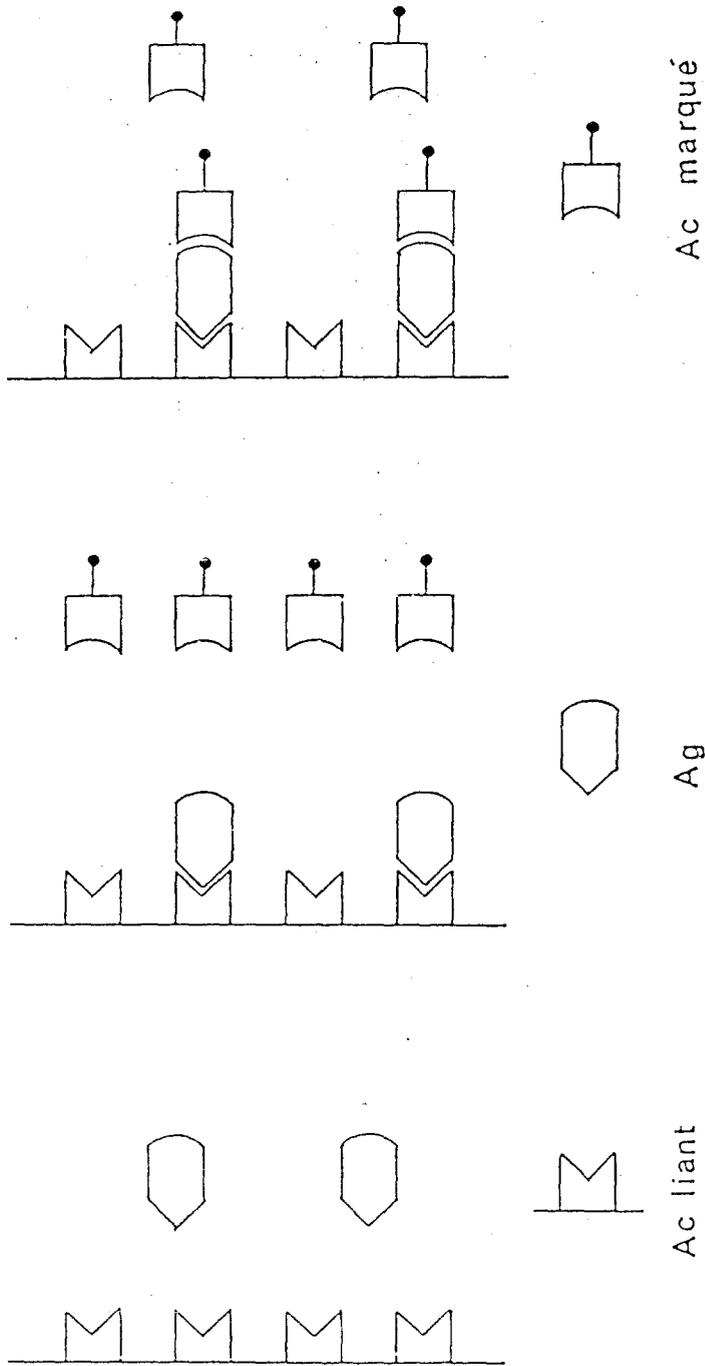
Le premier anticorps est fixé sur un support solide (phase solide magnétique dans le cas du dosage IRMA de la rénine) à une concentration supérieure à celle de l'antigène à doser. Il est appelé anticorps liant. Le premier anticorps est dirigé contre la rénine mais n'est pas spécifique de la rénine active. L'antigène (la rénine) va alors se fixer sur les sites anticorps.

On introduit un deuxième anticorps qui est spécifique de la rénine active et donc dirigée vers un épitope différent du précédent. Cet anticorps est marqué par un isotope radioactif (de l'iode 125 dans notre cas). Cet anticorps est aussi en excès. Il va se fixer sur la rénine qui va être prise en sandwich entre les deux anticorps (figure n°6). C'est cet aspect imagé qui a inspiré le nom de la méthode.

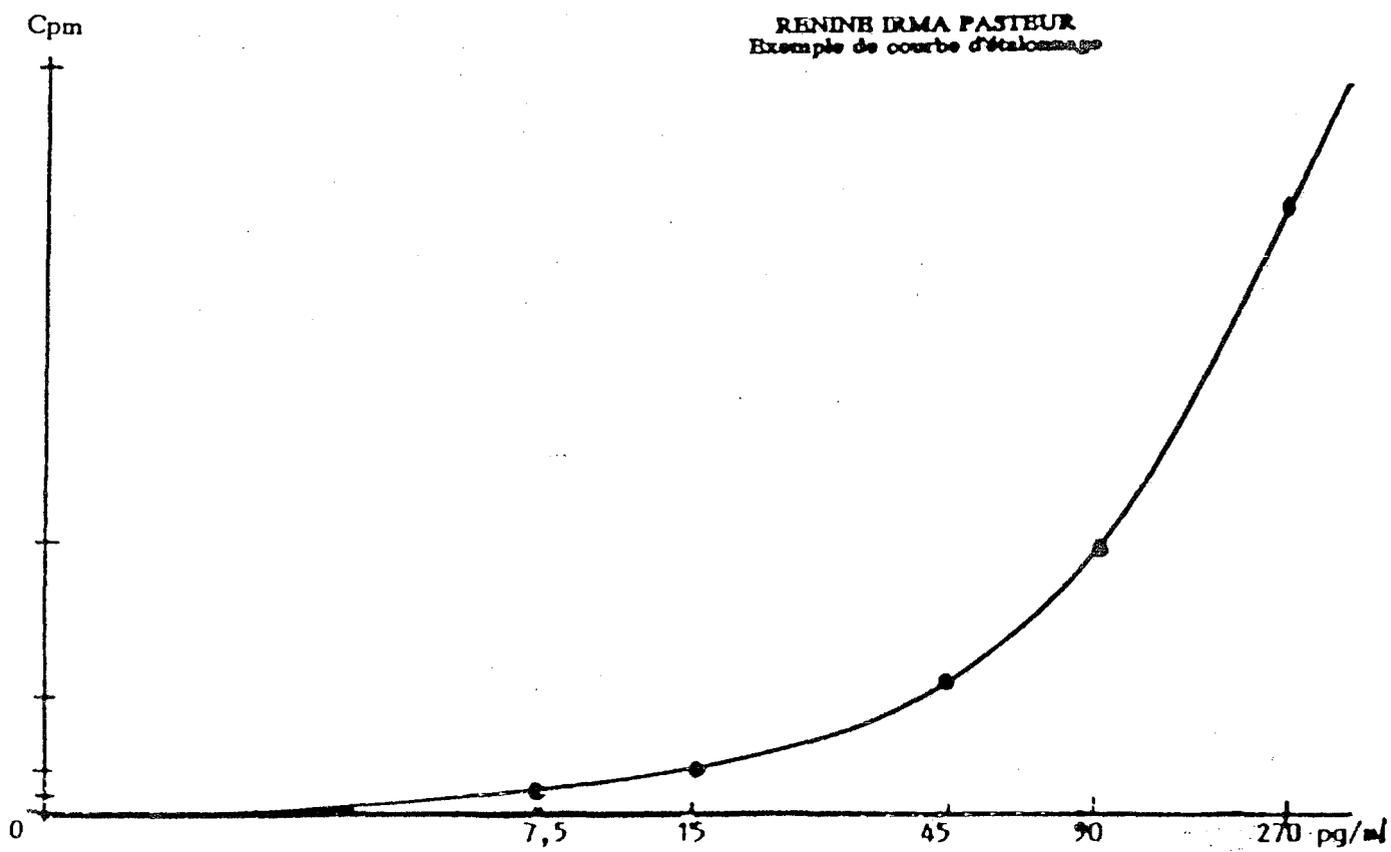
Les deux anticorps ne réagissant pas avec le même déterminant antigénique, il faut donc disposer d'anticorps liants et marqués qui possèdent des sites anticorps dirigés contre des épitopes différents. C'est pour cela que les anticorps monoclonaux sont particulièrement intéressants dans le cas des

méthodes radioimmunométriques puisqu'ils sont spécifiques d'un épitope donné.

Après lavage et une séparation du complexe  $\text{Ac-Ag-Ac}^*$  des autres composants du milieu, nous pourrions mesurer la radioactivité de ce complexe. Comme dans la méthode précédente, nous établirions une courbe d'étalonnage à l'aide de solutions standards de concentration connue en antigène (cf figure n° 7). Ceci nous permettra de connaître la concentration d'un échantillon inconnu.



-figure 6- (14)



-figure 7- (16)

### III - MATERIEL ET METHODE (16)

#### III.1. Prélèvement des échantillons

- Le prélèvement peut être effectué sur sérum ou plasma E.D.T.A..
- Si le dosage ne peut pas être effectué dans les quatre heures qui suivent le prélèvement, il doit être congelé à - 20° C. Après décongélation, le plasma doit être agité et centrifugé pour éviter toute trace de fibrine.
- Il ne faut pas :
  - congeler et décongeler plusieurs fois un même échantillon,
  - utiliser les échantillons hémolysés ou lipémiques,
  - conserver les échantillons à + 4° C (ceci peut entraîner une activation de la prorénine en rénine).

### III.2 Réactifs contenus dans la trousse

-Phase solide magnétique: liquide , prêt à l'emploi ( 1 flacon de 25 ml).

Ce flacon contient le premier anticorps monoclonal anti-rénine couplé à des particules magnétiques en suspension en tampon Imidazole qui contient en plus de la gélatine et un conservateur.

Remarque: ce réactif doit être distribué sous agitation constante.

-Traceur: liquide, prêt à l'emploi ( 1 flacon de 25 ml).

Ce flacon contient le second anticorps monoclonal anti rénine active marqué à l'iode 125. L'anticorps est dilué en tampon Tris qui contient aussi du sérum de cheval et un conservateur. Le flacon contient 260 +- 40 kBq d'anticorps anti-rénine à la date du marquage.

-Solution de lavage concentrée 40 fois ( 1 flacon de 25 ml).

Elle contient du tampon Imidazolé concentré. le contenu doit être dilué dans 975 ml d'eau distillée.

-Sérums de contrôle: lyophilisés ( 2 flacons de 2 ml).

Ils contiennent du sérum humain additionné d'un conservateur.

Ils doivent être repris par 2 ml d'eau distillée.

-Etalon zéro ou diluant, liquide, prêt à l'emploi ( 1 flacon de 3 ml).

Il contient du tampon Imidazolé, du sérum de cheval, un conservateur et un colorant. Ce réactif est utilisé pour le standard zéro et pour la dilution des échantillons de concentration élevée en rénine.

-Sérums étalons, liquides, prêts à l'emploi ( 5 flacons de 1 ml).

Ils contiennent du sérum de singe calibré par rapport à la préparation de rénine MRC (1 pg =  $1,6 \cdot 10^{-6}$  GU), du sérum de cheval, un conservateur et un colorant.

Les concentrations exactes sont les suivantes:

7,5-15-45-90-270 ng/l.

-Matériel annexe

- Micropipettes automatiques et embouts jetables,
- Eprouvette graduée,
- Tubes à usage unique,
- Agitateur horizontal de type Magnélia,
- Portoir et règle aimantée Magnélia,
- Agitateur magnétique et barreau aimanté,
- Compteur Gamma calibré pour la détection de l'iode 125,
- Eau distillée.

### III.3. Mode opératoire

Il s'agit donc d'une méthode sandwich, utilisant deux anticorps monoclonaux sélectionnés pour leur spécificité, avidité et complémentarité.

- Le premier anticorps monoclonal est immobilisé sur une phase solide magnétique (microperles). Il est dirigé contre la prorénine : l'épitope est sur le profragment libéré après activation de la prorénine en rénine.

- Le second anticorps monoclonal, marqué à l'iode 125, reconnaît spécifiquement le site catalytique de l'enzyme. C'est ce deuxième anticorps qui rend le dosage spécifique de la rénine active.

Le dosage est réalisé sur 250 µl de plasma obtenu à partir d'un prélèvement réalisé sur E.D.T.A..

