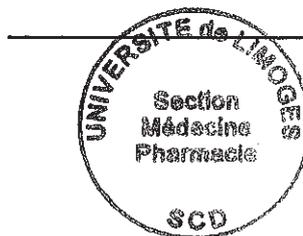


UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



N°45

**INTERET DU DOSAGE DE L'ACTIVITE
ANTITRYPSIQUE URINAIRE (AATU) POUR LE
DIAGNOSTIC D'INFECTIONS BACTERIENNES CHEZ
LES PATIENTS INFECTES PAR LE V.I.H. ET FEBRILES**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement
le 19 octobre 1995 à Bordeaux

par
Catherine REMAZEILLES épouse SUBRA
née le 31 octobre 1963 à Mont-de-Marsan

Jury

Monsieur E. JOUZIER	Professeur	Président
Monsieur M. CLERC	Professeur	Juge
Madame J. TEXIER-MAUGEIN	Maître de Conférences	Juge
Madame M.C. DELMAS-BEAUVIEUX	Docteur en Pharmacie	Juge
Monsieur E. MONLUN	Docteur en Médecine	Juge
Monsieur P. MORLAT	Docteur en Médecine	Juge

A mes parents,

A Jean-Xavier,

A Julie et Romain,

A mon frère et à ma soeur,

A ma famille,

A mes amis,

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur E. JOUZIER

Professeur de Biochimie Fondamentale et Clinique - Biotechnologies
Praticien Hospitalier, Chef de Service

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de notre jury
de thèse.

Vous nous avez enseigné la Biochimie à la Faculté de Pharmacie.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect.

A notre Directeur de Thèse

Madame le Docteur M.C. DELMAS-BEAUVIEUX

Docteur ès-Sciences
Docteur en Pharmacie
Assistant des Universités - Assistant des Hôpitaux
Laboratoire de Biochimie du Professeur M. CLERC

Je tiens à te remercier très chaleureusement pour ta compétence,
ta rigueur, ta disponibilité ainsi que ton immense gentillesse tout
au long de ce travail.

Sois assurée de ma profonde gratitude et de ma fidèle amitié.

A nos juges

Monsieur le Professeur M. CLERC

Professeur de Biochimie
Praticien Hospitalier et Chef de Service
Docteur en Médecine
Docteur ès-Sciences
Pharmacien-Chimiste
Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine
Officier de l'Ordre National du Mérite
Chevalier des Palmes Académiques
Médaille de Bronze du Ministère de la Défense Nationale Française
Commandeur de l'Ordre de la Santé Publique de la République de Côte d'Ivoire
Officier du Mérite de l'Education Nationale de la République de Côte d'Ivoire
Officier de l'Ordre National du Mérite de la République de Côte d'Ivoire

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde considération.

Madame le Docteur J. TEXIER-MAUGEIN

Maître de Conférences des Universités
Praticien Hospitalier

Vous avez très gentiment et très spontanément accepté de juger ce travail.

Votre présence dans ce jury nous fait le plus grand plaisir.

Soyez assurée de nos sincères remerciements.

Monsieur le Docteur E. MONLUN

Docteur en Médecine
Chef de Clinique des Universités - Assistant des Hôpitaux
Service de Médecine Interne et Tropicale du Professeur M. LE BRAS

Merci pour ta gentillesse et ton soutien tout au long des mois passés dans ton service.

Ta compétence, ta disponibilité et tes conseils nous ont été précieux pour l'élaboration de ce travail que tu as initié.

Sois assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur P. MORLAT

Docteur en Médecine
Praticien Hospitalier
Service de Médecine Interne du Professeur J. BEYLOT

Nous vous remercions vivement pour l'accueil reçu dans votre service et tous les précieux conseils qui ont été nécessaires à la réalisation de ce travail.

Merci pour votre compétence, votre disponibilité et votre amabilité tout au long de cette étude.
Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Tous nos remerciements vont également à Hélène SEGUY et à tous les membres du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Saint-André pour l'aide, la gentillesse et la disponibilité qu'ils m'ont accordée tout au long de cette étude.

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE- PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

**SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse

PLAN

INTRODUCTION

GENERALITES

I - Rappel sur le syndrome d'Immunodéficience Acquisée (SIDA)

A - Définition

B - Révision de la définition du SIDA en France

C - Marqueurs biologiques prévisionnels d'évolution au cours de l'infection par le VIH

D - Infections opportunistes : problème diagnostique des mycobactéries atypiques

II - Activité antitrypsique de l'urine (AATU)

A - Définition

B - Rappel biochimique sur l'inter- α trypsine inhibiteur (ITI)

C - Rappel biochimique sur l'antiprotéase UTI

MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

I - Population étudiée

II - Méthodes d'étude

RESULTATS

I - Validité de la méthode

II - Résultats biologiques

DISCUSSION

I - Validité de la méthode

II - Intérêt clinique de la détermination de l'AATU

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

LISTE des ABBREVIATIONS

AATU	Activité Antitrypsique Urinaire
α 1 PI	Alpha 1 Protéase Inhibiteur
α 1 AT	Alpha 1 Antitrypsine
CMV	Cytomégalovirus
CRP	C-Réactive Protéine
EDTA	Ethylène Diamino Tétracétate
ESM	Ecart standard à la moyenne
ITI	Inter- α -Trypsine Inhibiteur
LBAPNA	N benzoyl-L-arginine-para-nitroanilide
m	Moyenne
MAC	Complexe Mycobacterium avium intracellulare
NS	Non significatif
PGL	Lymphadénopathie persistante généralisée
PSTI	Inhibiteur Trypsique Sécrétoire Pancréatique
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
TNF	Tumor Necrosis Factor
UTI	Urinary Trypsin Inhibitor (Inhibiteur Trypsique Urinaire)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive

INTRODUCTION

Les infections bactériennes s'accompagnent le plus souvent d'une élévation sérique de la concentration d'une protéine classique de l'inflammation : la C-réactive protéine (CRP). L'activité antitrypsique urinaire (AATU), aisément déterminable (dosage simple, rapide et peu coûteux) et bien que n'étant pas jusqu'à présent un marqueur utilisé en routine, s'élève dans les mêmes circonstances ; d'autre part, elle pourrait apparaître pour certains auteurs [25, 38, 45, 46] comme un marqueur plus discriminant que la CRP dans les processus infectieux d'origine bactérienne (sensibilité et spécificité meilleures que celles de la CRP) [45, 46].

De plus, comme la CRP, l'AATU diminue significativement sous traitement permettant un suivi de l'efficacité thérapeutique [38, 45, 46].

Quelques études se sont intéressées à la détermination de l'AATU chez les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) [10, 45] et ont montré que l'AATU s'élève préférentiellement lors des infections bactériennes aiguës.

C'est dans ce contexte que nous avons adapté la technique de dosage de l'AATU dans le laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Saint-André.

L'objectif de notre travail est de s'intéresser à la valeur prédictive de l'augmentation de l'AATU lors des épisodes fébriles survenant chez les malades infectés par le VIH. Cette relation nous semble importante à rechercher : en effet, un des problèmes les plus délicats dans la prise en charge des patients VIH positifs est celui des fièvres inexplicées à une phase d'immunodépression avancée.

Les infections bactériennes représentent sans nul doute une part non négligeable de ces fièvres inexplicées. Ainsi une étude récente [10] a montré que 47 % des patients VIH positifs avec des lymphocytes CD4+ inférieurs à $200/\text{mm}^3$ et ayant une fièvre d'origine inexplicée présentaient en fait une infection à mycobactérie.

Il s'agit donc d'une étude prospective visant :

- le dépistage des infections bactériennes dans l'exploration des fièvres des patients infectés par le VIH (il s'agira des infections à pyogènes mais aussi et plus particulièrement des infections à mycobactéries atypiques dont le principal problème est un délai de réponse long pour affirmer le diagnostic bactériologique) ;

- la comparaison de la valeur prédictive de l'élévation de l'AATU avec celle des variations des protéines sériques de l'inflammation : CRP (C réactive Protéine), haptoglobine, orosomucoïde, $\alpha 1$ antitrypsine, afin de déterminer l'intérêt spécifique de ce marqueur.

PREMIERE PARTIE
GENERALITES

I - RAPPEL SUR LE SYNDROME D'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE (SIDA)

A - DEFINITION

Le SIDA ou Syndrome d'Immuno Déficience Acquise, est une maladie virale due au VIH, responsable d'un déficit immunitaire essentiellement provoqué par une diminution des lymphocytes CD4+ (auxiliaires).

Les principaux symptômes présentés par les malades sont en rapport avec des infections opportunistes (virales, parasitaires, mycologiques ou bactériennes intracellulaires) et/ou des cancers, comme le sarcome de Kaposi ou les lymphomes malins non hodgkiniens.

Il existe actuellement un total de 3 millions de cas estimés dans le monde (environ 15 millions de porteurs du virus VIH) dont environ 40.000 en France (sur à peu près 150.000 porteurs du virus VIH) [14].

La répartition des cas cumulés de SIDA en France à la fin de l'année 1994 selon les différents groupes de transmission s'établit comme suit [14] :

- 1 - Homo-bisexuels (47,4 %) ;
- 2 - Toxicomanes à drogues injectées par voie veineuse (23,4 %) ;
- 3 - (1) et (2) (1,4 %) ;
- 4 - Hémophiles et troubles de la coagulation (1,3 %) ;
- 5 - Hétérosexuels partenaires de sujets infectés ou à risque (12,9 %) ;
- 6 - Transfusés (4,5 %) ;
- 7 - Transmission materno-foetale (1,3 %) ;
- 8 - Autres, inconnus (dont multipartenariat et/ou fréquentation de prostituées (7,7 %).

B - REVISION DE LA DEFINITION DU SIDA EN FRANCE [13]

Aux Etats-Unis, depuis le premier janvier 1993, une nouvelle définition du SIDA est appliquée. Par rapport à la révision de 1987 [12], 3 critères cliniques et un critère biologique, diagnostiqués chez un sujet porteur de l'infection VIH, ont été ajoutés aux autres critères. Ce sont :

- la tuberculose pulmonaire ;
- les pneumopathies bactériennes récurrentes ;
- le cancer invasif du col ;
- un nombre de lymphocytes CD4+ inférieur à 200/mm³.

En France, comme en Europe la révision est différente de celle effectuée aux Etats-Unis, les 3 critères cliniques ont été retenus et le critère biologique ("nombre de lymphocytes CD4+ inférieur à 200/mm³") rejeté [13].

Le Tableau I résume la classification de l'infection VIH pour les adultes et les adolescents.

1 - Nombre de lymphocytes CD4+ circulants :

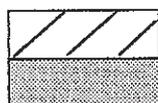
Le nombre absolu de lymphocytes CD4+ est le marqueur prévisionnel d'évolutivité vers le SIDA le plus communément usité.

Le résultat le plus bas, mais pas nécessairement le dernier doit être utilisé pour classer un sujet.

La correspondance entre la valeur absolue et le pourcentage est la suivante :

CD4+	≥	500/mm ³	soit	CD4+	≥	29 %
CD4+		[200 - 499 mm ³]	soit	CD4+	=	14 - 28 %
CD4+	<	200/mm ³	soit	CD4+	<	14 %

CATEGORIES CLINIQUES			
Nombre de lymphocytes CD4+	(A) Asymptomatique, primo-infection ou P.G.L.	(B) Symptomatique, sans critères (A) ou (C)	(C) SIDA
(1) $\geq 500/\text{mm}^3$	A1	B1	C1
(2) $[200 - 499/\text{mm}^3]$	A2	B2	C2
(3) $< 200/\text{mm}^3$	A3	B3	C3



Définition du SIDA (O.M.S./C.D.C. 1987) + 3 pathologies

Définition du SIDA (C.D.C. 1993)

TABLEAU I : Révision 1993 du système de classification de l'infection VIH pour les adultes et les adolescents.

2 - Catégories cliniques :

Catégorie A

Il faut présenter un ou plusieurs des critères listés ci-dessous chez un adulte ou un adolescent infecté par le VIH, s'il n'existe aucun des critères des catégories B et C :

- a - infection VIH asymptomatique ;
- b - lymphadénopathie persistante généralisée (P.G.L.) ;
- c - primo-infection symptomatique.

Catégorie B

On observe des manifestations cliniques chez un adulte ou un adolescent infecté par le VIH, ne faisant pas partie de la catégorie C et qui répondent au moins à l'une des conditions suivantes :

- a - elles sont liées au VIH ou indicatives d'un déficit immunitaire ;
- b - elles ont une évolution clinique ou une prise en charge thérapeutique compliquée par l'infection VIH.

A titre d'exemple, les pathologies suivantes font partie de la catégorie B, la liste n'est pas limitative :

- angiomatose bacillaire ;
- candidose oropharyngée ;
- neuropathie périphérique ;
- zona récurrent ou envahissant plus d'un dermatome.

Cette classification est hiérarchique, c'est-à-dire qu'un sujet classé dans la catégorie B ne peut passer dans la catégorie A lorsque les signes cliniques ont disparu.

Catégorie C

Cette catégorie correspond à la définition du SIDA chez l'adulte. Lorsqu'un sujet a présenté une des pathologies de cette liste, il est classé définitivement dans la catégorie C ; citons à titre d'exemple, quelques-unes de ces pathologies :

- infection à *Mycobacterium avium* ou *kansasii*, disséminée ou extra-pulmonaire;

- infection à *Mycobacterium tuberculosis*, quel que soit le site (pulmonaire ou extra-pulmonaire) ;
- pneumonie à *Pneumocystis carinii* ;
- toxoplasmose cérébrale ;
- infection à cytomégalovirus (CMV) (autre que foie, rate ou ganglions) ;
- cryptococcose extra-pulmonaire ;
- sarcome de Kaposi ;
- lymphome de Burkitt...

C - MARQUEURS BIOLOGIQUES PREVISIONNELS D'EVOLUTION AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH

Les marqueurs biologiques déterminant le plus précocément possible le degré d'évolutivité de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine sont indispensables pour la prise en charge des malades, et pour l'adaptation des traitements antirétroviraux. Parmi ceux-ci, le nombre absolu de lymphocytes CD4+ reste le meilleur marqueur prévisionnel d'évolutivité vers le SIDA et le plus communément utilisé par les cliniciens. Il est à préciser que d'autres marqueurs tels l'antigénémie virale p24, le titre des anticorps anti-p24, la β 2 microglobulinémie sont également utilisés seuls ou en association en pratique médicale courante, avec toutefois une moins bonne valeur prédictive.

D - INFECTIONS OPPORTUNISTES : PROBLEME DIAGNOSTIQUE DES MYCOBACTERIES ATYPIQUES

Depuis la découverte du VIH, les cliniciens ont appris à connaître et à rechercher les infections opportunistes en relation avec l'immunodépression induite par le VIH. Les infections à mycobactéries atypiques sont de celles-ci. Leur diagnostic clinique est malaisé et doit être évoqué de principe, devant une fièvre, une altération de l'état général, une diarrhée, une leucopénie, tous signes s'observant fréquemment au cours du SIDA avancé [17].

Les mycobactéries atypiques, ubiquitaires, sont responsables d'infections opportunistes chez l'hôte aux défenses immunitaires affaiblies. Le syndrome d'immunodéficience acquise réunit les conditions propices au développement de ce type d'infection.

En France comme aux Etats-Unis, la principale espèce incriminée est le complexe *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC). De plus, l'infection à

MAC constitue un critère de SIDA : "toute infection à mycobactérie (tuberculeuse ou non) disséminée ou atteignant un organe autre que le poumon, la peau ou les ganglions médiastinaux ou cervicaux" permet le diagnostic du SIDA [12].

Les infections à MAC surviennent tardivement dans le cours évolutif de l'infection à VIH et du SIDA [56]. Pour la majorité des auteurs, l'infection survient lorsque la déplétion en lymphocytes CD4+ est inférieure à 60/mm³ [33, 41].

Le complexe MAC occupe une place particulière par ses aspects physiopathologiques. En effet, à l'inverse d'autres infections opportunistes telles que la toxoplasmose, l'infection à cytomégalovirus, la tuberculose, l'infection à MAC ne procéderait pas d'une réactivation mais d'une primo-infestation [33].

D'autre part, il faut souligner le fait que les infections à MAC à l'inverse d'autres infections opportunistes (toxoplasmose cérébrale ou rétinienne, pneumocystose pulmonaire, rétinite à CMV ...) dont les signes cliniques ont une certaine spécificité, se distinguent par l'absence quasi totale des signes cliniques spécifiques.

Le diagnostic bactériologique de l'infection à MAC repose sur l'isolement bactérien et l'identification.

L'hémoculture semble être la méthode de choix pour le diagnostic des infections disséminées à mycobactéries atypiques [27]. Cependant, la majorité des milieux utilisés pour la réalisation des hémocultures en routine ne permet en principe pas la croissance des mycobactéries, et le délai de réponse est long, de l'ordre de 30 jours [32], ce qui retarde le clinicien pour la mise en place d'une thérapeutique spécifique.

A l'heure actuelle, deux techniques se révèlent intéressantes pour le diagnostic de MAC mais elles restent longues et coûteuses : la technique de lyse-centrifugation (système Dupont-Isolator) dont le délai moyen de réponse est de deux semaines et le système Bactec dont le délai de réponse est de 5 à 10 jours [17] mais qui nécessite un matériel coûteux et la manipulation de produits radioactifs dans des laboratoires non équipés.

Le système Isolator est un système de prélèvement et de traitement des échantillons sanguins en vue de la culture de microorganismes. Le tube Isolator contient plusieurs agents qui concourent à la lyse des éléments figurés du sang et empêchent la coagulation. Après recueil du sang, le tube est agité puis centrifugé. Le culot est ensuiteensemencé sur milieux de Lowenstein et Coletsos. L'intérêt de cette méthode est une concentration et donc un isolement plus rapide par une diminution de l'action bactéricide du sang. De plus, la numération des bactéries est possible.

Le système Bactec est une méthode radiométrique (Becton-Dickinson) rapide de primoculture en milieu liquide (milieu dérivé de Middlebrook). Elle a

pour principe la détection et la mesure de la quantité de CO₂ marqué par le ¹⁴C libéré au cours du métabolisme à partir d'un substrat, l'acide palmitique, marqué au ¹⁴C. Cette méthode nécessite un appareil de dosage du ¹⁴CO₂ (Bactec TB 460), la quantité de ¹⁴CO₂ mesuré est alors convertie en un indice de croissance proportionnel à la concentration bactérienne. Le principal avantage de la méthode Bactec est la diminution du délai d'obtention des primocultures.

En résumé, les mycobactéries atypiques occupent une place particulière dans le cadre du SIDA, par divers aspects. Outre leur fréquence croissante, elles se singularisent par l'importance et la fréquence de leur dissémination, par leur caractère tardif, par l'absence de manifestations cliniques spécifiques, par leur approche diagnostique procédant du diagnostic d'élimination et de la recherche active (hémocultures, myéloculture, ponction biopsie hépatique), confirmé par culture et identification.

Dans ce contexte, il apparaît indispensable de trouver un autre moyen d'investigation biologique non seulement rapide mais spécifique. A côté de ces marqueurs biologiques classiques, de nombreux autres marqueurs ont été évalués parmi lesquels la détermination de l'activité antitrypsique urinaire ou AATU. De récentes publications ont montré que la mesure de l'AATU pourrait être un bon marqueur d'infection bactérienne [25, 46] et qu'elle s'avère être un test performant pour le diagnostic d'infection bactérienne aigüe chez les sujets infectés par le VIH [45].