Les différentes étapes sont (Figure n°8) :

- incubation de deux heures à température ambiante (18 à 25° C) et sous agitation en présence du premier anticorps monoclonal en excès ( $A_{cm1}$ ) immobilisé sur la phase solide magnétique (PSM) et de l'échantillon,

- lavage puis séparation de la phase solide magnétique par aimantation et élimination du surnageant,

- incubation de trois heures en présence des complexes immobilisés sur la phase solide magnétique et d'un excès du deuxième anticorps monoclonal marqué à l'iode 125 ( $A_{cm2-}^{125I}$ ). Les conditions d'incubation restent les mêmes que précédemment,

- lavage et séparation de la phase solide magnétique pour éliminer le traceur non fixé,

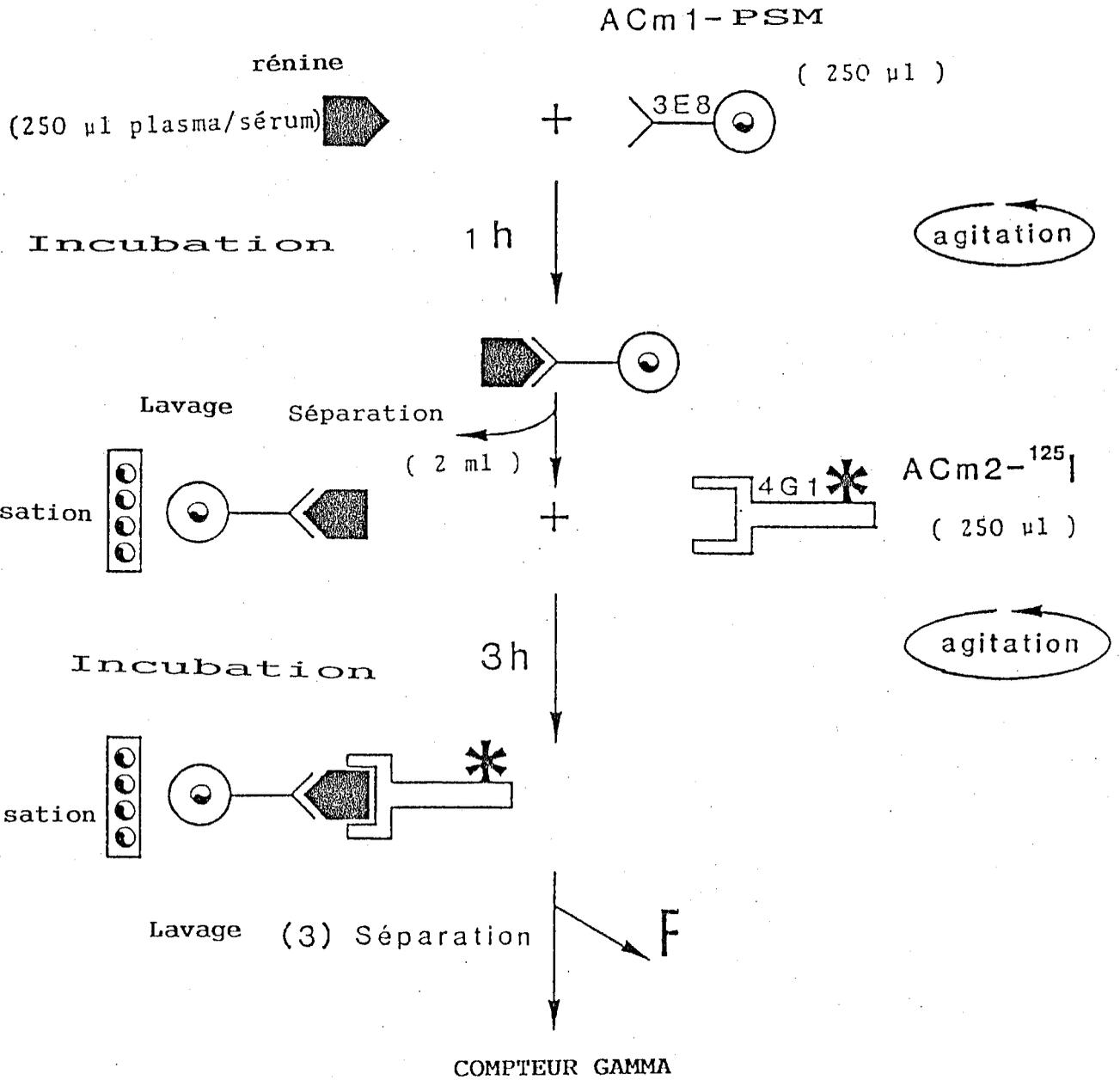
- détermination de la radioactivité de la fraction liée à l'aide d'un passeur d'échantillon en spectrophotométrie gamma.

#### III.4. Calcul des résultats

Dans les méthodes de radioimmunoanalyse, la réponse obtenue n'est pas une fonction simple de la concentration. La méthode doit être calibrée grâce à une courbe d'étalonnage. Il faut donc trouver un modèle mathématique de traitement de cette courbe.

Le micro-ordinateur relié au compteur gamma utilise une fonction spline de lissage. C'est une méthode empirique qui calcule l'équation d'une courbe ( ayant la forme d'une lame élastique); on n'impose pas au tracé de la courbe de passer par les points expérimentaux, cette liberté étant toutefois contrôlée par un facteur dit de lissage.

### RENINE IRMA



-figure 8 - (17)

## IV . AUTRES METHODES D' EVALUATION DE LA RENINE

### IV.1 Description (3) (17)

Le dosage de la rénine, nous l'avons vu, constitue une innovation puisqu'il s'agit de la première trousse mise sur le marché capable de doser cette protéine. Cependant il existait une autre méthode d'investigation du système rénine-angiotensine. Cette méthode est appelée mesure de l'activité rénine plasmatique ou A.R.P. Elle était antérieurement utilisée dans notre laboratoire. Elle dose la quantité d'angiotensine I libérée quand le plasma est incubé seul, dans les conditions physicochimiques qui optimisent la réaction enzymatique entre l'enzyme (la rénine active) et son substrat (l'angiotensinogène).

Ce dosage est réalisé en trois étapes:

- blocage de l'activité enzymatique de la rénine par le froid (4°C) et/ou congélation après centrifugation.
- réaction enzymatique où l'angiotensine I est libérée par action de la rénine dans le plasma sur l'angiotensinogène.
- dosage de l'angiotensine I par radioimmunologie à l'aide d'anticorps polyclonaux.

#### IV.2 Inconvénients de la méthode par rapport au dosage de la rénine active.

Le problème majeur posé par cette méthode est qu'elle est dépendante d'une activation enzymatique préalable, et doit être réalisée dans des conditions de température, pH, et durant un laps de temps contrôlé.

Par ailleurs, le résultat de la mesure de l'ARP dépend de la concentration plasmatique en angiotensinogène. En effet, le  $K_m$  de la rénine est du même ordre que la concentration circulante en angiotensinogène ( $10^{-6}$  M). La concentration endogène en substrat va donc influencer la production d'angiotensine I. Pour une même concentration en rénine, la libération d'angiotensinogène I décroît quand la concentration d'angiotensinogène est réduite et vice versa.

Chez des sujets normaux, l'angiotensinogène n'est pas un facteur limitant de la production d'angiotensine I et l'ARP est directement proportionnelle au nombre de molécules actives de rénine.

En revanche, en cas d'anomalie de l'angiotensinogène, ce qui est fréquemment le cas pour les malades chez qui on explore le système rénine angiotensine, l'ARP ne sera plus étroitement corrélé à la rénine active. La concentration en angiotensinogène est en fait augmentée au cours de la corticothérapie et de l'exposition aux oestrogènes. Elle est par contre abaissée lors d'un traitement aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion et dans les cirrhoses.

Le dosage de la rénine active ne présente pas ces inconvénients et, de plus, possède les avantages suivants:

-il permet un gain de temps par rapport à celui de l'ARP puisque les résultats peuvent maintenant être disponibles en 24 heures.

-il possède une meilleure spécificité : les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux.

-Les résultats obtenus sont standardisés. Ceci permet une comparaison entre les laboratoires ce qui n'était pas le cas auparavant.

2EME PARTIE

EVALUATION ANALYTIQUE  
DE LA TROUSSE  
DE DOSAGE

Une trousse de dosage, avant d'être introduite sur le marché, a fait l'objet d'une expertise réglementaire visant à mettre en évidence ses qualités analytiques :

- reproductibilité
- exactitude
- limite de détection
- spécificité.

Il est ensuite utile de vérifier que les résultats annoncés par le fabricant, relatifs aux performances de la trousse, sont équivalents à ceux obtenus dans le laboratoire où elle sera utilisée en routine: cette vérification fait l'objet de cette deuxième partie.

Il faut aussi effectuer régulièrement un contrôle dit de routine qui permet de s'assurer

- de la bonne qualité et de la bonne conservation des réactifs,
- de l'homogénéité des différents lots de réactifs fournis par le laboratoire fabricant,
- de l'exécution correcte du mode opératoire,
- de la maintenance au cours du temps des critères établis lors de l'expertise analytique.

## I. REPRODUCTIBILITE

### I.1. Définition (18) (19)

Un dosage est dit reproductible si lorsqu'on le répète plusieurs fois sur des échantillons identiques, on obtient des résultats très voisins. On distingue :

#### I.1.1. la reproductibilité intraessai

Elle est déterminée en répétant plusieurs fois le dosage d'un même échantillon, dans les mêmes conditions opératoires (même expérimentateur, même matériel, mêmes réactifs, même compteur...). Cette notion de reproductibilité est très voisine de la notion de précision.

#### I.1.2. la reproductibilité interessai

Elle est déterminée en répétant plusieurs fois le dosage d'un même échantillon dans des conditions opératoires différentes (opérateur différent, matériel différent, jour différent, lot de réactifs différents).

La reproductibilité est estimée à l'aide de l'écart-type intra ou interessai et du coefficient de variation intra ou inter essai exprimé en pourcentage.

## I.2. Résultats du fabricant (16)

### I.2.1. Reproductibilité intraessai

Trois échantillons de sérum ont été dosés vingt fois au cours d'une même série de dosage. La valeur moyenne, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 1 .

### I.2.2. Reproductibilité interessai

Quatre échantillons de sérum ont été dosés quarante cinq fois, à chaque fois dans des séries différentes. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 2.

TABLEAU N° 1

REPRODUCTIBILITE INTRASERIE : RESULTATS DU FABRICANT

	m valeur moyenne (mg/l)	Ecart type	CV %
E <sub>1</sub> n = 20	13,3	0,8	6
E <sub>2</sub> n = 20	79	2,8	3,6
E <sub>3</sub> n = 20	274	8,4	3

TABLEAU N° 2

REPRODUCTIBILITE INTERSERIE : RESULTATS DU FABRICANT

	Moyenne (en mg/l)	Ecart type	CV %
D <sub>1</sub> n = 45	22,7	2	9
D <sub>2</sub> n = 45	58,8	4,7	8
D <sub>3</sub> n = 45	81,8	4,7	5,7
D <sub>4</sub> n = 45	167	10	6

### I.3. Résultats expérimentaux

#### I.3.1. Principe du calcul (15)

Pour évaluer la reproductibilité intra et interessai, nous avons procédé de la façon suivante: nous avons effectué sur un même échantillon ou un même pool de sérums un dosage en double ou en triple dans k séries de dosages (k théoriquement au moins égal à 10).

En utilisant la technique d'analyse de variance, on extrait de la variabilité totale, la variabilité intra ou interessai selon le résultat recherché. On calcule ainsi les écarts types intra ou interessai qui divisés par la moyenne des résultats obtenus donneront les coefficients de variations intra ou interessai correspondants.

### I.3.2. Reproductibilité intrasérie

La variance intraessai est donnée par la formule :

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{(T_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum y_{ij})^2}{N}}{N-k}$$

k est le nombre de séries de dosages réalisées pour un échantillon,

$n_i$  est le nombre de dosages réalisés sur un échantillon lors de la  $i^{\text{ème}}$  série de dosage (dans notre cas  $i = 2$  ou  $3$ ),

N est le nombre total de mesures réalisées sur un échantillon, soit  $n_i * k$

$y_{ij}$  est la valeur mesurée dans la série n°i, répétition n°j,

$T_i$  est la somme des valeurs obtenues pour un échantillon lors dans la série n°i,

Pour un nombre k de séries de dosage, on en déduit l'écart-type intrasérie s, racine carrée de la variance  $s^2$

Le coefficient de variation intrasérie est :

$$C.V = 100(s/\text{moy})$$

moy étant la moyenne des valeurs mesurées soit  $\frac{\sum y_{ij}}{N}$

### I.3.3. Reproductibilité intersérie

Dans ce cas, la technique d'analyse de variance permet d'extraire de la variabilité totale la variabilité intéressai.

-La variance intersérie est ainsi donnée par la formule:

$$S^2 = \frac{1}{k-1} \left[ \begin{array}{cc} \sum_{i=1}^k T_i^2 & T_G^2 \\ n_i & N \end{array} \right]$$

où  $T_G = \sum_{i=1}^k T_i$

-L'écart type intersérie  $S$  est alors la racine carrée de la variance intersérie  $S^2$

-Le coefficient de variation intersérie est égal à :

$$C.V = 100(S/\text{moy})$$

#### I.3.4 Résultats

Nous avons évalué la reproductibilité intrasérie et intersérie du dosage IRMA de la rénine sur:

- deux sérums de contrôle

C<sub>1</sub> à un taux annoncé de 38 ng/l de rénine. Il a été dosé dans k=11 séries de dosage, à raison de 2 ou 3 répétitions dans chaque série.