II - ACTIVITE ANTITRYPSIQUE DE L'URINE (AATU)

A - DEFINITION

L'activité antitrypsique urinaire est due essentiellement à l'excrétion d'une antiprotéase Urinary Trypsin Inhibitor (ou UTI) acido-et thermostable qui présente une parenté immunologique avec l'inter- α -trypsine inhibiteur (ITI) et dont elle pourrait dériver par protéolyse [23].

B - RAPPEL BIOCHIMIQUE SUR L'INTER- α -TRYPSINE INHIBITEUR (ITI)

Les protéases sont des enzymes qui permettent l'activation ou le catabolisme de nombreuses protéines intra- et extra-cellulaires de l'organisme,

dans des circonstances physiologiques ou pathologiques. Leurs capacités d'agression sont réduites par les inhibiteurs de protéases qui exercent dans de nombreux processus métaboliques (coagulation, fibrinolyse, activation du complément, inflammation) un rôle de régulation et de contrôle indispensable à l'organisme.

Représentant environ 10% des protéines plasmatiques totales, les antiprotéases sont les molécules quantitativement les plus abondantes dans l'organisme humain après l'albumine et les immunoglobulines.

Parmi les inhibiteurs de sérine-protéases, l'ITI ne semble jouer qu'un rôle mineur. En effet, il n'exerce qu'une activité limitée vis-à-vis des enzymes leucocytaires (telles que élastase, cathepsine G) principalement impliquées dans la réaction inflammatoire [6]. Par contre, il est très sensible à l'action de diverses protéases et libère plusieurs fragments dont certains conservent une activité antiprotéasique.

1 - Isolement

L'ITI a été isolé du plasma humain en 1961 par Steinbuch et Loeb [55] et initialement dénommé protéine π : sur acétate de cellulose [28, 54] comme en gel d'agarose à pH alcalin [54], l'ITI a une mobilité électrophorétique située entre celle des $\alpha 1$ et $\alpha 2$ -globulines d'où sa désignation d' "inter-alpha".

En 1965, Heide caractérise la glycoprotéine π comme un inhibiteur de la trypsine bovine et utilise le premier le terme d'ITI [28]. Depuis cette date, le spectre d'inhibition de la molécule a été élargi à de nombreuses autres protéases dont l'acrosine et l'élastase leucocytaire humaine.

2 - Concentration et masse moléculaire

L'ITI est un inhibiteur dont la concentration dans le plasma humain normal est faible, de l'ordre de 400 à 500 mg/l [54].

C'est une molécule dont la masse moléculaire est généralement estimée entre 180 et 225 KDa [21, 35, 40, 52]. Une valeur de 220 KDa a été déterminée par Pratt et Pizzo [47].

3 - Structure

Analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide, en milieu dénaturant et réducteur, l'ITI migre sous forme d'une seule bande, ce qui laisse supposer qu'il n'est constitué que d'une seule chaîne polypeptidique.

En réalité, l'ITI comporte au moins 3 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes H₁ (85 KDa) et H₂ (78 KDa) et une chaîne légère qui correspond à l'inhibiteur urinaire de la trypsine (UTI) [25]. Récemment, une 3^{ème} chaîne lourde, H₃, dont la séquence en acides aminés présente une homologie de 54 % avec H₁ et de 44 % avec H₂, a été retrouvée par Enghild et coll. [21] associée à la chaîne légère au sein d'une protéine plasmatique dénommée "pré-alpha-trypsine inhibiteur" de masse moléculaire 125 KDa, distincte de l'ITI natif (Figure 1).

4 - Stabilité

Les études structurales de l'ITI ont été perturbées par l'instabilité caractéristique de la molécule qui nuit considérablement à sa purification. En effet, chauffé à 56°C durant quelques minutes, l'ITI forme des agrégats. De même, il se dégrade en milieu acide [34].

5 - Composition

L'étude de la composition de l'ITI a montré que celui-ci contient 8,4 % de sucres dont 3,1 % d'hexoses, 3,2 % d'hexosamines et 2 % d'acide sialique [54].

De plus, un atome de zinc est présent par molécule d'inhibiteur à une concentration de 0,6 à 0,95 atome gramme par molécule [28, 54].

6 - Métabolisme de l'ITI

a - Biosynthèse

L'ITI est une glycoprotéine dont la production hépatique est elle-même stimulée par l'interleukine 1. La cinétique d'apparition de ses différents constituants a été particulièrement étudiée par Bourguignon et coll. [11] sur des cellules d'hépatome Hep G2 en culture.

La chaîne légère hybride correspondant à l'ensemble α 1 microglobuline-UTI apparaît très précocément. Elle s'associe ensuite aux chaînes lourdes pour former une protéine composite intermédiaire, de masse moléculaire 250 kDa.

Secondairement, l' α 1 microglobuline est libérée de cette protéine composite, par clivage ; elle est sécrétée isolément pour passer dans le sang circulant.

L'ITI se forme alors, constitué d'UTI et des chaînes lourdes puis c'est l'étape de la glycosylation des différents types de chaînes. C'est ainsi que le chondroïtine-sulfate de UTI joue un rôle essentiel pour assurer la cohésion de la molécule [6].

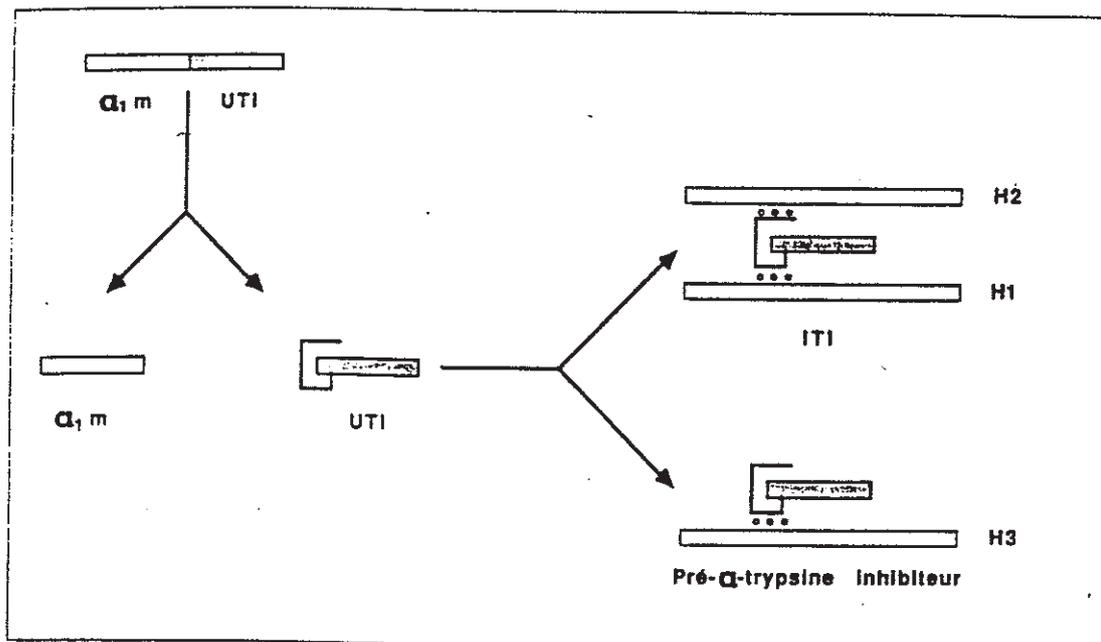


FIGURE 1 : Structure de l'ITI et de ses dérivés.

L'UTI est synthétisé sous forme d'un précurseur commun avec l' $\alpha 1$ microglobuline ($\alpha 1 m$). Il s'associe à deux chaînes lourdes (H) pour former l'ITI, schématisé selon Enghild et coll. [21]. Le "pré- α -trypsine inhibiteur" serait formé d'UTI et d'une chaîne lourde (H₃) qui serait absente de l'ITI. Les chaînes constitutives de l'ITI et du "pré- α -trypsine inhibiteur" sont liées par l'intermédiaire du glycosaminoglycane de UTI (□).

La synthèse d'ITI par les hépatocytes augmente modérément en présence du facteur de nécrose tumorale (TNF) ou d'interleukine 1, à la différence de celle des protéines de la phase aigüe de l'inflammation comme l' α 1 antichymotrypsine [44].

b - Catabolisme

De nombreux dérivés apparentés immunologiquement à l'ITI, dont certains sont inhibiteurs de protéases, ont été caractérisés dans le plasma humain.

Ainsi dès 1977, par immunoélectrophorèse bidimensionnelle à l'aide d'anticorps anti-ITI, Hochstrasser et coll. [30] avaient mis en évidence, à côté du pic de précipitation majeur correspondant à l'ITI, la présence d'un pic hétérogène de mobilité plus rapide qui correspond à des dérivés de l'ITI. Ceux-ci, déjà présents dans le plasma de sujets normaux, voient leur concentration nettement augmenter lors des processus inflammatoires ou en cas d'insuffisance rénale [4, 43, 53]. Pour certains auteurs [15] ces dérivés correspondraient à UTI. L'ITI est très sensible aux protéases. Lors d'un syndrome inflammatoire, celles libérées par les polynucléaires neutrophiles activés, notamment l'élastase et la cathepsine G dégradent l'ITI pour libérer plusieurs fragments parmi lesquels UTI et des composants de masses moléculaires comprises entre 100 et 160 KDa [6].

7 - Rôle physiologique de l'ITI

Le rôle physiologique de l'ITI et de ses dérivés reste mal connu. Aucune déficience en ITI ne semble entraîner un état pathologique caractérisé, bien que récemment Leveillard et coll. [37] aient signalé qu'un allèle particulier de la chaîne légère serait fréquemment retrouvé chez des patients atteints d'emphysème pulmonaire.

a - Activité antiprotéasique

L'activité antiprotéasique a été à l'origine de l'isolement et de la dénomination de l'ITI.

L'ITI est un inhibiteur de sérine-protéases ; il agit principalement sur la trypsine mais plus fortement sur l'enzyme bovin que sur l'enzyme humain [40].

Cette activité serait portée par la chaîne légère qui correspond à UTI [6]. Ainsi, l'ITI est responsable de 5 % de l'activité antitrypsique du plasma [52]. Il inhibe aussi les chymotrypsines bovine et humaine.

Il inactive également l'élastase et la cathepsine G leucocytaires humaines [40, 48] libérées par dégranulation des polynucléaires neutrophiles lors des réactions inflammatoires. De plus, une activité inhibitrice vis-à-vis de la plasmine humaine a été décrite [28, 54].

En cas de syndrome inflammatoire, la chaîne légère portant l'activité antiprotéasique peut être libérée de l'ITI, qui apparaît alors comme le précurseur physiologique d'inhibiteurs de protéases particulièrement stables et capables de diffuser dans les espaces extracellulaires. Ceux-ci participeraient à la protection des tissus contre les agressions protéolytiques ou rempliraient in situ d'autres fonctions qui ne sont pas encore clairement étudiées [6].

Au cours de la réaction inflammatoire, la concentration plasmatique de l'ITI diminue, ce qui traduit sans doute la consommation de cette protéine [6].

b - Activité de facteur de croissance

Une activité de facteur de croissance pour les cellules endothéliales humaines a été établie pour deux polypeptides [6], l'un correspond à l'inhibiteur trypsique sécrétoire pancréatique humain appelé encore PSTI, l'autre présente la séquence N-terminale de UTI. Tous les deux inhibent la trypsine. Il est intéressant de remarquer que la concentration de ces deux inhibiteurs augmente dans le plasma au cours des syndromes inflammatoires.

c - Activité anti-inflammatoire

Comme nous l'avons précédemment signalé, la consommation de l'ITI au cours des syndromes inflammatoires est bien connue [30]. C'est par sa chaîne légère (UTI) que l'ITI, peut effectivement développer ce type d'activité.

C - RAPPEL BIOCHIMIQUE SUR L'ANTIPROTEASE UTI

1 - Historique, définition

Ce sont les travaux du chimiste allemand Bauer qui, au début de ce siècle, ont permis de découvrir les propriétés anti-trypsiques de l'urine humaine normale [8]. Mais ce sont les travaux de Hochstrasser et coll. [23, 29] qui ont été déterminants pour permettre une meilleure compréhension de la nature des

dérivés responsables de cette activité. Ils sont essentiellement représentés par un inhibiteur trypsique acido-stable, apparenté immunologiquement à l'ITI, et dénommé UTI pour "Urinary Trypsin Inhibitor". Cet inhibiteur a été purifié par plusieurs équipes à partir de l'urine de femmes enceintes [7], de sujets leucémiques [16, 50] ou de patients atteints de cancers disséminés [3].

2 - Structure

L'UTI est une glycoprotéine de masse moléculaire 43 KDa estimée en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Figure 2) [2].

Levasseur et coll. ont finalement pu démontrer que l'UTI n'était en réalité que la chaîne légère de l'ITI, présente sous forme libre dans l'urine [36].

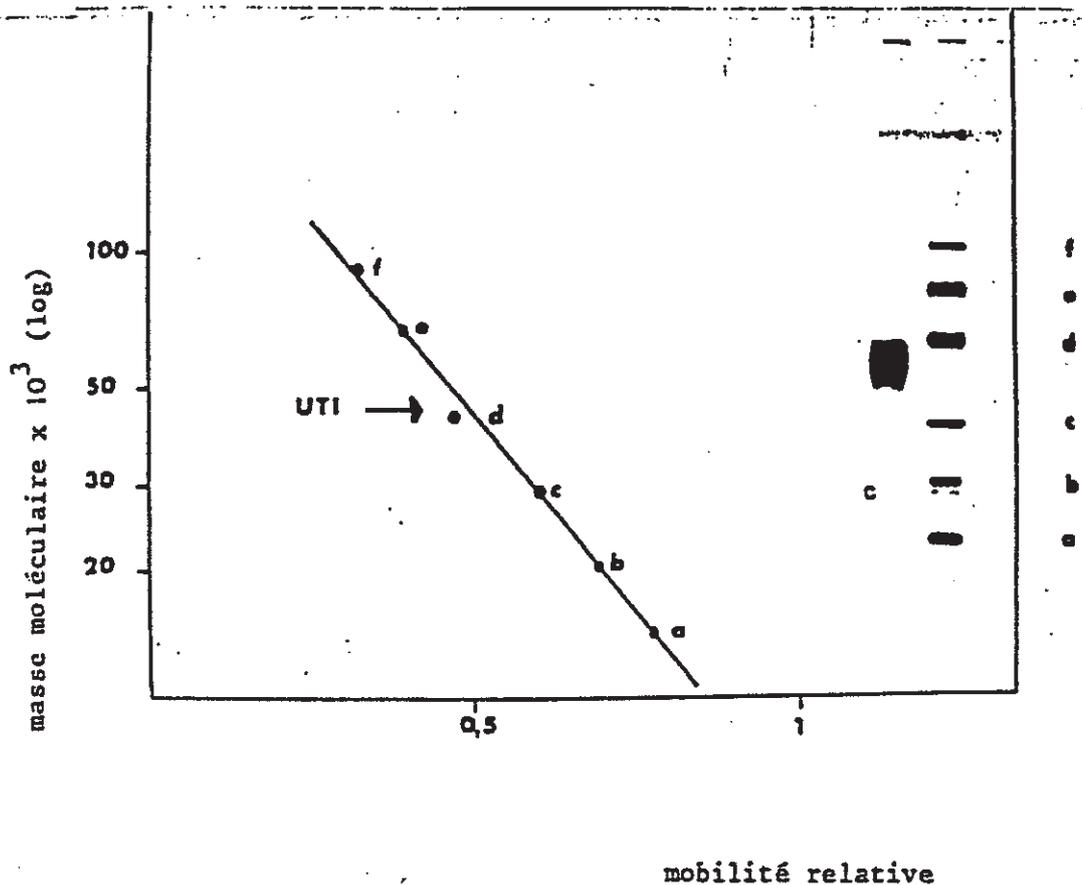


FIGURE 2 : Détermination de la masse moléculaire de UTI par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS, gradient 5-25 %.

Protéines-témoins :

a : lactalbumine (14.000 Da) ; b : inhibiteur trypsique du soja (20.100 Da) ; c : anhydrase carbonique (30.000 Da) ; d : ovalbumine (43.000 Da) ; e : sérum-albumine bovine (67.000 Da) ; f : phosphorylase B (94.000 Da).

a - Composition en acides aminés de UTI [2]

L'UTI est riche en acides aminés dicarboxyliques (13,82 % d'acide glutamique ; 10,71 % d'acide aspartique) ce qui explique son caractère acide.

Le pourcentage d'histidine est faible (0,28 %).

De plus, on note une faible teneur en méthionine (1,30 %) (Tableau II).

b - Composition en sucres de UTI

Les sucres représentent 18,4 % du poids de la molécule (Tableau III) . On peut noter l'absence de fucose et la présence de glucose en faible quantité.

L'UTI contient peu d'acide sialique.

Enfin, il faut signaler la présence de 8 % d'acides uroniques, de 0,75 % de sulfates [2].

La présence de N-acétylgalactosamine n'est pas surprenante, puisque celle-ci a été signalée dans la copule glucidique de l'ITI.

c - Copule glucidique de UTI

D'après les résultats obtenus par Hochstrasser et coll. [31], la copule glucidique de UTI comporte deux chaînes glycaniques distinctes : l'une est liée N-glycosidiquement à un résidu d'arginine situé en position 45, l'autre chaîne liée O-glycosidiquement à la sérine en position 10 contient 48 résidus de N-acétylgalactosamine. En réalité Balduyck et coll. [5] ont démontré que cette chaîne glycanique est un chondroïtine-sulfate, faiblement sulfaté, formé d'environ 17 unités disaccharidiques.

La même équipe a confirmé récemment qu'il est lié covalentiellement à la sérine en position 10, par l'intermédiaire du pont galactosyl-galactosyl-xylosyl. L'UTI est donc un protéoglycane comportant une chaîne de chondroïtine-sulfate qui joue un rôle essentiel pour assurer la cohésion de la molécule d'ITI.

Code	BALDUYCK et coll.
Aspartate	10,71
Thréonine	5,65
Sérine	5,08
Glutamate	13,82
Proline	4,48
Glycine	14,73
Alanine	6,12
Valine	5,38
Cystéine/2	6,84
Méthionine*	1,30
Isoleucine	1,17
Leucine	5,90
Tyrosine	4,61
Phénylalanine	4,73
Lysine	5,09
Histidine	0,28
Tryptophane	0,98
Arginine	3,66
Cystéine A°	7,26

* dosés après hydrolyse par l'acide mercaptoéthane sulfonique

° dosés après oxydation performique

TABLEAU II : Composition en acides aminés de UTI (% de résidus)

NATURE	POURCENTAGE PONDERAL
Fucose	0
Mannose	1,7
Galactose	3,1
Glucose	0,3
N-acétylgalactosamine	8,2
N-acétylglucosamine	1,9
Acide sialique	3,2
TOTAL	18,4

Acide uronique : 8 %

Groupements sulfates : 0,75 %

TABEAU III : Composition en glucides de UTI

3 - Biosynthèse

Lors d'un syndrome inflammatoire, les protéases libérées par les polynucléaires neutrophiles activés, notamment l'élastase et la cathepsine G pourraient dégrader l'ITI en dérivés de masse moléculaire plus faible tels que l'UTI. Malgré son caractère fortement anionique, UTI franchit la membrane basale glomérulaire et est rapidement excrété dans l'urine où il est responsable de l'essentiel de l'activité antitrypsique urinaire (AATU) qui nous intéresse dans ce travail.