C<sub>2</sub> à un taux annoncé de 81 ng/l, mesuré dans les mêmes conditions que C<sub>1</sub>.

- deux pools de sérums provenant de malades hospitalisés au CHRU de Grenoble :

- le premier S<sub>1</sub> de concentration faible en rénine (aux alentours de 6 ou 7 ng/l) a été mesuré au cours de onze séries de dosages.

-le deuxième S<sub>2</sub> de concentration moyenne en rénine (environ 30 ng/l) a été dosé dans les mêmes conditions que S<sub>1</sub>.

Les résultats figurent dans les tableaux n° 3 et 4.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

TABLEAU N°3

LA REPRODUCTIBILITE INTRASERIE

Sérums	Moyenne (ng/l)	s (ng/l)	C.V. (%)
C <sub>1</sub>	38,8	3,5	9,0
C <sub>2</sub>	81,5	5,9	7,2
S <sub>1</sub>	6,3	1,4	22,9
S <sub>2</sub>	28,1	2,8	9,8

TABLEAU N°4

LA REPRODUCTIBILITE INTERSERIE

Sérums	Moyenne (ng/l)	s (ng/l)	C.V. (%)
C <sub>1</sub>	38,8	7,1	18,3
C <sub>2</sub>	81,5	10,1	12,4
S <sub>1</sub>	6,3	2,1	33,3
S <sub>2</sub>	28,1	7,0	24,9

### I.3.5. Conclusion

En ce qui concerne la reproductibilité intrasérie, les valeurs expérimentales sont satisfaisantes, même si elles se révèlent plus élevées que celles annoncées par le fabricant. Seul le pool de sérum S<sub>1</sub> de concentration 6,5 ng/l possède un coefficient de variation élevé (22,9%), ce qui montre une insuffisance de précision du dosage dans cette zone de concentration. Ceci ne pose pas de problèmes majeurs aux cliniciens qui dans la plupart des cas n'ont pas besoin de valeurs précises du taux de rénine pour des concentrations inférieures à 15 ng/l.

Pour la reproductibilité intersérie, les coefficients de variation obtenus pour les sérums de contrôle sont satisfaisants.

Par contre ils sont beaucoup trop élevés pour les deux pools de sérums. Ces derniers résultats peuvent s'expliquer par la dégradation des sérums au cours de leur conservation, d'autant que si nous avons observé une homogénéité des valeurs trouvées pour les premières séries, il n'en est pas de même pour les dernières. Ceci nous montre l'importance des conditions de conservation des sérums, et la nécessité de réaliser rapidement le dosage de rénine active après le prélèvement.

## **II . EXACTITUDE**

### **II.1. Définition**

Le résultat d'un dosage d'une substance quelconque présente dans un échantillon est exact si la valeur trouvée est très voisine de la vraie valeur de la concentration de la substance contenue dans l'échantillon. Il s'agit d'une qualité qu'il est difficile de mesurer puisque la vraie valeur est par définition inconnue.

### **II.2. Méthodologie**

L'exactitude d'une méthode de dosage est évaluée classiquement à travers deux tests : le test de dilution et le test de récupération.

#### **II.2.1. Test de dilution**

Il est aussi appelé test de parallélisme.

Nous utilisons un échantillon de concentration élevée (ou bien le standard le plus élevé de la gamme d'étalonnage) sur lequel nous effectuons différentes dilutions. On réalise alors le dosage sur le plus grand nombre possible d'aliquotes pour chaque dilution.

Le rapport valeur mesurée/valeur attendue, mesurée en pourcentage, doit être le plus proche possible de 100 %.

### II.2.2. Test de récupération

Il est aussi appelé test de recouvrement ou test de surcharge.

On utilise un échantillon de faible concentration en antigène. Cet échantillon va être surchargé avec des quantités connues précisément et croissantes en antigène, de façon à couvrir toute la gamme d'étalonnage.

Nous calculons alors le pourcentage de récupération :

$$\frac{\text{Valeur mesurée de la surcharge}}{\text{Valeur théorique de la surcharge}} \times 100$$

Ce pourcentage doit être compris entre 80 et 120 %.

### II.3. Résultats annoncés par le fabricant

#### II.3.1. Test de dilution

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 5.

#### II.3.2. Test de récupération

Les résultats obtenus figurent dans le tableau n°6.

RESULTATS DU FABRICANT

TABLEAU N°5

TEST DE DILUTION

	Dilution	Valeur mesurée	Valeur attendue	Valeur mesurée / valeur attendue
C 296 pg/ml	1/2	147,0	148,0	99,0
	1/4	77,0	74,0	104,0
	1/8	38,4	37,0	104,0
	1/16	20,4	18,5	110,0
C 162 pg/ml	1/2	86,9	81,0	107,0
	1/4	43,9	40,5	108,0
	1/8	21,6	20,25	106,0
	1/16	9,3	10,1	92,0

TABLEAU N°6  
TEST DE RECUPERATION

	Surcharge théorique	Valeur mesurée	% récupération
A 54 pg/ml	256	302	97
	128	174	96
	64	121	102
	32	82,5	96
B 30 pg/ml	256	289	101
	128	150	95
	64	93	99
	32	56	90

## II.4 Résultats expérimentaux

### II.4.1 Test de dilution

#### Mode opératoire

Nous effectuons des dilutions à partir d'un sérum à forte concentration en rénine (environ 250 ng/l).

Il s'agit de dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.

Ces dilutions se font dans le standard 0 comme le préconise le laboratoire fabricant.

Il faut noter que nous n'effectuons pas de dilutions en cascade afin de ne pas additionner les erreurs.

Chaque dilution est dosée cinq fois et nous avons calculé le rapport valeur mesurée /valeur attendue.

#### Résultats

Ils sont rapportés dans le tableau n° 7 .

TABLEAU N°7

TEST DE DILUTION

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Dilution	Valeur mesurée moyenne (ng/l)	Valeur attendue (ng/l)	Valeur mesurée ----- Valeur attendue (en%)
1/1	260,0		
1/2	128,2	130,0	98,6
1/4	64,4	65,5	98,3
1/8	32,1	32,7	98,2
1/16	20,6	16,4	125,6
1/32	6,5	8,2	79,3
1/64	3,5	4,1	85,4
1/128	1,5	2,0	74,0

### Conclusion

Les pourcentages obtenus sont tout à fait satisfaisants pour des facteurs de dilution de 1/2, 1/4, 1/8, ce qui confirme les résultats annoncés par le fabricant.

Pour les facteurs de dilution plus élevés, les pourcentages de récupération sont beaucoup moins satisfaisants, variant entre 74% et 125%, ce qui s'explique en partie par le fait que nous avons pour les zones de concentrations correspondantes une reproductibilité peu satisfaisante.

## II.4.2. Test de récupération

### Mode opératoire

- Un pool de sérums de faible concentration a été préparé à partir de sérums de malades hospitalisés au CHRU de Grenoble.

- La valeur moyenne de la concentration en rénine a été déterminée à partir de cinq dosages : elle est de 20,4 ng/l.

- Une quantité constante de ce pool a été surchargée de la manière suivante :

1. 0,625 ml de pool + 0,625 ml du standard 7,5
2. 0,625 ml de pool + 0,625 ml du standard 15
3. 0,625 ml de pool + 0,625 ml du standard 45
4. 0,625 ml de pool + 0,625 ml du standard 90
5. 0,625 ml de pool + 0,625 ml du standard 270

Pour chaque surcharge, le dosage a été réalisé cinq fois et on calcule le pourcentage de récupération qui est égal à :

$$\frac{\text{Surcharge mesurée}}{\text{Surcharge ajoutée}} \times 100$$

### Résultats

Ils sont rapportés dans le Tableau n° 8 .

TEST DE RECUPERATION  
RESULTATS EXPERIMENTAUX

Surcharge théorique (ng/l)	Valeur mesurée	Surcharge mesurée (ng/l)	% Récupération
3,75	12,2	2	54
7,5	16,2	6	80
22,5	32	21,8	97
45	54,3	44,1	98
135	143,9	133,6	99

tableau 8

### Conclusion

Les pourcentages de récupération obtenus sont tout à fait satisfaisants, en moyenne de 98% pour des concentrations supérieures à 20 ng/l, confirmant les résultats annoncés par le fabricant.

Par contre, pour des concentrations faibles en rénine (< 15 ng/l), les pourcentages de récupération sont faibles (< 80 %). Ceci confirme le peu d'exactitude du dosage IRMA de la rénine dans cette zone de concentration. Cependant, nous avons déjà noté que ceci ne posait pas de problèmes majeurs pour les cliniciens.

### III. LIMITE DE DETECTION (20) (21)

(22)

Un autre critère permettant de juger la qualité d'une méthode d'analyse est sa capacité à détecter et à mesurer de très faibles concentrations de la substance dosée.

#### III.1. Définition

La limite de détection est aussi appelée sensibilité au voisinage de zéro, minimum détectable, seuil de détection...

Si il existe un consensus sur le concept de limite de détection, il s'agit en effet de la plus petite concentration mesurable par une méthode analytique ; il n'en est pas de même en ce qui concerne sa définition et son mode d'évaluation.

Pour la SFBC, il s'agit du plus petit signal exprimé en concentration, qui peut être distingué, avec une probabilité donnée, d'un blanc réaction. Robbard définit la "dose minimale détectable" comme "la dose" pour laquelle la réponse attendue est statistiquement différente de la réponse attendue pour un blanc ou un zéro.

### III.2. Modalités pratiques de détermination de la limite de détection

L'évaluation de la limite de détection que nous avons utilisée est préconisé par la SFBC. Celle ci nécessite la connaissance de l'écart type des blancs ce qui permet calculer la valeur de la limite de détection. Celle-ci sera exprimée tout d'abord en signal, puis en concentration.

#### III.2.1 Estimation de l'écart type des blancs

Nous avons plusieurs possibilités :

### III.2.1.1 Répétition du blanc dans une seule série

L'écart type  $S_b$  est donné par la relation suivante :

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_b} (y_{bi} - \bar{y}_b)^2}{N_b - 1}}$$

avec  $y_{bi}$  : valeur du blanc pour le dosage n°i

$\bar{y}_b$  : valeur moyenne des blancs

$N_b$  : nombre de dosage du blanc

Cette méthode présente l'avantage d'être la plus rapide puisqu'elle nécessite une seule série de dosages.

Par contre, elle peut conduire à une sous estimation ou une sur estimation de l'écart type selon que la série de dosages correspondante est satisfaisante ou non.

### III.2.1.2 Dosage du blanc en double dans N séries

Dans ce cas, le calcul d'analyse de variance permet d'extraire la variabilité intrasérie de la variabilité totale. En fait, elle conduit à utiliser la différence entre les deux déterminations  $y_{b1}$  et  $y_{b2}$  effectuées pour le blanc dans une série. L'écart type est donné par la formule :

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{b1} - y_{b2})^2}{2N}}$$

N : nombre de séries dans lesquelles le blanc é été dosé.

Cette méthode permet d'éviter les inconvénients précédents en répétant les mesures dans plusieurs séries mais demande un délai relativement long.

### III.2.2 Calcul de la limite de détection

#### III.2.2.1 Limite de détection exprimée en signal

La limite de détection exprimée en signal est donnée par la formule suivante :

$$L_y = t(\alpha, \mu) \text{ Sb} \sqrt{\frac{1}{n_b} + \frac{1}{n_y}}$$

où:

-Sb écart type des blancs.

- $t(\alpha, \mu)$  est la variable de Student. Elle est fonction du risque  $\alpha$  (le risque  $\alpha$  est la probabilité de conclure que l'échantillon contient de l'antigène alors qu'il n'en contient pas en réalité) et du nombre de degré de libertés  $\mu$  (le nombre de degrés de liberté est égal au nombre de mesures effectuées pour déterminer l'écart type des blancs diminué de 1).

$t(\alpha, \nu)$  est donc lié à la méthode utilisée pour estimer Sb.

- $n_b$  et  $n_y$  correspondent au nombre de dosages effectués sur les échantillons inconnus lors des séries de routine (généralement  $n_b = n_y = 2$ ).

Cette valeur est donc liée au protocole utilisé en routine.

### III.2.2.2 Limite de détection exprimée en concentration

L'expression mathématique de la limite de détection  $L$  exprimée en concentration est alors:

$$L = \frac{L_y}{P}$$

avec  $L_y$  : limite de détection exprimée en signal

$P$  : pente initiale de la courbe calculée entre les deux premiers points de la gamme d'étalonnage.

$$P = \frac{Y_1 - Y_0}{C_1}$$

avec  $Y_1$ : signal moyen du standard 1 de concentration  $C_1$

$Y_0$ : signal moyen du standard 0.

### III.2.3 Méthode utilisée

Pour calculer l'écart type des blancs, nous avons choisi une détermination par mesure du blanc dans  $N$  séries successives car c'est une méthode donnant une bonne estimation de la limite de détection, facile à mettre en oeuvre et parce que nous disposons d'un délai suffisant.

### III.3. Résultats annoncés par le fabricant (16)

Pour une probabilité de 95 %, elle est égale à 3,5 pg/ml  
( le mode mathématique d'évaluation n'est pas précisé).

### III.4. Résultats expérimentaux

- Le nombre de séries a été fixé à 30,

- Le risque  $\alpha$  est fixé à 1 % afin d'obtenir une estimation réaliste de la limite de détection,

- les mesures du blanc et du premier point standard de la gamme ont été faites en double dans chacune des 30 séries de dosage.

- coordonnées moyennes des signaux obtenus sur les deux premiers points de la courbe

- signal moyen du standard 0

$$Y_0 = 255$$

- signal moyen du standard 1

$$Y_1 = 478$$

- concentration du standard 1

$$C_1 = 7,5 \text{ mg/l}$$

- calcul de la pente initiale de la courbe

$$Y_1 - Y_0$$

$$p = \frac{Y_1 - Y_0}{C_1} = 29,7$$

$$C_1$$

- écart type des blancs  $S_b$

$$S_b = \frac{\sum (Y_{b1} - Y_{b2})^2}{2N} = 50,2$$

- la valeur de  $K$  est pour les paramètres fixés précédemment

$$n_y = n_b = 2$$

$$\alpha = 1 \%$$

$$K = 2,3$$

La limite de détection est donc égale à :

$$L_o = \frac{K \cdot S_b}{P} = 2,3 * 1,69 = 3,9 \text{ ng/l}$$

### III.5 Conclusion

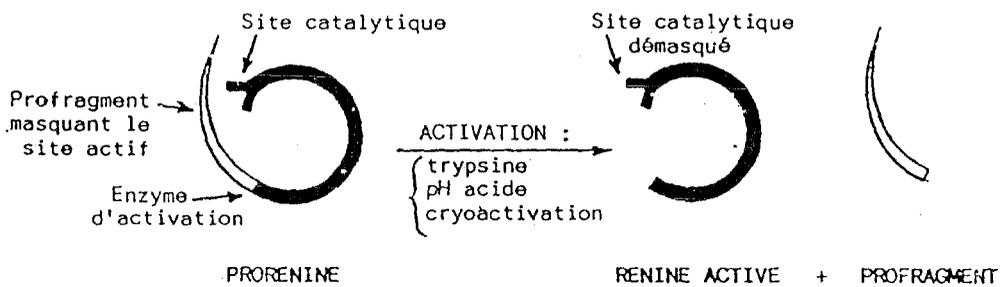
La limite de détection que nous avons calculé (3,9 ng/l) est légèrement supérieure à celle annoncée par le fabricant (3,5ng/l). Cependant ces résultats sont difficilement comparables puisque le mode de calcul employé par ce dernier n'est pas spécifié. Dans les deux cas, la limite de détection du dosage est tout à fait satisfaisante.

#### IV. SPECIFICITE (3) (19)

Une méthode de dosage d'une substance est spécifique si aucune autre substance, même de structure très voisine ne perturbe pas le dosage et n'en modifie pas l'exactitude.

Il aurait été intéressant de faire cette étude avec de la prorénine, molécule proche de la rénine active au point de vue immunologique. Malheureusement, nous ne disposons pas de cette substance au laboratoire.

Cependant d'après le fabricant, la méthode utilisée est complètement spécifique de la rénine active car le second anticorps utilisé (anticorps marqué) reconnaît le site actif de l'enzyme, qui est masqué quand celle ci est sous forme de prorénine (figure n°9)



-figure 9- (3)

## CONCLUSION

Il apparaît à travers les différents résultats obtenus que la trousse de rénine répond de façon satisfaisante pour des zones de concentrations supérieures à 15 ng/l en rénine aux critères de qualité nécessaires: reproductibilité, exactitude, sensibilité, spécificité.

Nous n'exposerons pas ici les méthodes utilisées pour réaliser le contrôle de routine, contrôle nécessaire pour s'assurer de la maintenance des qualités de la trousse de dosage et du déroulement correct du mode opératoire.

Nous noterons simplement qu'il est effectué d'une part, en contrôlant l'allure de la courbe standard, d'autre part et principalement en introduisant, dans la manipulation des sérums de contrôle.

Le contrôle de qualité analytique ne suffit pas à apprécier la validité d'une méthode de dosage, il faut aussi s'assurer de son intérêt au niveau clinique: ce sera l'objet de la troisième partie.

3EME PARTIE

INTERET CLINIQUE

DU DOSAGE DE

LA RENINE

Dans cette troisième partie, nous allons nous intéresser à l'intérêt clinique du dosage de la rénine active.

Dans un premier temps, nous ferons un recensement exhaustif des indications possibles du dosage de la rénine.

Nous verrons ensuite quelles sont les précautions à prendre pour permettre une interprétation correcte des résultats.

Dans un troisième temps, nous étudierons les schémas exacts dans lequel s'introduit le dosage de la rénine pour le diagnostic de certaines pathologies.

Enfin dans une dernière partie expérimentale, nous chercherons à mettre en évidence l'intérêt clinique de ce dosage.

## I. INDICATIONS DU DOSAGE DE LA RENINE

Nous avons vu précédemment que la rénine est un des facteurs clés de la régulation de la pression artérielle et du métabolisme hydrosodé.

L'intérêt de son dosage réside dans le bilan et la conduite thérapeutique de l'hypertension artérielle (22).

### I.1. Les hypertensions artérielles avec hypokaliémie

- Une hypokaliémie peut être :

\* d'origine médicamenteuse (prise de diurétiques hypokaliémisants, abus d'alcalins ou de réglisse),

\* accidentelle (diarrhée ou vomissements importants).

- En dehors de ces deux cas, une hypertension artérielle, associée à une hypokaliémie, traduit un hyperaldostéronisme primaire ou secondaire, que la mesure de la rénine active permet de différencier (nous verrons suivant quel schéma dans le chapitre suivant)

## I.2. La maladie rénovasculaire

Chaque fois que la pression artérielle diastolique est supérieure à 110 mm Hg, il est nécessaire de doser la rénine pour dépister une hypertension rénovasculaire. Il faut cependant noter que le diagnostic repose sur les résultats de l'angiographie rénale.

Par ailleurs en cas de maladie rénovasculaire, la mesure du gradient de rénine permet de connaître la curabilité chirurgicale

## 1.3. Cancer associé à une hypertension artérielle

Dans ce cas, on cherche à mettre en évidence une production ectopique de rénine

## I.4. Autres cas

- Quand un traitement antihypertenseur ne donne pas de résultats satisfaisants,

- dans les hypertensions artérielles non traitées : le dosage de rénine permet d'informer le patient d'une étiologie éventuelle de son hypertension artérielle et d'autre part d'orienter le clinicien dans son traitement. Ainsi un taux faible de rénine en position debout orientera de préférence vers les diurétiques ou les inhibiteurs calciques, tandis qu'un taux élevé orientera plutôt vers les bêtabloquants ou les inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

## II. PRECAUTIONS A PRENDRE LORS DU DOSAGE DE LA RENINE ACTIVE

Deux types de facteurs peuvent influencer la libération de rénine : des facteurs physiologiques d'une part, et pharmacologique d'autre part. Les conditions de prélèvement doivent donc être contrôlées avec soin.

### II.1. Facteurs physiologiques

#### II.1.1. L'âge

La rénine est inversement corrélée à l'âge.

Le tableau des valeurs normales (voir tableaux n°9 et 10) fourni par E.R.I.A. diagnostic PASTEUR est donc établi en fonction de l'âge des patients.

#### II.1.2. Le cycle nyctéméral

Les dosages seront effectués entre sept heures et dix heures, afin de standardiser les résultats.

VALEURS NORMALES " RENINE ACTIVE " chez l'adulte.

AGE	n	m (pg/ml)	limite
	DEBOUT		
20-30	16	24	7,5-42,5
30-40	10	21	7-41
40-50	12	16	7-25,5
50 +	12	14	3,5-29
	COUCHE		
20-30	16	12,5	7-18
30-40	10	12,5	7-18
40-50	12	9,5	3,5-17,5
50 +	12	9,5	3,5-17,5

96 % de la population a des valeurs comprises entre 7 et 40,5 en position debout  
92 % de la population a des valeurs comprises entre 7 et 19 en position couchée.

-Tableau n°9- (16)

RENINE ACTIVE : VALEURS NORMALES EN FONCTION DE L'AGE  
CHEZ L'ENFANT EN ACTIVITE

Classe d'âge	Cas	AGE (mois)		RENINE ACTIVE (ng/l)	
		m	D.S.	m	D.S.
6 mois	17	3,4	1,7	69,8	50
6 mois-3 ans	27	18,3	8,3	84,1	53,4
3 ans-6 ans	20	53,8	10,3	51	23,4
6 ans-10 ans	22	95,5	13,6	39,5	22,4
10 ans-16 ans	27	157	19	31	18,7

Valeurs moyennes (m) et déviation standard (D.S.) de la RENINE ACTIVE en fonction de l'âge de l'enfant normal. (16)

Dernière colonne : significativité entre classes successives par le test de Student.

### II.1.3. La position et l'activité physique

La rénine s'élève à l'orthostatisme et à l'exercice. Les standardisations habituelles sont, pour la mesure basale, le matin à huit heures et, pour la mesure en stimulation après une heure de déambulation.

### II.1.4. Les apports sodés

La rénine inversement liée aux apports sodés. Il faut donc s'assurer d'une alimentation modérément salée (environ 6 g de NaCl par 24 heures) en mesurant la natriurèse des 24 heures.

### II.1.5. Le cycle menstruel et la grossesse

Il y a augmentation de la rénine au cours de la grossesse et de la seconde phase du cycle. Dans la mesure du possible, on effectuera donc les dosages au cours de la première phase du cycle.

## II.2. Facteurs pharmacologiques

La plupart des antihypertenseurs modifient le système rénine angiotensine aldostérone.

- Les diurétiques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion stimulent le système rénine angiotensine. Ils doivent donc être supprimés quinze jours avant son dosage (un mois pour les antialdostérone et les spironolactones) ;

- les vasodilatateurs (dihydralazine, minoxidil) le stimulent mais à un degré moindre ;

- les bêtabloquants inhibent le système rénine angiotensine ainsi que les antihypertenseurs centraux (clonidine, méthildopa). Ces derniers ont une action plus faible.

### III. INTERET DU DOSAGE DE LA RENINE DANS LE DIAGNOSTIC DE CERTAINES PATHOLOGIES

Après avoir découvert une hypertension artérielle, le médecin doit réaliser un bilan biologique élémentaire et un examen clinique minutieux.

En effet, cette exploration va lui permettre (23) :

- de rechercher une éventuelle hypertension artérielle secondaire: en effet, si les hypertensions secondaires représentent moins de 5 % des patients hypertendus, la découverte de ces étiologies permet d'envisager un traitement curatif.

- d'apprécier le retentissement de cette hypertension artérielle sur l'organisme ;

- d'apprécier le profil de risque cardio-vasculaire du patient ;

- de décider d'un traitement éventuel.

L'étape de dépistage s'adresse donc à tous les hypertendus et se compose d'un interrogatoire, d'un examen clinique et d'un bilan biologique.

Le bilan biologique minimum défini par l'O.M.S. comporte :

- le dosage de :

- \* la créatinémie,
- \* la kaliémie,
- \* la cholestérolémie,
- \* la glycémie,
- \* l'uricémie ;

- la recherche :

- \* d'une protéinurie,
- \* d'une hématurie,
- \* d'une glycosurie.

La présence de certains signes fera envisager une étiologie possible à l'hypertension artérielle. On procédera alors à des examens complémentaires destinés à confirmer le diagnostic (tableau n° 11 pour les valeurs normales).