Ce mécanisme de formation de l'inhibiteur urinaire reste cependant discuté [6].

4 - Variations physiopathologiques de l'AATU

a - Excrétion chez le sujet sain

α) Cycle nyctéméral

Dans une population de sujets normaux, la valeur de l'AATU a été décrite voisine de $3,32 \pm 0,80$ unités inhibitrices/g de créatinine urinaire [25]. Elle semble plus élevée le matin [20] mais la régulation de cette excrétion reste, néanmoins, encore mal connue.

β) Variation selon l'âge

L'AATU est plus élevée chez les nouveaux-nés que chez les nourissons âgés de 2 à 12 mois et que chez les enfants de moins de 10 ans. Elle est aussi plus importante chez les prématurés que chez les enfants nés à terme [49].

γ) Excrétion au cours de la grossesse

Faarvang et coll. [22] ont réalisé une enquête clinique sur 150 femmes enceintes ne présentant pas de protéinurie, et ils ont montré que l'excrétion urinaire des inhibiteurs trypsiniques est augmentée lors de la grossesse avec un maximum entre la 30ème et 34ème semaine. Elle diminue quelque peu durant les dernières semaines et redevient normale 4 semaines après l'accouchement.

b - Excrétion anormale

L'AATU est augmentée de manière significative dans diverses circonstances pathologiques.

a) Maladies rénales

Nowak [42] a montré que l'excrétion des inhibiteurs trypsiques acido- et thermostables est augmentée en cas d'insuffisance rénale et ce indépendamment de toute atteinte infectieuse.

De même, Aroor et Pattabiraman [1] ont observé dans l'insuffisance rénale, une élévation importante de la concentration urinaire et sérique de l'UTI.

b) Interventions chirurgicales

Dillard [20] a signalé une excrétion accrue d'inhibiteur trypsique chez des malades durant la période post-opératoire et surtout dans les premiers jours qui suivent l'intervention.

γ) Thrombose coronarienne

Faarvang [22] a noté une élévation très importante de l'AATU lors de la phase aiguë de la maladie.

δ) Cancers

Chez les sujets cancéreux, l'élévation de l'AATU a été signalée depuis très longtemps [20] en particulier en cas de leucémie aiguë. Ainsi Rudman et coll. [50] ont isolé à partir de l'urine de sujets atteints de leucémie aiguë, deux inhibiteurs trypsiques dénommés EDC1 et HNC1β, apparentés immunologiquement à l'ITI.

L'élimination urinaire de ces inhibiteurs, dosés par une méthode radioimmunologique à l'aide d'un immunsérum spécifique, est estimée à 1 mg/jour chez les sujets sains ; elle excède 500 mg/jour chez les sujets atteints de cancers disséminés où ces inhibiteurs représentent 40 à 70 % des protéines excrétées [51].

Selon ces auteurs [51], il existe une relation entre la quantité excrétée dans l'urine et le stade d'évolution de la tumeur ou de la leucémie. Quand la rémission de la leucémie aiguë est obtenue, leur excrétion urinaire diminue ou cesse [16].

Par ailleurs, lors d'une étude clinique portant sur 243 sujets cancéreux, Mizon et coll. [39] ont montré que l'AATU est fréquemment augmentée chez ces malades, mais elle reste très variable d'un sujet à l'autre. Pour ces auteurs l'activité antitrypsique moyenne de l'urine d'une population de sujets cancéreux apparaît plus élevée ($m = 70$ UI/l, $n = 243$) que celle d'une population témoin ($m = 14,4$ UI/l, $n = 117$) [39]. D'autre part, afin d'établir une relation éventuelle entre le niveau d'excrétion des inhibiteurs trypsiques urinaires et le stade d'évolution de la tumeur, le suivi de certains malades a été assuré et il a pu ainsi être constaté que l'AATU n'est pas fonction de l'évolutivité de la tumeur, mais qu'elle reflète plutôt les poussées inflammatoires surajoutées en particulier celles d'origine infectieuse [39].

ε) Maladies inflammatoires

Des études plus anciennes avaient montré une élévation de l'AATU dans des pathologies diverses de type inflammatoire, notamment rhumatismales [20] et cardiovasculaires [22, 43]. Cependant, une augmentation importante de l'AATU était surtout observée au cours des maladies infectieuses, telles que pneumonie, bronchite, méningite, septicémie, où l'excrétion d'UTI peut être corrélée avec les épisodes fébriles de la maladie [20, 43].

Gosset et coll. [25] ont montré qu'en cas d'infection bactérienne, l'AATU moyenne est nettement augmentée et chute rapidement si le malade répond bien au traitement.

Le principal intérêt de l'AATU paraît être de dépister les complications bactériennes lors de certaines maladies inflammatoires, notamment les connectivites. En effet, devant une fièvre au long cours, le clinicien peut hésiter entre un problème infectieux surajouté et une poussée de l'affection. Dans ce cas, le pouvoir discriminant de l'AATU est légèrement supérieur à celui de la CRP [6]. Si l'on compare l'évolution de l'AATU à celle de la concentration plasmatique du complexe élastase- α -PI qui est aussi un marqueur de l'activation des polynucléaires neutrophiles au cours des atteintes infectieuses, il apparaît que ces deux marqueurs évoluent parallèlement [26] ce qui est en faveur du rôle de l'élastase leucocytaire dans le mécanisme de formation des inhibiteurs trypsiques de l'urine.

DEUXIEME PARTIE
MATERIEL
ET METHODES D'ETUDE

I - POPULATION ETUDIEE

Tout au long de notre étude, nous avons réalisé les dosages de l'AATU sur une population témoin servant de contrôle et sur une population de malades dont les critères d'inclusion figurent ci-après.

A - POPULATION TEMOIN

Celle-ci se subdivise en 2 catégories.

1 - Population témoin proprement dite

Cette catégorie de population témoin nous a permis d'établir la valeur normale de l'AATU pour notre laboratoire et d'évaluer l'effet des conditions de conservation des urines sur l'AATU.

Elle était constituée de dix sujets sains (fonction rénale normale, absence de traitement médicamenteux) non VIH, recrutés au sein du laboratoire de Biochimie et dont l'âge médian était de 29 ans ($29,20 \pm 1,90$; $m \pm ESM$) d'appartenance égale aux deux sexes.

2 - Population témoin appelée contrôle

Afin de s'assurer de la bonne validité des résultats obtenus pour le dosage de l'AATU des malades, nous avons réalisé les dosages de l'AATU sur la population de malades en parallèle pour chaque série avec un contrôle. Cette population témoin contrôle était représentée par un pool de cinq témoins au sein des 10 sujets ayant servi à la détermination de la valeur normale ; le recueil de leurs urines de 24 heures était réalisé une fois par semaine au laboratoire et suivi d'une conservation d'un aliquote durant 5 jours maximum à -20°C .

B - POPULATION DE MALADES

1 - Critères d'inclusion

Il s'agit d'une étude prospective : tous les patients fébriles (température supérieure ou égale à 38°5 depuis au moins 24 heures) ayant une sérologie VIH positive seront inclus dans l'étude, quel que soit leur motif d'hospitalisation et quelle que soit la date d'apparition de la fièvre par rapport à l'admission.

2 - Classification de la population de malades

La population étudiée était constituée de 67 malades hospitalisés dans les services de Médecine Interne des Professeurs BEYLOT (42 patients) et LE BRAS (25 patients). Sur les 67 patients étudiés, on pouvait compter 63 malades de sexe masculin et 4 malades de sexe féminin. L'âge des patients s'échelonnait de 23 ans à 47 ans avec une médiane à 34 ans ($34 \pm 0,84$; $m \pm \text{ESM}$). On a établi une classification de la population de malades en fonction du nombre de lymphocytes CD4⁺ au moment de l'étude :

- Nombre de lymphocytes CD4 ⁺ $\geq 500/\text{mm}^3$	0 patient
- Nombre de lymphocytes CD4 ⁺ compris entre 200 et 499/ mm^3	6 patients
- Nombre de lymphocytes CD4 ⁺ $< 200/\text{mm}^3$	61 patients

II - METHODES D'ETUDE

A - PRELEVEMENTS

1 - Prélèvement urinaire à J1 de l'hospitalisation

Si possible, les malades inclus devaient boire le jour du prélèvement urinaire au moins un litre d'eau. On recueillait les urines de 24 heures sans conservateur dans un bocal hermétique, un aliquote étant expédié au laboratoire. Sur cet aliquote des urines de 24 heures étaient également effectués le dosage de la créatinine urinaire et le dépistage de la protéinurie.

2 - Prélèvement veineux à J1 de l'hospitalisation

On effectuera un prélèvement de sang veineux le jour du pic thermique sur tube sec vacutainer pour le dosage des protéines de l'inflammation : CRP, haptoglobine, orosomucoïde, $\alpha 1$ antitrypsine. Le dosage des sous-populations lymphocytaires (CD4+, CD8+) sera fait sur un tube vacutainer à EDTA s'il n'a pas été effectué dans le mois précédant l'apparition de la fièvre.