TABLEAU DES VALEURS NORMALES

VALEURS PLASMATIQUES  
(sang)

	ANCIEN SYSTEME	UNITES INTERNATIONALES
Sodium	3,17-3,26 g/l	138-142 mmol/l
Potassium	0,137 à 0,2 g/l	3,5 à 5,1 mmol/l
Créatinine	5 à 12 mg/l	45 à 106 mmol/l
Acide urique	homme : 25 à 70 mg/l femme : 15 à 60 mg/l	homme : 149 à 416 µmol/l femme : 89 à 357 µmol/l
Aldostérone		111 à 333 pmol/l

VALEURS URINAIRES  
(urines des 24 heures)

	ANCIEN SYSTEME	UNITES INTERNATIONALES
Sodium	100 à 300 mEq	100 à 300 mmol
Potassium	50 à 100 microEq /24 h	50 à 100 µmol
Cortisol		120 à 280 nmol
Aldostérone		10,8 à 12,6 nmol

### III.1. Diagnostic de l'hyperaldostéronisme

#### III.1.1. L'hyperaldostéronisme (24)

L'hyperaldostéronisme est caractérisé par une hypersécrétion d'aldostérone. Il y a donc élévation du taux plasmatique d'aldostérone, associée à une augmentation de l'excrétion urinaire de l'aldostérone ou des ses métabolites. L'aldostérone entraînant une rétention hydrosodée et une fuite de potassium, on a donc augmentation de la pression artérielle.

Le dosage de la rénine est utilisé dans le diagnostic de l'hyperaldostéronisme primaire, de la sténose de l'artère rénale et dans le phéochromocytome. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons particulièrement aux deux premières pathologies ;

On distingue deux types d'hyperaldostéronisme :

- les hyperaldostéronismes primaires : l'anomalie primitive est une tumeur ou une hyperplasie surrénalienne ;
- les hyperaldostéronismes secondaires où l'hypersécrétion d'aldostérone est secondaire à une hyperactivité du système rénine angiotensine.

L'hyperaldostéronisme primaire peut être dû à :

- un adénome unilatéral d'une surrénale (adénome de Conn) dont l'ablation entraîne généralement la guérison: c'est le syndrome de Conn ;

- une hyperplasie bilatérale de la glomérulée des surrénales. L'exérèse chirurgicale entraîne rarement une guérison complète. Ce type d'hyperaldostéronisme primaire est aussi appelé hyperaldostéronisme idiopathique.

### III.1.2. Examens de dépistage (23) (25)

Le diagnostic d'hyperaldostéronisme primaire doit être suspecté en présence d'une hypertension artérielle et d'une hypokaliémie. D'autres signes peuvent être associés. Ils sont cependant souvent d'apparition tardive et peu spécifiques. Il s'agit de paresthésies, d'asthénie, de crampes...

Si une hypokaliémie est dépistée (seuil  $< 3,8$  mmol/l), il faut en premier lieu rechercher une cause banale d'hypokaliémie (voir paragraphe II.1. ). Il est alors indispensable de la confirmer par un nouveau dosage (30 % des patients sont alors exclus).

D'autres éléments peuvent alors orienter vers un hyperaldostéronisme primaire :

- natrémie et réserve alcaline discrètement élevées;
- uricémie normale ;
- natriurèse supérieure à 100 mmol/l ;
- kaliurèse supérieure à 40 mmol/24 h.

### III.1.3. Diagnostic de l'hyperaldostéronisme primaire

Il repose sur la vérification de l'hyperaldostéronisme et de son caractère autonome:

- Aldostérone plasmatique le matin à jeun après une heure de repos en position allongée, supérieure à 150 pg/ml ;

- rénine active : elle est effondrée. Cependant, elle est stimulée par l'orthostatisme. Il est évident que les précautions relatives au dosage citées dans le paragraphe I doivent être respectées

Après confirmation de l'hyperaldostéronisme, il faut réaliser le diagnostic différentiel entre syndrome de Conn et l'hyperaldostéronisme idiopathique. C'est l'objet du paragraphe suivant.

### III.1.4. Comment reconnaître un adénome d'une hyperplasie ? (23) (25)

Deux types d'exams sont à la disposition du praticien : les tests hormonaux dynamiques et les exams localisateurs de l'hypersecretion d'aldostérone

#### III.1.4.1. Les tests hormonaux dynamiques

Leur fondement est lié au postulat qui dit que les tumeurs ne sont pas freinables alors que la régulation persiste en cas d'hyperplasie.

Dans le cas d'une hyperplasie, on a, en effet, stimulation de sécrétion de rénine et freination de la sécrétion d'aldostérone après l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (50 mg de captopril). De même, on a freination de la sécrétion d'aldostérone par une charge hydrosodée faite en deux heures.

Un seuil de 100 pg/ml d'aldostérone après charge en sel a été retenu mais il faut garder à l'esprit qu'il existe des faux négatifs et des faux positifs.

Les tests dynamiques ne constituent donc qu'un argument modeste de classification et doivent être complétés par d'autres examens.

#### III.1.4.2. Les tests localisateurs

Ils sont au nombre de quatre :

- la scintigraphie au iodocholestérol marqué à l'iode 131, après freinage de sept jours par la dexaméthasone (4 mg/jour pendant quinze jours) et saturation en iode de la thyroïde par le lugol ;

- le scanner surrénalien ;
- la phlébographie surrénalienne avec traitement digitalisé de l'image ;
- le prélèvement d'aldostérone et de cortisol dans les veines surrénaliennes.

Le dosage du cortisol a pour but de calculer le rapport aldostérone/cortisol dans les veines surrénaliennes et ainsi de corriger une éventuelle dilution par du sang d'origine extrasurrénalienne.

### III.1.5. La stratégie pour affirmer le diagnostic étiologique

Quand le scanner surrénalien trouve une tumeur unilatérale de diamètre supérieur ou égal à dix centimètres, hypodense, un geste chirurgical est proposé (adénome de Conn).

Le diagnostic de latéralisation est également proposé si :

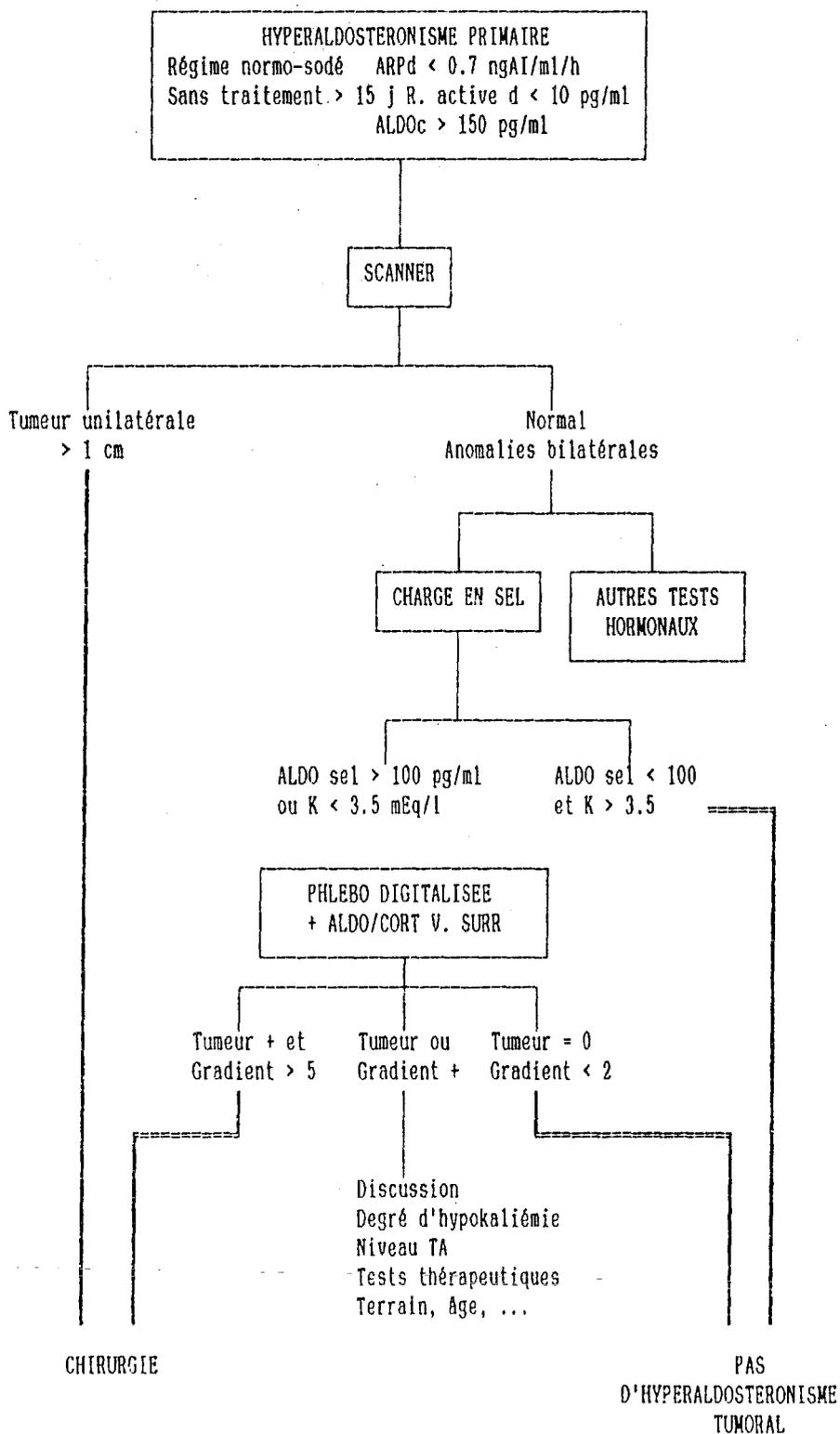
- l'aldostérone plasmatique est peu freinée lors d'une charge en sel ;
- la kaliémie est franchement abaissée. Dans ce cas, l'examen de choix est alors la phlébographie surrénalienne numérisée (voir paragraphe précédent).

Le diagnostic est alors porté, quand il existe un rapport aldostérone/cortisol élevé, dans la veine surrénalienne affectée par rapport à la veine controlatérale (cf figure n°11 : arbre décisionnel dans le diagnostic d'hyperaldostéronisme primaire).

Il faut cependant retenir que toutes les publications sur le sujet s'accordent pour dire que le diagnostic reste difficile à établir, malgré toutes les techniques existantes. D'autant plus que ces dernières permettent de détecter des très petites anomalies sur les surrénales, lesquelles ne sont pas forcément responsables de l'hypertension artérielle.

ARBRE DECISIONNEL DANS LE DIAGNOSTIC D'UN HYPERALDOSTERONISME PRIMAIRE

Contexte évocateur : HTA plus kaliémie < 3.5 mEq/l



Arbre diagnostique pour l'hyperaldostéronisme (17)

### III.2. Diagnostic de l'hypertension artérielle rénovasculaire

#### III.2.1. L'hypertension artérielle rénovasculaire

L'hypertension artérielle rénovasculaire ne peut être définie "stricto sensu" que de manière rétrospective : toute hypertension artérielle permanente associée à un obstacle significatif sur la voie artérielle rénale, guérie ou améliorée de manière significative par la levée de l'obstacle.

L'hypertension rénovasculaire présente deux composantes essentielles:

L'une physiopathologique :

- hypersécrétion unilatérale de rénine,
- anomalies unilatérales de l'excrétion de l'eau et du sodium qui sont le reflet des modifications hémodynamiques intrarénales en aval de la sténose.

L'autre anatomopathologique :

- la présence d'une lésion sténosante sur une voie artérielle rénale. Cette lésion est de nature athéromateuse dans deux tiers des cas, fibreuse dans un tiers des cas.

La prévalence de l'hypertension rénovasculaire est très discutée (27). Selon certains articles, elle atteindrait 32 % des hypertensions artérielles de type III et IV, tandis que selon d'autres estimations, cette prévalence serait inférieure à 1 %.

L'hypertension artérielle rénovasculaire constitue néanmoins la plus fréquente des hypertensions artérielles curables et pour la majorité des auteurs, cette fréquence est de l'ordre de 3 à 5 %.

### III.2.2. Examens de dépistage

Des examens complémentaires (qui feront l'objet du paragraphe suivant) devront être réalisés, en vue de la recherche d'une hypertension rénovasculaire de l'artère rénale (à la suite du bilan minimum précédemment effectué), dans les cas suivants (2) (23) (26) :

- En présence d'une hypertension sévère à début brutal chez le sujet jeune (particulièrement chez les femmes d'une trentaine d'années) ou chez le sujet d'âge moyen (homme de cinquante ans).

L'installation brutale de l'hypertension artérielle ne peut être affirmée que quand on possède des chiffres de pression artérielle récents et normaux, recueillis par exemple au cours d'examens systématiques.

- En présence d'une hypertension artérielle déjà connue mais récemment aggravée. Ce fait correspond à une sténose artérielle significative développée chez un patient jusque là considéré comme atteint d'hypertension essentielle.

- En présence de lésions vasculaires extrarénales : artériopathie des membres inférieurs, insuffisance coronarienne, souffle carotidien ou abdominal, claudication intermittente.

- En présence d'une hypertension réfractaire au traitement antihypertenseur, d'une élévation de la créatinine au cours d'un traitement par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

- Enfin en présence d'une hypokaliémie qui s'intègre dans un tableau d'hyperaldostéronisme secondaire : potassium inférieur ou égal à 3,5 mmol/l, sodium inférieur à 135 mmol/l et présence éventuelle d'un alcalose. Ce tableau clinique est rare mais suggestif.