B - DOSAGE DE L'AATU

1 - Principe du dosage : méthode en point final

Nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par Dietz et coll. [18] pour le dosage de l'activité de l' $\alpha 1$ protéase inhibiteur dans le plasma. Celle-ci est basée sur le même principe général. Le dosage de l'AATU se déroule en deux étapes successives :

- dans un premier temps, les urines de 24 heures sont mélangées à une enzyme protéolytique (trypsine) en excès : un complexe se forme entre l'UTI et l'enzyme ;

- dans un deuxième temps, l'activité de la trypsine libre est déterminée par son action sur un substrat artificiel : le L-BAPNA (N-benzoyl-L-arginine-para-nitroanilide) [19]. Celui-ci est hydrolysé et la quantité de paranitroaniline libérée, colorée en jaune, est mesurée au spectrophotomètre à 410 nm (Uvikon, Kontron). Après addition de L-BAPNA, la réaction est stoppée par l'acide acétique à 30%. Le mécanisme de la réaction est résumé dans la Figure 3 suivante.

Remarque : La réalisation d'un blanc urines est nécessaire pour tenir compte de la coloration propre des urines.

Expression des résultats :

L'AATU est exprimée en unités d'activité inhibitrice (UI) par litre : une unité correspond à la quantité d'inhibiteur qui diminue la libération par la trypsine d'une micromole par minute de paranitroaniline.

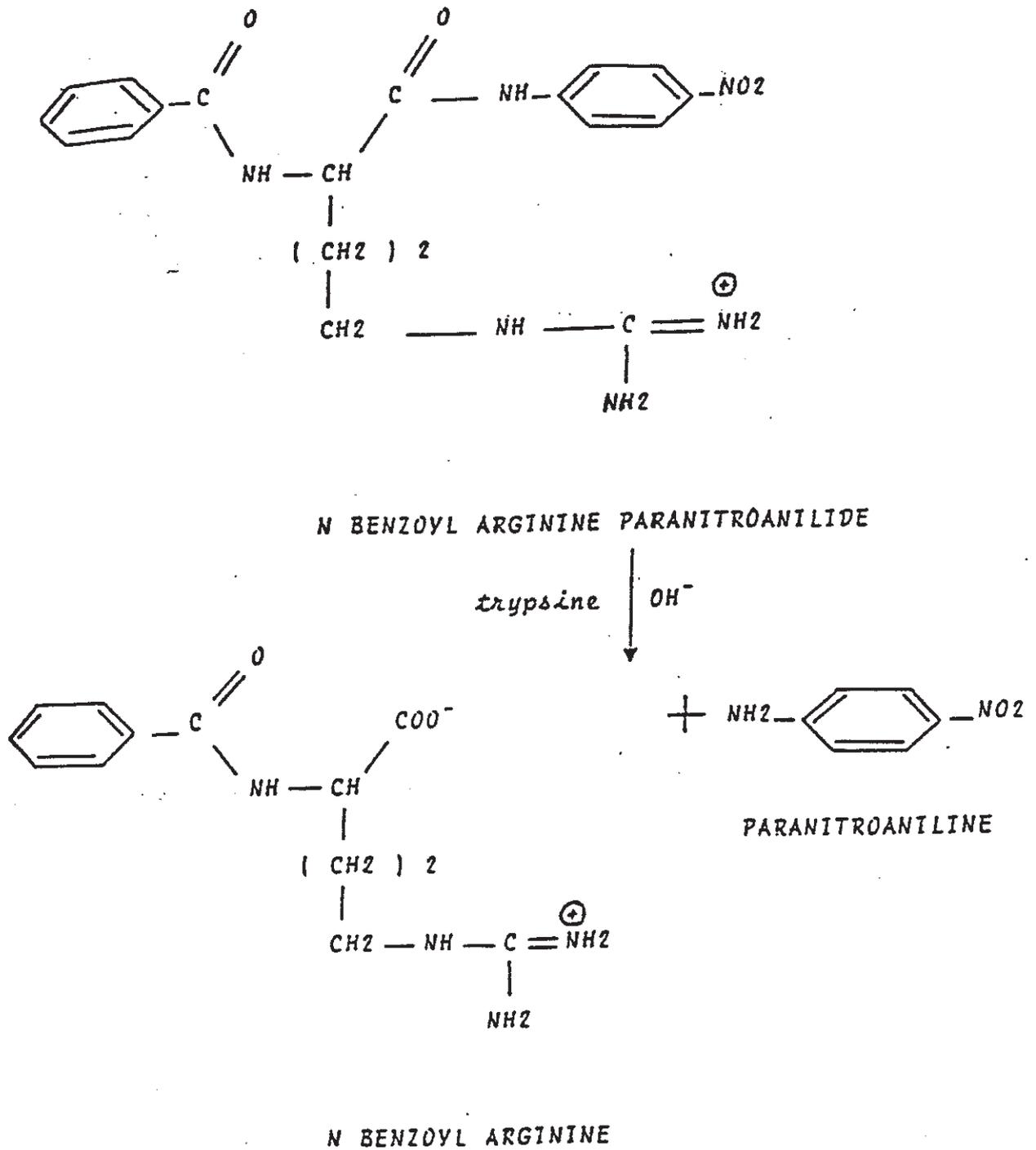


FIGURE 3 : Mécanisme d'hydrolyse du substrat en présence de trypsin

2 - Interférence de l' α 1 protéase inhibiteur (α 1 PI) sur le dosage de l'AATU

L'essentiel de l'activité antitrypsique du plasma est exercée par l' α 1 PI appelé aussi α 1 antitrypsine. En cas de protéinurie glomérulaire, cette antiprotéase est excrétée dans l'urine [38]. Elle peut ainsi exercer une activité antitrypsique qui, contrairement à celle due à l'inhibiteur apparenté à l'UTI (UTI), est acido-et thermolabile [42].

Lorsque la protéinurie est inférieure à 1 g/l, l'interférence de l' α 1 protéase inhibiteur est négligeable. Par contre, quand la protéinurie est supérieure à 1 g/l l'AATU mesurée est, à un degré variable, due à l' α 1 PI présent (en effet, l' α 1 PI peut représenter une part importante, allant jusqu'à 80 % de l'AATU). L'activité antitrypsique de l'UTI est acido-et thermostable. Loufti et coll. ont proposé un protocole d'acidification par l'acide acétique, facile à mettre en oeuvre, qui permet d'inactiver spécifiquement l' α 1 PI susceptible d'interférer dans la détermination de l'AATU [38].

Dans ces conditions, l'activité antitrypsique de l' α 1 PI peut être éliminée par une acidification préalable de l'urine qui ne modifie pas l'AATU due à l'UTI. Ainsi, en cas de protéinurie supérieure à 1 g/l, l'acidification préalable de l'urine permet une mesure spécifique de l'AATU due à l'UTI.

Enfin, seule l'activité antitrypsique de l' α 1 PI diminue rapidement après congélation - décongélation de l'urine.

3 - Mode opératoire

Sur chaque échantillon d'urine (témoin, contrôle et malade) on procède d'abord à un dépistage (puis dosage si nécessaire) de la protéinurie et à un dosage de la créatininurie.

a - Protéinurie :

On réalise en premier lieu un dépistage à la bandelette Albustix (bandelette imprégnée de colorant jaune virant au vert, puis au bleu de plus en plus foncé (tétrabromophénol) au contact de l'urine, permettant un dépistage et une estimation quantitative grossière de la protéinurie).

Si le taux de la protéinurie est supérieur à 1 g/l (2 croix), on réalise un dosage quantitatif à l'acide sulfosalicylique : microprécipitation des protéines en milieu acide, suivie d'un dosage turbidimétrique (néphélométrie). L'agent précipitant est l'acide sulfosalicylique et on obtient un précipité dont l'intensité est

proportionnelle à la quantité de protéines (lecture au spectrophotomètre à 600 nm).

Dans le cas particulier où la protéinurie est supérieure à 1 g/l, on pratique donc une acidification préalable des urines par l'acide acétique afin d'éliminer l'interférence de l' α 1 antitrypsine dans le dosage de l'AATU, dans les conditions décrites ci-dessous :

- 2 ml urines + 50 μ l acide acétique pur ;
- incubation 1 heure à la température du laboratoire ;
- dosage classique de l'AATU.

b - Créatininurie :

La créatininurie est dosée sur un automate multiparamétrique (Paramax, Baxter) après dilution de l'urine au 1/3 dans l'eau physiologique. La méthode Paramax de dosage de la créatinine urinaire est basée sur la réaction cinétique de Jaffé. La créatinine en milieu alcalin réagira avec le picrate de lithium (jaune) pour former un complexe picrate-créatinine (coloration orangée) qui est mesurée par bichromatisme à 525/630 nm.

La créatininurie est exprimée en mmoles/l ; pour l'expression en g/l, la conversion se fait suivant la formule :

$$\text{Créatininurie (g/l)} = 0,113 \times \text{créatininurie (mmoles/l)}$$

c - Dosage de l'AATU proprement dit (technique de Foch) :

- ◆ La technique est présentée dans le Tableau IV.

Dans ce tableau on trouve les paramètres :

- DO BU = Densité optique Blanc Urines
- DO T = Densité optique Trypsine
- DO D = Densité optique Dosage urines

La lecture se fait en point final en cuve de 1 cm d'épaisseur à 410 nm contre le blanc réactif sur le spectrophotomètre Uvikon (Kontron Instruments).

En tubes plastiques, préparer :

	Blanc témoin Réactif	Blanc dosage DOBU	Trypsine DOT	Dosage urine DOD
Tampon TRIS	1,9 ml	1,5 ml	1,7 ml	1,5 ml
Trypsine	-	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
BAPNA	1 ml	1 ml	-	-
CH ₃ COOH	-	0,5 ml	-	-
Urine	-	-	-	0,2 ml

Incuber au bain-marie à 30°C pendant 10 minutes

Urine	-	0,2 ml	-	-
BAPNA	-	-	1 ml	1 ml

Incuber 10 minutes exactement au bain-marie à 30°C

CH ₃ COOH	0,5 ml	-	0,5 ml	0,5 ml
----------------------	--------	---	--------	--------

TABLEAU IV : Mode opératoire pour le dosage de l'AATU

◆ Calcul de l'AATU :

- Calculer :

$$\begin{array}{l} \text{DO D} - \text{DO BU} = X \\ \text{DO T} - X = \Delta D \end{array}$$

- "Précautions" :
- Si ΔD est supérieur à 70% de DO T, on recommencera le dosage en diluant les urines dans l'eau physiologique ou l'eau distillée.
 - Si DOD est très faible : soit (DO D - DO BU) négatif, on recommencera le dosage en diluant les urines comme précédemment.

◆ Puis, calcul des UI/l :

$$\text{Activité en mUI/ml} = \frac{V \times \Delta D}{v \times \epsilon \times \Delta t} \times 1000$$

V = volume final = 3,4 ml

Δt = 10 minutes

v = volume d'essai = 0,2 ml

ϵ = coefficient d'extinction micromolaire du substrat à 410 nm = 10,52 pour 1 $\mu\text{mole/ml/cm}^2$

ΔD = DO témoin - DO dosage

Soit :

$$\text{Activité (mUI/ml)} = 162 \times \Delta D \text{ (UI/l)}$$

On préférera l'expression de l'activité antitrypsique urinaire en UI/g de créatinine urinaire :

$$\text{AATU (UI/g créatinine urinaire)} = \frac{\text{AATU (UI/l)}}{\text{Créatininurie (g/l)}}$$

Les réactifs utilisés pour le dosage de l'AATU figurent en annexe.

C - DOSAGE DES PROTEINES SERIQUES

Le dosage des protéines sériques de l'inflammation : CRP, haptoglobine, orosomucoïde et α 1 antitrypsine est réalisé par immunonéphélométrie laser sur un automate BNA Behring (Behring Diagnostics).

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

I - VALIDITE DE LA METHODE

A - CONSERVATION DES ECHANTILLONS D'URINE

Nous avons effectué le dosage de l'AATU sur la population témoin proprement dite citée précédemment (n = 10) à des temps différents afin d'évaluer l'effet des conditions de conservation des échantillons d'urine.

Dosage :

à J0	= urines de 24 heures
à J8	= après 8 jours de conservation à +4°C après 8 jours de congélation à -20°C
à J15	= après 15 jours de conservation à +4°C après 15 jours de congélation à -20°C

Au préalable, on a procédé au dépistage de la protéinurie sur chaque échantillon d'urine afin d'éliminer l'interférence de l' α 1 protéase inhibiteur sur le dosage de l'AATU dans le cas où la protéinurie serait supérieure à 1 g/litre. En fait, on a pu noter l'absence de protéinurie sur chaque échantillon d'urine. De même, la créatinine urinaire fut déterminée pour chaque échantillon. Les résultats obtenus figurent dans le Tableau V.

L'analyse de nos résultats montre une augmentation significative de l'AATU aussi bien après 8 jours de conservation des urines à +4°C qu'après 8 jours de congélation à -20°C par rapport au dosage effectué à J0. Après 15 jours de conservation, l'augmentation de l'AATU reste encore significative. Par contre nous n'observons aucune différence significative à J8 ou à J15 si l'on compare pour chacun de ces délais les dosages effectués à l'une ou l'autre des températures.

Témoins (n = 10)	J 0 Contrôle	J 8		J 15	
		Conservation +4° C (a)	Congélation -20°C (b)	Conservation +4°C (c)	Congélation -20°C (d)
m ± ESM	12 ± 1,52	16,55 ± 1,71	17,88 ± 1,55	16,45 ± 1,42	15,54 ± 1,35

TABLEAU V : Influence des conditions de conservation (durée et température) sur le dosage de l'AATU (UI/g créatinine urinaire)

(a) (b) (c) (d)	p < 0,001 vs contrôle
(b)	NS vs (a)
(d)	NS vs (c)
(c)	NS vs (a)
(d)	NS vs (b)

Il apparait en fait judicieux d'effectuer le dosage à proximité du prélèvement, voire le jour même.

B - CRITERES DE QUALITE DE LA METHODE

La précision de la méthode est appréciée par la détermination de la répétabilité intrasérielle sur 10 échantillons de deux urines (1 témoin de valeur normale, 1 malade de valeur moyenne) dosées le même jour dans la même série et de la reproductibilité intersérielle sur les deux mêmes urines qui a fait l'objet de 10 dosages consécutifs à des jours différents. Les résultats sont présentés dans les Tableaux VIa et VIb.

C - VALEUR NORMALE DE L'AATU

A partir des résultats obtenus pour l'ensemble de la population témoin proprement dite, la valeur normale de l'AATU retenue pour notre laboratoire de Biochimie est de : **12 UI/G CREATININE URINAIRE** ($12 \pm 1,52$; $m \pm \text{ESM}$) (médiane = 10).

II - RESULTATS BIOLOGIQUES

A - DESCRIPTION DES PATIENTS

Nous avons effectué prospectivement la mesure de l'AATU chez 67 patients VIH+ fébriles. Nous présentons les résultats pour 58 patients avec un diagnostic de maladie infectieuse documentée à l'origine de la fièvre.

Cinq groupes de patients sont définis (Tableau VII) :

- Groupe 1 : Infections bactériennes non mycobactériennes.
- Groupe 2 : Infections mycobactériennes à *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC).
- Groupe 3 : Infections parasitaires et fongiques.
- Groupe 4 : Infections virales.
- Groupe 5 : Autres.

	Nombre de mesures (n)	AATU (UI/g créat. urin) m	AATU (UI/g créat. urin) ESM	Coefficient de variation CV (%)
Répétabilité intrasérielle	10	2,60	0,23	8,85
Reproductibilité intersérielle	10	6,80	0,70	10,30

TABLEAU VIa : Témoin

	Nombre de mesures (n)	AATU (UI/g créat. urin) m	AATU (UI/g créat. urin) ESM	Coefficient de variation CV (%)
Répétabilité intrasérielle	10	12,90	0,55	4,25
Reproductibilité intersérielle	10	18,80	1,30	6,90

TABLEAU VIb : Malade

TABLEAU VI : Répétabilités et reproductibilités intra- et intersérielles pour un prélèvement de témoin et un prélèvement de malade.



Diagnostic	Nombre de patients
Groupe 1	
<u>INFECTIONS BACTERIENNES NON MYCOBACTERIENNES</u>	22
- Infections respiratoires basses à germes identifiés	11
- Septicémies	6
- Diarrhée fébrile à Campylobacter	1
- Cellulite sous-cutanée	1
- Pancréatite	1
- Prostatite + épididymite	1
- Mycobacterium tuberculosis	1
Groupe 2	
<u>INFECTIONS MYCOBACTERIENNES A MAC</u>	10
- Mycobactéries atypiques du complexe <i>Mycobacterium avium intracellulare</i>	10
Groupe 3	
<u>INFECTIONS PARASITAIRES ET FONGIQUES</u>	14
- Toxoplasmoses cérébrales	4
- Pneumocystoses pulmonaires	9
- Cryptococcose neuroméningée	1
Groupe 4	
<u>INFECTIONS VIRALES</u>	7
- CMV	6
- Zona	1
Groupe 5	
<u>AUTRES</u>	5
- Néo du poumon	1
- Poussières héroïne	1
- Toxicité Rétrovir ®	1
- Kaposi	1
- Lymphome disséminé	1
<u>SANS DIAGNOSTIC</u>	9
TOTAL	67

TABLEAU VII : Description des groupes de patients selon les diagnostics.

Les 9 derniers patients du Tableau VII ont été volontairement éliminés de l'étude par absence de diagnostic précis.

B - VALEURS DE L'AATU :

1 - Selon les cinq groupes de patients :

Nous exposons dans le Tableau VIII les valeurs de l'AATU exprimées en UI/l puis en UI/g de créatinine urinaire pour les cinq groupes de patients précédemment définis quel que soit le taux de CD4+ (*Remarque* : la protéinurie est systématiquement inférieure à 1 g/l).

La Figure 4 présente les résultats finaux de l'AATU en UI/g de créatinine urinaire pour les seuls patients ayant un taux de CD4+ < 100 mm³, groupe hautement susceptible de présenter une infection à MAC nous intéressant plus spécifiquement..

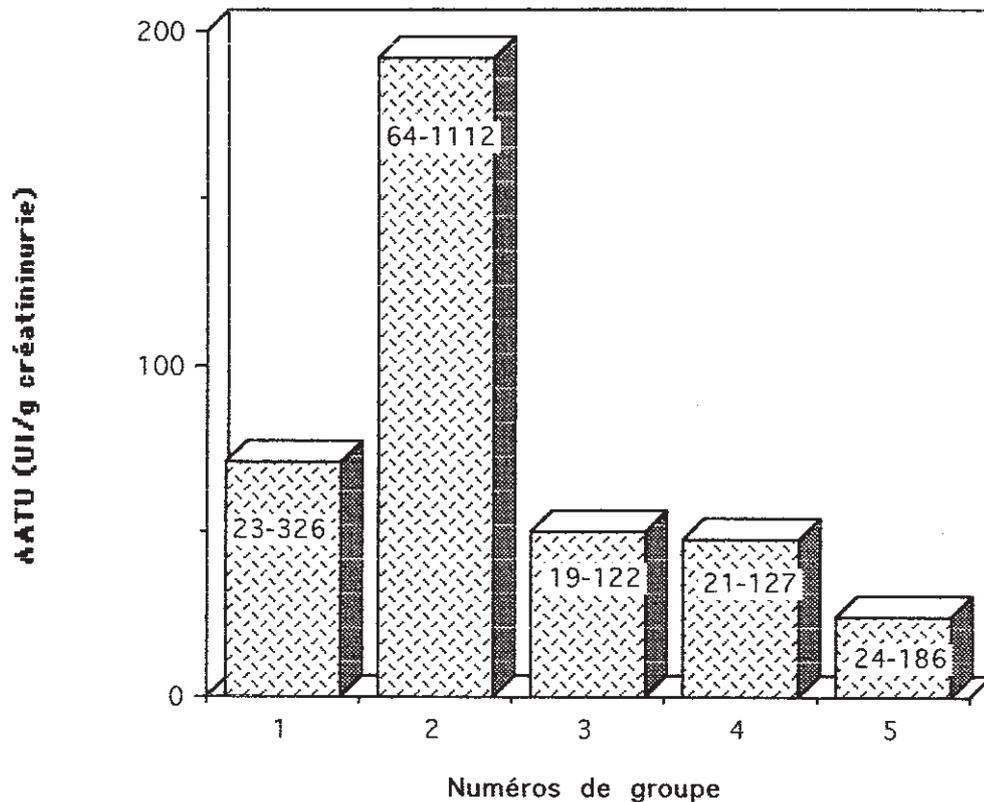


FIGURE 4 : Valeurs de l'AATU (médiane, min-max) dans la population des patients présentant un taux de CD4+ < 100/mm³.