### III.2.3. Diagnostic de l'hypertension artérielle rénovasculaire (23) (26) (27) (28)

Cette étape, réalisée à la suite de la précédente, s'adresse à une minorité d'hypertendus, c'est-à-dire à ceux présentant les signes d'une hypertension artérielle rénovasculaire. Elle sera spécifiquement orientée vers la recherche de cette pathologie.

L'étape diagnostique a été simplifiée. En effet, la néphro-urotomographie intraveineuse constituait la méthode de dépistage usuelle, fondée sur la latéralisation des signes indirects : asymétrie de taille, asymétrie dans la néphrographie, asymétrie dans le temps d'opacification des calices, asymétrie dans la concentration du produit opaque, asymétrie dans l'évacuation. Cette méthode méconnaissait les sténoses bilatérales dont la prévalence atteindrait 25 %.

L'angiographie numérisée par voie intraveineuse a vu ses indications élargies. Elle utilise de faibles quantités de produit de contraste iodé et les avantages de la soustraction d'images numérisées.

L'angiographie numérisée doit mettre en évidence les deux ostiums rénaux par des clichés de face et en oblique antérieur gauche, explorer l'aorte sous-rénale et comporter une parenchymographie recherchant un retard d'opacification d'un rein, d'un segment de rein ou d'une irrégularité de ses contours. Elle peut être potentialisée par l'administration préalable de captopril. En effet, l'inhibition de l'enzyme de conversion provoque au niveau du rein sténosé une chute de la filtration glomérulaire par crise de l'autorégulation glomérulaire, alors que le flux sanguin rénal est conservé ; du côté opposé, le flux sanguin augmente et la filtration n'est pas altérée.

Cette technique présente, par rapport à la précédente, une meilleure sensibilité(88%) et une meilleure spécificité(89%). Mais elle possède également plusieurs inconvénients :

- d'une part, son coût est élevé,
- d'autre part, les faux négatifs et les faux positifs atteignent 10 %,
- enfin, la qualité des images est très inégale.

C'est pourquoi certains auteurs préconisent la réalisation d'emblée d'une angiographie numérisée par voie artérielle de meilleure qualité. Cependant, cette technique d'investigation, bien que d'agressivité limitée possède l'inconvénient de nécessiter l'hospitalisation du malade.

#### III.2.4. Etape d'imputation de l'hypertension artérielle rénovasculaire

Il s'agit ici de déterminer la contribution de la ou les sténoses artérielles rénales au syndrome hypertensif. En effet, des études menées par Holley et Al. ont montré que parmi les patients trouvés porteurs d'une sténose des artères rénales, 66 % étaient normotendus. L'association d'une sténose des artères rénales et d'une hypertension artérielle peut donc être fortuite.

### III.2.4.1. Etude de la fonction endocrine rénale

La mesure de la rénine périphérique ne peut-être proposée comme test de dépistage d'imputation dans l'hypertension rénovasculaire car elle expose à trop d'erreurs par excès ou par défaut.

L'élévation de l'activité rénine plasmatique systémique témoigne du caractère rénine dépendant de l'hypertension, mais elle n'est retrouvée que dans 60 % des cas de sténose unilatérale.

En dépit d'une activité rénine basse, une asymétrie de sécrétion de rénine entre les deux reins est retrouvée dans plus de 50 % des cas, dans les cas de sténose asymétrique.

De même, la mesure de la rénine active circulante après administration de captopril, ne peut, en raison d'un important chevauchement des valeurs entre le groupe de patients présentant une hypertension artérielle essentielle et celui présentant une hypertension artérielle rénovasculaire, constituer un test d'imputation.

D'après Baert et Al.(28), il serait possible de prédire le résultat tensionnel après angioplastie des artères rénales en mesurant la baisse de tension artérielle après un traitement chronique au captopril. Mais l'utilisation chronique d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion chez les patients atteints d'hypertension artérielle rénovasculaire présente des risques importants pour le rein malade. On ne retiendra donc pas cette méthode.

La latéralisation de l'hypersécrétion de rénine est affirmée dans 67 % des cas de sténose unilatérale (29) par la mesure du gradient des concentrations de rénine entre les deux veines rénales qui doit être au moins égal à 1,5 en faveur du côté sténosé. Ce test est sensibilisé par la prise unique d'une dose de captopril avant les prélèvements.

En cas de latérisation, on associe une valeur prédictive positive de curabilité de 92 %. Cependant, 65 % des patients qui n'ont pas de latéralisation sont cependant améliorés par une revascularisation (22).

Svetken et Al. (30) attribuent à ce test selon les études une sensibilité de 50 à 93 % et une spécificité variant de 33 à 63 %. Pour l'équipe du Docteur Denolle, la sensibilité serait supérieure à 80 % et la spécificité serait de 20 à 100 %.

#### III.2.4.2. Etude de la fonction d'excrétion rénale

Il est important d'évaluer la fonction rénale pour deux raisons :

- la revascularisation est plus difficilement envisageable dans le cas d'une atteinte terminale que celui d'une atteinte modérée de la fonction rénale,

- l'urographie intraveineuse ou de façon plus actuelle la scintigraphie rénale, potentialisées par le captopril constituent aussi un test d'évaluation performant au niveau de la sensibilité (87 % à 91 %), beaucoup moins au niveau de la spécificité (20 à 100 %) (30).

Selon Svetkey et Al.(22), à l'heure actuelle, la seule façon de s'assurer qu'une sténose des artères rénales est responsable de l'hypertension artérielle est de corriger la sténose et mesurer l'effet

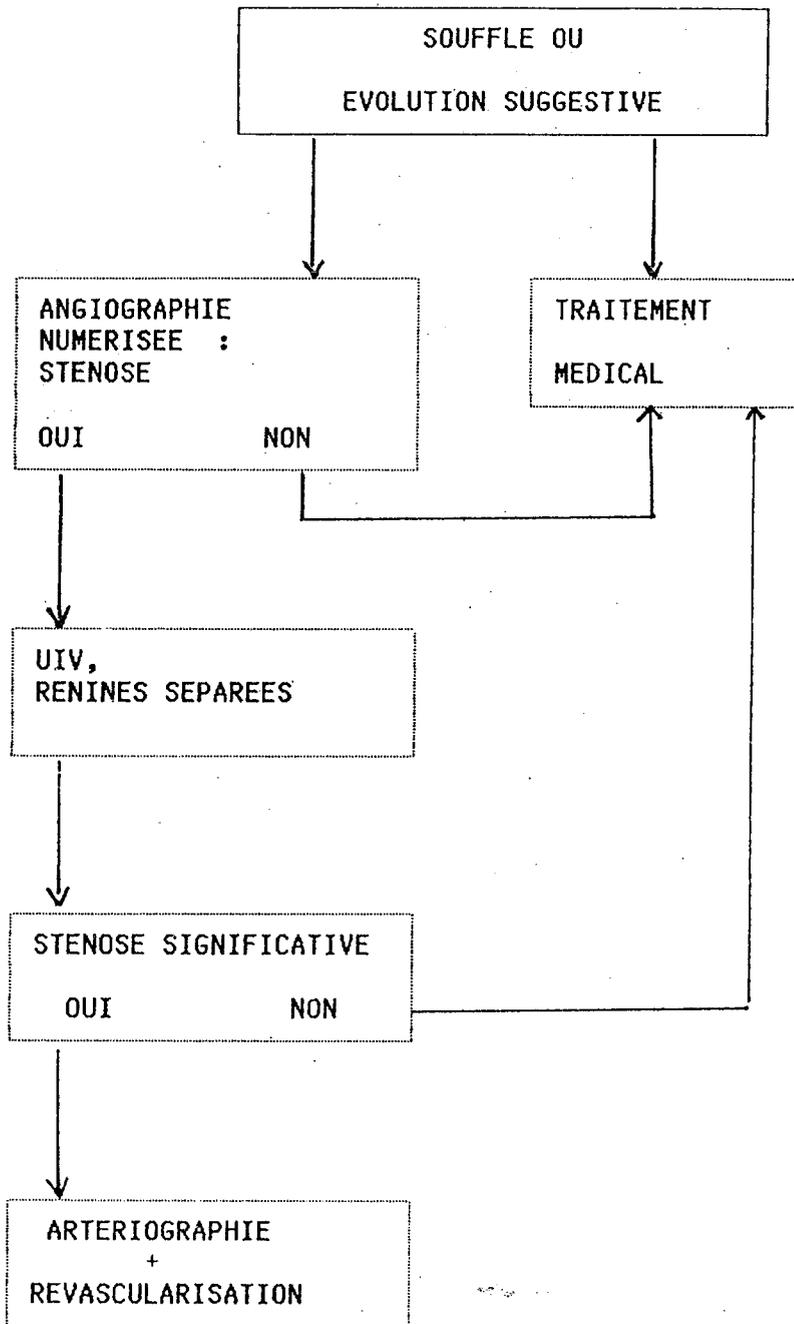
de l'intervention sur la pression artérielle.

D'autres équipes (22) sont plus optimistes. Certaines d'entre elles utilisent la scintigraphie rénale comme test de dépistage.

L'équipe du Docteur Denolle (service d'hypertension et de médecine interne) de l'Hôpital Broussais (Paris) utilise l'angiographie numérisée comme test diagnostique. La scintigraphie rénale est utilisée comme test d'imputation. Le traceur utilisé est soit le DTPA, soit l'hippuran. Cette scintigraphie est réalisée avant et après prise unique de captopril pour montrer le rôle éventuel du système rénine angiotensine dans le maintien de la filtration glomérulaire en aval de la sténose.

L'échographie rénale et l'urographie permettent de préciser l'aspect et la taille des reins, étape préalable à toute tentative de revascularisation.

De même, il est nécessaire d'évaluer la fonction cardiaque, l'état artériel des membres inférieurs, et de rechercher une insuffisance coronarienne. Il s'agit en effet d'éléments déterminants dans la conduite thérapeutique.



Arbre diagnostique pour l'hypertension rénovasculaire (17)



## **IV. ETUDE EXPERIMENTALE**

### **IV.1 Introduction**

Comme nous l'avons vu lors de l'étude bibliographique, le dosage de la rénine active est utilisé dans le diagnostic d'une étiologie éventuelle à une hypertension.

Dans l'étude expérimentale, notre objectif est de montrer l'apport clinique de ce dosage pour les médecins de l'hôpital de Grenoble.

### **IV.2 Echantillonnage et méthode**

#### **IV.2.1 Echantillonnage**

Nous avons procédé de la façon suivante pour choisir les patients rentrant dans notre échantillon:

Dans un premier temps, nous avons sélectionné les patients pour lesquels était demandé un dosage de la rénine dans le cadre d'un bilan d'hypertension. Dans ce cas, la demande d'examen provenait obligatoirement du service de Cardiologie et Médecine Interne de l'hôpital.

Dans un deuxième temps, nous avons pris contact avec ce service afin de consulter les dossiers cliniques des patients. Nous avons pu ainsi connaître de façon précise le diagnostic étiologique de l'hypertension.

L'échantillon que nous avons ainsi réuni est constitué à partir de 20 sujets, 11 hommes, 9 femmes, âgés de 26 à 88 ans avec une moyenne d'âge de 52,0 ans et un écart type de 15,3 ans.

Les dossiers se répartissent de la façon suivante après diagnostic:

-14 hypertensions essentielles

-6 hyperaldostéronismes.

Ces malades ont tous subi une exploration pour hyperaldostéronisme.

#### IV.2.2 Méthode

Les cliniciens du service de cardiologie utilisent un arbre diagnostic lorsqu'ils suspectent un hyperaldostéronisme chez un patient. Un exemplaire est fourni page 103.

Il comporte cinq étapes qui sont:

-bilan de dépistage avec un ionogramme sanguin et urinaire.

Si le potassium est inférieur à 3,5 mEq/l, cette valeur doit être confirmée par un second dosage. Si c'est le cas, on passe alors à l'étape suivante.

-bilan hormonal.

En cas d'hyperaldostéronisme, on doit avoir:

-rénine effondrée .

-aldostérone supérieure à la normale.

-scanner surrénalien.

Il peut mettre en évidence une tumeur témoignant d'un adénome de Conn.

-bilan hormonal après charge en sel et/ou captopril.

-dosages étagés surrénaliens pour mettre en évidence le lieu de l'hypersécrétion de rénine.

Ce schéma suit donc celui proposé dans l'étude bibliographique. Le scanner surrénalien, le bilan hormonal après charge en sel et/ou captopril et les dosages étagés surrénaliens sont des tests localisateurs qui servent à déterminer si l'hyperaldostéronisme est primaire ou secondaire. Le bilan hormonal est quant à lui utilisé pour le diagnostic de l'hyperaldostéronisme.

## DIAGNOSTIC DES HYPERALDOSTERONISMES

Nom :

Prénom :

Age :

### BILAN HTA : DEPISTAGE

iono sang (sans garrot)	date	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	RA	Créat.	Acide urique
admission						
contrôle						

(K < 3.5 mmol : éliminer diurétiques, laxatifs, réglisse, diarrhée, vomissements, puis contrôler)

SI K<sup>+</sup> < 3.5 est vérifié

iono urines	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
24h		

**BILAN HORMONAL** (15 jours arrêt tout traitement, 1 mois pour spironolactones - régime normosodé - convoquer la veille du dosage par le laboratoire)

+ HOLTER TA systématique

Date :	couché (8h)	1h ortho (9h)	4h ortho (12h)
Rénine Active (pg/ml)	(7 à 19)	(7 à 40.5)	
Aldostérone (pmoles/l)	(222 ± 111)		

(RA)

Urines /24h	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
valeur (nmoles/12h)		

Cortisolurie (nmoles/24h)	Aldostéronurie (nmoles/24h)
(200 ± 80)	(18.9 ± 8)

Si aldo/et RA  $\downarrow$  + stimuable par orthostatisme  
 hyperaldostéronisme primaire

Si aldo/et RA  $\downarrow$  (patho. vasc. rénale?)

### SCANNER SURRENALIEN (date : / / )

Résultat :

Si normal ou anomalie bilatérale

si non normal de TA

### CHARGE EN SEL

Protoc : 2 litres salés iso en 2h, dynamap.

date:	couché (8h)	ortho 1h (9h)	charge sel (11h)	iono sang	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Rénine active				8h		
Aldostérone				11h		

Aldostérone

Si aldo non freinée (> 145 pmoles/l) et/ou K < 3.5 adénome de CONN ?

Si aldo freinée (< 145 et/ou K > 3.5)

Hyperplasia surrénale ?

SI RA stimulée

TA avant :

TA minimale :

SI RA non stimulée adénome de CONN ?

### Test au captopril (50 mg)

	avant	1h après	2h après
RA			
Aldostérone			

### DOSAGES ETAGES SURRENALIENS

	Aldostérone	Rénine	Cortisol	rapport aldo/cortisol (Normal < 2, patho > 5)
v.surr./rénale G				
v.surr./rénale D				
VCI sus-rénale				
VCI sous-rénale				

Angiographie :

### AUTRE EXAMEN

scinti iodocholestérol

RMN

+ HOLTER TA sous traitement systématique

### IV.3 Résultats expérimentaux

#### IV.3.1 Présentation

Les résultats sont donnés dans les tableaux:

- 12 et 13 pour les hyperaldostéronismes
- 14 pour les hypertensions essentielles.

Les cliniciens ne s'intéressent pas aux valeurs ponctuelles des dosages mais aux paramètres suivants:

- pour le bilan de dépistage  
si le potassium est inférieur à 3,5 mEq/l après contrôle.

- pour le bilan hormonal:
  - si l'aldostérone est augmentée ou normale
  - si la rénine est effondrée ou normale (les valeurs normales de rénine se situent entre 7,5 et 45 ng/l. Mais ici une rénine inférieure à 15 ng/l est considérée comme effondrée: en effet il aurait fallu un dosage plus sensible pour pouvoir détecter les valeurs inférieures à 15 ng/l).

- pour le bilan hormonal après charge en sel ou captopril

- si l'aldostérone est freinée
  - et si la rénine est stimulée par rapport au dosage précédent.

- pour les dosages étagés surrénaliens
  - si les taux d'aldostérone
  - et les taux de rénine ne sont pas homogènes aux différents niveaux.

Nous procéderons donc de la même façon pour la présentation et l'analyse des résultats.

HYPERALDOSTERONISMES

CAS N°	POTASSIUM < 3,5 mEq/l APRES CONTROLE	BILAN HORMONAL		DIAGNOSTIC
		ALDOSTERONE	RENINE ACTIVE	
1	oui	> N	< 15	hyperaldo- stéronisme secondaire
2	oui	> N	< 15	hyperaldo- stéronisme secondaire
3	oui	> N	N	adénome de Conn
4	non	> N	< 15	hyperaldo- stéronisme secondaire
5	oui	> N	< 15	hyperaldo- stéronisme secondaire
6	oui	> N	< 15	hyperaldo- stéronisme

N.B. : Dans le cas n° 6, le diagnostic différentiel sera fait ultérieurement en fonction de l'évolution de la maladie.

TABLEAU 13

## HYPERALDOSTERONISMES

CAS	BILAN HORMONAL APRES CAPTOPRIL		BILAN HORMONAL APRES CHARGE EN SEL		SCANNER	DOSAGES ETAGES
	ALDOSTERONE	RENINE ACTIVE	ALDOSTERONE	RENINE ACTIVE		
1	non freinée	< 15	non freinée	< 15	normal	normal
2	non freinée	< 15	non freinée	< 15	hypertrophie modérée	non fait
3	non fait	non fait	non fait	non fait	nodule à gauche	non fait
4	non fait	non fait	non fait	non fait	normal	non fait
5	non fait	non fait	non fait	non fait	normal	non fait
6	non fait	non fait	non freinée	< 15	suspicion microadénome	non fait

HYPERTENSIONS ESSENTIELLES

CAS N°	POTASSIUM < 3,5 mEq/l APRES CONTROLE	BILAN HORMONAL	
		ALDOSTERONE	RENINE ACTIVE
7	non	> N	< 15
8	oui	N	N
9	oui	N	N
10	non	N	N
11	non	N	N
12	non	> N	N
13	non	N	< 15
14	non	N	< 15
15	oui	N	N
16	oui	N	< 15
17	non	> N	N
18	non	N	< 15
19	non	> N	< 15
20	non	N	< 15

Tableau n°14

### IV.3.2 Analyse des résultats

#### IV.3.2.1 Intérêt du dosage de la rénine active pour le diagnostic de l'hyperaldostéronisme

Nous allons déterminer pour chaque type de dosage les paramètres suivants:

-la sensibilité qui se définit comme la probabilité de test positif chez un sujet malade.

VP

Se = -----

M+

VP = nombre de sujets malades donnant un test positif.

M+ = population présentant la pathologie, ici l'hyperaldostéronisme.

-la spécificité qui se définit comme la probabilité de test négatif chez un sujet "non malade"(ici hypertension essentielle: le groupe de référence est, en effet constitué d'hypertendus).

VN

Sp = -----

M-

VN = nombre de sujets sains donnant un test négatif

M- = population ne présentant pas la pathologie

IV.3.2.1.1. Analyse des résultats du potassium

	HYPERALDOSTERONISME	HYPERTENSION ESSENTIELLE
< 3,5 mEq/l	5	4
> 3,5 mEq/l	1	10
TOTAL	6	14

-Tableau n°15-

Pour le dosage du potassium on a :

$$Se = 0,83$$

$$Sp = 0,71$$

Le dosage du potassium présente une sensibilité satisfaisante et une spécificité correcte.

Cependant, l'utilisation du dosage du potassium ne peut être qu'un élément d'orientation. En effet, si on considère le bilan potassique de dépistage, il donne une fausse orientation dans cinq cas(4;8;9;15;16): dans un cas, il est normal chez un sujet ayant un hyperaldostéronisme, et, dans quatre cas, il est inférieur à 3,5 chez des sujets atteints d'hypertension essentielle.

Ainsi il ne peut constituer à lui seul un élément diagnostique mais simplement un élément d'orientation.

C'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre l'investigation clinique en pratiquant un bilan hormonal (rénine / aldostérone)

IV.3.2.1.2 Analyse des résultats d'aldostérone

	HYPERALDOSTERONISME	HYPERTENSION ESSENTIELLE
N	0	10
> N	6	4
TOTAL	6	14

-Tableau n°16-

On a donc pour l'aldostérone:

$$Se = 1$$

$$Sp = 0,71$$

Le dosage de l'aldostérone présente une sensibilité excellente et une spécificité correcte.

IV.3.2.1.3 Analyse des résultats de rénine

	HYPERALDOSTERONISME	HYPERTENSION ESSENTIELLE
< 15	5	7
N	1	7
TOTAL	6	14

-Tableau n°17-

Nous avons alors:

$$Se = 0,83$$

$$Sp = 0,50$$

Le dosage de la rénine active présente une sensibilité tout à fait acceptable mais une spécificité moindre.

#### IV.3.2.1.4 Conclusion

Dans un premier temps, il est important de signaler que l'étude du couple rénine aldostérone a été volontairement laissée de côté. En effet la sensibilité à l'aldostérone étant égale à 1, l'apport de n'importe quel autre facteur apparaît peu nécessaire puisqu'il ne pourrait entraîner qu'une diminution de ses performances au niveau spécificité.

Dans un deuxième temps, il apparaît que, si le dosage de la rénine semble présenter un intérêt considérable au niveau théorique, il manque de spécificité pour qu'il soit considéré comme incontournable dans la pratique de tous les jours. Sa sensibilité est acceptable bien que celle de l'aldostérone soit meilleure.

Il est aussi intéressant de noter que si le dosage de la rénine semble corroborer celui de l'aldostérone il n'en est pas de même pour le potassium qui serait plutôt contradictoire: ce dernier dosage ne peut donc constituer qu'un élément d'orientation.

L'analyse de ces résultats laisse donc apparaître que, dans le diagnostic de l'hyperaldostéronisme, le dosage de l'aldostérone semble constituer l'élément diagnostic, et celui de la rénine un élément de confirmation. Il faut garder à l'esprit que cette étude a été réalisée sur un nombre très restreint de patients et que, à ce titre, elle ne peut constituer qu'un élément d'orientation ou servir de base à une étude plus importante.

CONCLUSION

Ce travail représente une mise au point qui comprend une étude bibliographique aussi exhaustive que possible sur la rénine et son dosage, l'établissement des critères analytiques liés à ce dosage, et une approche clinique effectuée à partir des résultats obtenus pour un certain nombre de patients, au dossier desquels nous avons eu accès.

Toutefois, compte tenu de la durée limitée de notre stage, et de l'échantillon limité de dosages dont nous disposions, compte tenu de l'utilisation récente de ce dosage au laboratoire, la troisième partie de notre étude ne peut fournir que des indications et servir de base à une étude plus complète.

Dans un premier temps, après quelques rappels sur les immunodosages et le système rénine-angiotensine, l'expertise analytique de la trousse de dosage de la rénine active nous a permis de constater que celle ci répond de façon satisfaisante aux critères de qualité nécessaires à son utilisation en routine pour des concentrations supérieures à 15 ng/l, à savoir: reproductibilité intra et interessais des dosages, exactitude (appréhendée à partir des tests de récupération et de dilution), et ,enfin, limite de détection.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'apport clinique du dosage de la rénine active. Nous avons recensé toutes les pathologies dans lesquelles ce dosage pouvait être indiqué. Il semble tout particulièrement intéressant dans deux types de pathologies qui sont l'hyperaldostéronisme et l'hypertension rénovasculaire, et ceci quand il est associé au dosage de l'aldostérone.

L'étude expérimentale qui a suivi a montré que, en pratique, le dosage de l'aldostérone constitue bien l'élément diagnostique primordial, alors que, celui de la rénine ne constitue qu'un élément de confirmation. Le dosage de la rénine active, si intéressant qu'il soit sur un plan théorique (il constitue, en effet, une véritable innovation et un progrès réel pour les malades et les cliniciens), se révèle décevant sur un plan pratique, en raison d'un manque de précision que nous avons mis en évidence pour les faibles concentrations (inférieures à 15 ng/l).

Une nouvelle méthode de dosage de la rénine, tout à fait analogue, mais utilisant des tubes coâtés a récemment été mise sur le marché. Nous pouvons espérer que celle ci donnera entière satisfaction, et que, par là même, le dosage de la rénine obtiendra la place qui lui revient de droit: constituer en association avec le dosage de l'aldostérone, un examen, simple et rapide, incontournable dans le diagnostic de l'hypertension rénovasculaire et de l'hyperaldéronisme.

**BIBLIOGRAPHIE**

(1) D.M. GOLDENBERG

Monoclonal antibodies

Cancer magazine; 12:18; spring 1990

(2) J.M. SUC, J.L. ADER, D. DURAND

Rein et hypertension artérielle

Encycl. Méd. Chir.; Reins-organes génitourinaires; 18066 G20  
et G30; 5-1985

(3) Documentation Diagnostic Pasteur

Implications cliniques et analytiques du dosage de la rénine

(4) G.B.M. LINDOP, D.S. GARDINER

La cellule humaine sécrétrice de rénine

Ann. End., 1986, 47, 133-144

(5) P. CORVOL, F. SOUBRIER, J. MENARD

La rénine et son intimité

1983, MCV, n° 32, p 27-33

(6) F. ALHENC GELAS

La renine en action

MCV n° 32, pp 13-21

(7) E. HACKENTAL

La sécrétion de rénine : mécanismes et effecteurs

Ann. End., 1986, 47, 145-155

(8) R. TAUGNER, C.P. BUHRLE, E. HACKENTHAL, E. MANNEK, R. NOBILING.

Morphology of juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms

Cont. Nephrol, 1984, 43, 76-101

(9) J.J. PANTHIER, S. FOOTE, B. CHAMBRAUD, A.D. STOSBERG, P. CORVOL, F. ROUGEON

Complete aminoacid sequence and maturation of the submaxillary gland renin precursor

Nature, 298, July 82.

(10) P. CORVOL

La rénine : une enzyme, une hormone, un batard ?

Ann. End. 1986, 47, 131

(11) C.F. DE SANERDENS, C.E. PRICAM, D. FERRYDOWN, F. BANICHONI, M.B. VALLOTON.

Renin synthesis, storage and release in the rat

Kidney Internatio., 1977, 2, 161-69

(12) Ph. LETONTURIER

Immunologie générale, Editions Masson 1978, p. 79-81

(13) Y. BARBIER

Aspects physicochimiques de la réaction antigène-anticorps: paramètres de la réaction.

Bases de l'immunoanalyse. Radioimmunologie et techniques associées.

Formation permanente, session III. Les éditions de l'Acomen.

(14)Y. BARBIER

Méthodes d'analyse quantitative basées sur la réaction antigène-anticorps

Bases de l'immunoanalyse. Radioimmunologie et techniques associées

Formation permanente, session III. Les Editions de l'Acomen

(15) J. LELLOUCH, P. LAZAR

Méthodes statistiques en expérimentation biologique

Médecines et Sciences, Editions Flammarion, 1974

(16) Documentation E.R.I.A. Pasteur

(17)P.F. PLOUIN, G. CHATELLIER, T.T. GUYENE, N. VINCENT, P. CORVOL

Progrès récents dans l'exploration clinique du système rénine  
Presse Méd., 1989, 18, p 917-921.

(18)Ch. A. BIZOLLON, A. FAURE

Critères et contrôle de la qualité d'un dosage radioimmunologique

Lyon pharmaceutique, 1976, 27, 2, 135-144

(19)R. COHEN, C.A BIZOLLON

Le contrôle de qualité interlaboratoire.

Bases de l'immunoanalyse. Radioimmunologie et techniques associées. Les éditions de l'Acomen, 179, 1987.

(20)S.F.B.C "Commission validation et techniques"

Protocole de validations de techniques

Ann. Biol. Clin., 44, 1986 ; 679-745

(21) M. ROBBARD, P. MUNSON, A. DE LEAN

Improved curve filling, parallelism testing, characterization of sensitivity, validation and optimization for radio ligand assay

Symposium LAE A, Berlin, 1977

(22) PLOUIN P. F., JULIEN J., JEUNEMAITRE X., CHATELLIER G., CORVOL P.

Exploration du système rénine aldostérone chez l'hypertendu : actualité et stratégies.

Le Biologiste, 1988, 23, 175, 155-158

(22) M. BAUD, R. COHEN, G. DUMONT, M. MERCIER, C. NAUDIN, A. VASSAULT

Limite de détection

Groupe de travail Valtec, SFBC et Corata

Vème colloque, Actualités en immunoanalyse

Paris La Vilette, 7 au 10 décembre 1988

(23) DENOLLE T.

Exploration actuelle des sujets hypertendus

Actualités en immunoanalyse et biologie spécialisée, VIIème colloque CORATA.

(24) BAGLIN A., TUAL J.L., PRINSEAU J.

Hyperaldostéronismes primaires et secondaires

Encycl. Med. Chir., Paris, Glandes-nutrition, 10015 B30, 2-1983

(25) PAGNY J.Y.

L'hyperaldostéronisme primaire

Service de Médecine interne et d'hypertension (Pr CORVOL)-  
Hôpital Broussais, 75014 PARIS.

(26) P. BERNADET, D. DURAND, F. JOFFRE, A. CERENE, J.M. SUC

Sténose de l'artère rénale : nouvelles stratégies de  
diagnostic et de traitement

Rev. Prat. (Paris), 1989, 39, 10.

(27) BRUCE J., HILLMAN

Imaging Advances in the diagnosis of renovascular hypertension  
AJR, 153 : 5, 14 july 1989.

(28) STAESSEN J., WILLMS G., BAERT A. et Al

Blood pressure during long term converting enzym inhibition  
predicts the curability of renovascular hypertension by  
angioplasty

Am. J. hypert. 1988, 1, 208-14.

(29) PICKERING T.G., SAS T.A., VAUGHAN E.D., LARAGH J.H.

Differing patterns of renal vein renin secretion in patients  
with renovascular hypertension and their role in predicting the  
response to angioplasty

Nephron 1986, 44 suppl. 1 : 8-11.

(30) SVETKEY A. et Al

Diagnosis of renovascular hypertension

Hypertension, 14, n° 3, september 89

(31)M. BAUD

Modélisation et optimisation des dosages par liaison

Thèse d'état et Sciences pharmaceutiques, Besançon 1980

(32) P.F. PLOUIN, G. CHATELLIER, M. DELAHOUSSE, M.A. ROUGEOT,

J.M. DUCLOS, J.Y. PAGNY, P. CORNOL, J. MENARD

Recherche, diagnostic et localisation du phréochromocytome

Presse Méd., 1987, 16, pp 2211-2215

(33) R. MORNEX

Phreochromocytomes

Encycl. Méd. chir., Glandes endocrines, Nutrition, 10 015 B

50, 3-1985, ppl. 8

**TABLE  
DES  
MATIERES**

	PAGES
INTRODUCTION.....	6
<b>1ERE PARTIE :GENERALITES ET RAPPELS</b>	
I. La rénine.....	9
I.1. Mécanismes de régulation de la tension artérielle.....	9
I.2. Le système rénine angiotensine.....	10
I.2.1 Mécanisme d'action.....	13
I.2.2 Régulation de la sécrétion de rénine	14
I.3. La rénine.....	15
I.3.1 Historique.....	15
I.3.2 La rénine: une hormone et une enzyme	19
I.3.3 Biosynthèse, maturation et excrétion	21
II. Dosage radioimmunologique : méthodologie appliquée à la rénine.....	23
II.1. Définitions.....	23
II.1.1. L'antigène.....	23
II.1.2. L'anticorps.....	24
II.1.3. Réaction antigène-anticorps.....	24
II.2. Les différentes méthodes d'analyse basées sur la réaction antigène-anticorps.....	26
II.2.1. Méthodes par compétition.....	26
II.2.2. Méthodes immunoradiométriques....	28
III. Matériel et méthode.....	32
III.1. Prélèvement des échantillons.....	32
III.2. Réactifs contenus dans la trousse.....	33
III.3 Mode opératoire.....	34
III.4 Calcul des résultats.....	36
IV. Autres méthodes d'évaluation de la rénine.....	38
IV.1 Description.....	38
IV.2 Inconvénients de la méthode par rapport au dosage de la rénine.....	39

2EME PARTIE : EVALUATION ANALYTIQUE DE LA METHODE DE DOSAGE

Introduction.....	42
I. Reproductibilité.....	43
I.1. Définition.....	43
I.1.1. Reproductibilité intraessai.....	43
I.1.2. Reproductibilité interessai.....	43
I.2. Résultats du fabricant.....	44
I.2.1. Reproductibilité intraessai.....	44
I.2.2. Reproductibilité interessai.....	44
I.3. Résultats expérimentaux.....	46
I.3.1. Principe du calcul.....	46
I.3.2. Reproductibilité intrasérie.....	47
I.3.3. Reproductibilité intersérie.....	48
I.3.4. Résultats.....	49
I.3.5. Conclusion.....	51
II. Exactitude.....	52
II.1. Définition.....	52
II.2. Méthodologie.....	52
II.2.1. Test de dilution.....	52
II.2.2. Test de récupération.....	53
II.3. Résultats annoncés par le fabricant.....	53
II.3.1. Test de dilution.....	53
II.3.2. Test de récupération.....	53
II.4. Résultats expérimentaux.....	56
II.4.1. Test de dilution.....	56
II.4.2. Test de récupération.....	59
III. Limite de détection.....	62
III.1. Définition.....	62
III.2. Modalités pratiques de détermination de la limite de détection.....	63
III.2.1. Estimation de l'écart-type des blancs.....	63
III.2.1.1. Répétition du blanc dans une seule série.....	64
III.2.1.2. Dosage du blanc en double dans N séries.....	65
III.2.2. Calcul de la limite de détection...	66
III.2.2.1. Limite de détection exprimée en signal.....	66
III.2.2.2. Limite de détection exprimée en concentration.....	67
III.2.3. Méthode utilisée.....	67
III.3. Résultats annoncés par le fabricant.....	68
III.4. Résultats expérimentaux.....	68
III.5. Conclusion.....	69

IV. Spécificité.....	70
V. Conclusion.....	71

**3EME PARTIE : INTERET CLINIQUE DU DOSAGE DE LA RENINE**

Introduction.....	73
I. Indications du dosage de la rénine.....	74
I.1. Les hypertensions artérielles avec hypokaliémie.....	74
I.2. La maladie rénovasculaire.....	75
I.3. Cancer associé à une hypertension artérielle.....	75
I.4. Autres cas.....	75
II. Précautions à prendre lors du dosage de la rénine active.....	76
II.1. Facteurs physiologiques.....	76
II.1.1. L'âge.....	76
II.1.2. Le cycle nyctéméral.....	76
II.1.3. La position et l'activité physique.....	79
II.1.4. Les apports sodés.....	79
II.1.5. Le cycle menstruel et la grossesse.....	79
II.2. Facteurs pharmacologiques.....	79
III. Intérêt du dosage de la rénine dans le diagnostic de certaines pathologies.....	81
III.1. Diagnostic de l'hyperaldostéronisme.....	84
III.1.1 L'hyperaldostéronisme.....	84
III.1.2. Examens de dépistage.....	85
III.1.3. Diagnostic de l'hyperaldostéronisme primaire.....	86
III.1.4. Comment reconnaître un adénome d'un hyperplasie ?.....	86
III.1.4.1. Les tests hormonaux dynamiques.....	87
III.1.4.2. Les tests localisateurs....	87
III.1.5. La stratégie pour affirmer le diagnostic étiologique.....	88
III.2. Diagnostic de l'hypertension artérielle... rénovasculaire.....	91
III.2.1. L'hypertension artérielle rénovasculaire.....	91
III.2.2. Examens de dépistage.....	92
III.2.3. Diagnostic de l'hypertension artérielle rénovasculaire.....	93

III.2.4. Etape de d'imputation de l'hypertension artérielle.....	95
III.2.4.1. Etude de la fonction endocrine rénale.....	96
III.2.4.2. Etude de la fonction d'excrétion rénale.....	97
IV. Etude expérimentale.....	100
IV.1 Introduction.....	100
IV.2 Echantillonnage et méthode.....	100
IV.2.1 Echantillonnage.....	100
IV.2.2 Méthode.....	101
IV.3 Résultats expérimentaux.....	104
IV.3.1 Présentation.....	104
IV.3.2 Analyse des résultats.....	108
IV.3.2.1 Intérêt du dosage de la rénine pour le diagnostic de l'hyperaldostéronisme.....	108
IV.3.2.1.1 Analyse des résultats du potassium.....	109
IV.3.2.1.2 Analyse des résultats d'aldostérone.....	110
IV.3.2.1.3 Analyse des résultats de rénine.....	111
IV.3.2.1.4 Conclusion.....	112
CONCLUSION.....	113
BIBLIOGRAPHIE.....	116



A U T O R I S A T I O N    D ' I M P R E S S I O N

---

ET DE SOUTENANCE

De la Thèse dont l'intitulé est : *Dosage radioimmunométrique*  
*de la Rénine active - Validation analytique*  
*et intérêt clinique.*

CANDIDAT : M<sup>lle</sup> Sandrine BRUNET

VU

GRENOBLE, le 7 juillet 1992

Le Président du Jury

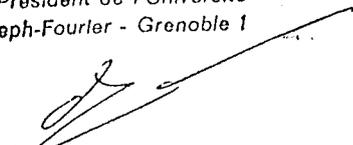


VU

GRENOBLE, le 24.08.1992

Le Président de l'Université  
Joseph FOURIER GRENOBLE I  
Sciences. Technologie. Médecine

Le Président de l'Université  
Joseph-Fourier - Grenoble I



A. NEMOZ