Test de Wilcoxon : groupe 2 p = 0,046 vs groupe 1, groupe 2 p = 0,006 vs groupe 3 (non réalisable avec les groupes 4 et 5 en raison des petits effectifs mais tendance très nette à la significativité).

Description des patients	AATU (UI/l) m ± ESM <i>médiane (min-max)</i>	CREATININURIE (g/l) m ± ESM <i>médiane (min-max)</i>	AATU (UI/g créatininurie) m ± ESM <i>médiane (min-max)</i>
Groupe 1 INFECTIONS BACTERIENNES NON MAC (n = 22)	62,41 ± 16,75 31 (10 - 353)	0,74 ± 0,11	96,05 ± 19,40 60 (17 - 326)
Groupe 2 INFECTIONS A MAC (n = 10)	177,30 ± 48,12 128 (36 - 532)	0,77 ± 0,13	282 ± 99,05 192 (64 - 1112)
Groupe 3 INFECTIONS PARASITAIRES ET FONGIQUES (n = 14)	38,92 ± 5,97 40 (10 - 84)	0,86 ± 0,15	53,14 ± 8,61 46 (19 - 122)
Groupe 4 INFECTIONS VIRALES (n = 7)	32,00 ± 8,36 20 (13 - 70)	0,58 ± 0,13	59,57 ± 12,46 54,5 (21 - 127)
Groupe 5 AUTRES (n = 5)	36,60 ± 12,63 27 (10 - 82)	0,71 ± 0,12	66,20 ± 32,13 24 (16 - 186)

TABLEAU VIII : Valeurs de l'AATU dans les divers groupes de patients
(en UI/l puis UI/g créatinine urinaire)

Test de Wilcoxon p < 0,03 groupe 2 vs 1
p < 0,03 groupe 2 vs 3
p < 0,01 groupe 2 vs 4

(non réalisable avec le groupe 5 en raison du petit effectif).

2 - Selon le nombre de lymphocytes CD4+/mm³ :

La Figure 5 (ci-dessous) représente la répartition des patients de chacun des 5 groupes en fonction du nombre de lymphocytes CD4+/mm³.

Le Tableau IX exprime pour chaque groupe de patients les valeurs de l'AATU en fonction du taux de lymphocytes CD4+/mm³.

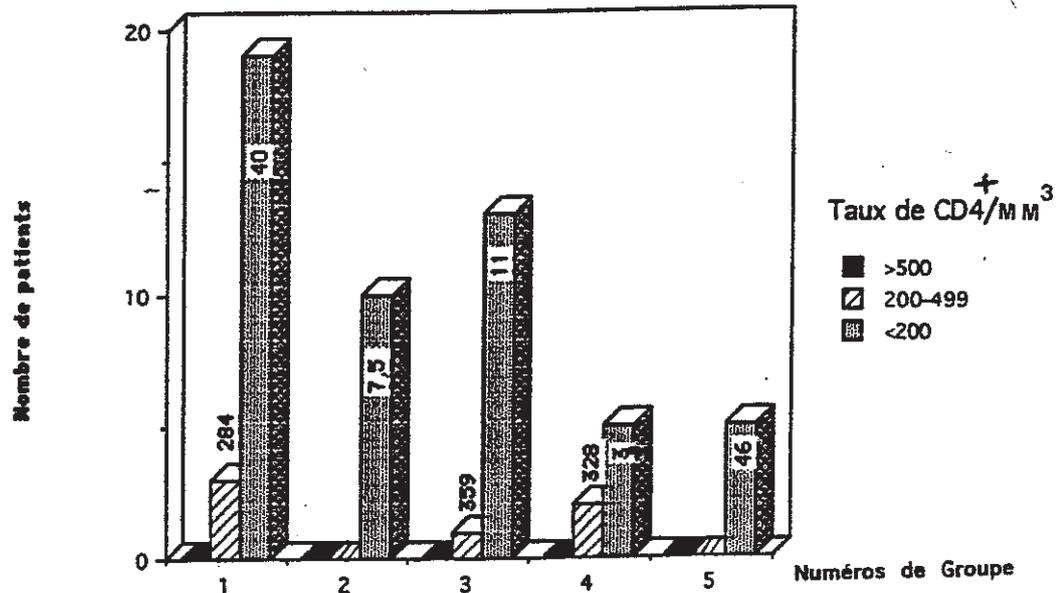


FIGURE 5 : Répartition des patients en fonction du nombre de CD4+/mm³ (précision de la médiane pour les lymphocytes CD4+).

Groupes \ CD4 ⁺	> 500/mm ³	200 - 499/mm ³	CD4+ < 200/mm ³
GROUPE 1	-	94,35 ± 67,35 (28)	96,30 ± 20,70 (60)
GROUPE 2	-	-	282,00 ± 99,05 (192)
GROUPE 3	-	28 (28)	55,00 ± 9,16 (47)
GROUPE 4	-	54,50 ± 0,50 (54,5)	61,60 ± 17,95 (47)
GROUPE 5	-	-	66,20 ± 32,15 (24)

TABLEAU IX : Valeurs de l'AATU (UI/g Créatinine urinaire) en fonction du taux de CD4+/mm³ (m ± ESM et précision de la médiane).

C - VALEURS DES PROTEINES DE L'INFLAMMATION

1 - Selon les cinq groupes de patients

Dans le Tableau X nous exposons les valeurs des quatre protéines de l'inflammation : CRP, haptoglobine, orosomucoïde, α 1 antitrypsine dosées en parallèle de l'AATU pour chaque patient.

Description des patients	CRP (mg/l)	Haptoglobine (g/l)	Orosomucoïde (g/l)	α 1 AT (g/l)
	<i>médiane (min-max)</i>	<i>médiane (min-max)</i>	<i>médiane (min-max)</i>	<i>médiane (min-max)</i>
GROUPE 1 INFECTIONS BACTERIENNES NON MAC	63,42 ± 17,95 26,5 (2,5-315)	3,37 ± 0,52 3,15 (0,45-10)	1,60 ± 0,15 1,57 (0,38-3,6)	3,46 ± 0,26 3,30 (2,13-6,5)
GROUPE 2 INFECTIONS A MAC	86,10 ± 33,35 76,5 (2,5-351)	3,95 ± 0,80 3,78 (1,18-7,2)	2,62 ± 0,21 2,89 (1,68-3,6)	3,28 ± 0,46 3,21 (1,6-4,7)
GROUPE 3 INFECTIONS PARA. ET FONG	18,14 ± 4,51 12,5 (2,5-48)	3,89 ± 0,61 3,93 (0,1-7,7)	1,72 ± 0,19 1,75 (0,36-2,88)	2,99 ± 0,24 3,06 (1,96-4,11)
GROUPE 4 INFECTIONS VIRALES	24,41 ± 6,43 27 (2,5-51)	1,48 ± 0,87 0,80 (0,10-5,65)	1,59 ± 0,17 1,75 (1,05-2,17)	3,58 ± 0,33 3,54 (2,71-5,04)
GROUPE 5 AUTRES	14,60 ± 5,60 13 (4-35)	2,43 ± 0,65 3,05 (0,15-3,95)	1,33 ± 0,06 1,36 (1,13-1,45)	3,35 ± 0,33 3,04 (2,65-4,55)
NORMALES	< 20	1 - 3	0,55 - 1,40	2 - 3

TABLEAU X : Valeurs des protéines de l'inflammation dans les cinq groupes de patients.

2 - Selon le nombre de lymphocytes CD4+/mm³

En fait, compte tenu du fait que la totalité des patients du groupe 2 qui nous intéresse plus particulièrement a un taux de lymphocytes CD4+ < 200/mm³, nous n'avons pas jugé utile de montrer ces résultats puisqu'ils restent identiques au Tableau X pour cette catégorie de patients.

D - DETERMINATION DE LA VALEUR SEUIL DE L'AATU

1 - Pour l'ensemble des 58 patients quel que soit le taux de lymphocytes CD4+/mm³

a - Valeur seuil à 60 UI/g créatininurie

A partir de l'analyse des résultats obtenus pour l'ensemble des patients (VIH positifs) et au regard des valeurs obtenues chez les témoins non fébriles, on définit "arbitrairement" une valeur seuil pour l'AATU à 60 UI/g créatinine urinaire. Cette valeur semble en effet faire l'interface entre les patients présentant une infection bactérienne diagnostiquée et les autres. Les paramètres définissant la performance de la technique pour cette valeur seuil sont présentés d'une part pour les infections bactériennes en général (groupes 1 + 2) (Tableau XIa) et d'autre part plus spécifiquement pour les infections mycobactériennes à MAC qui nous intéressent (groupe 2) (Tableau XIb). Il s'agit de la sensibilité, de la spécificité, de la valeur prédictive positive (VPP) et de la valeur prédictive négative (VPN).

b - Valeur seuil à 100 UI/g créatininurie

Compte tenu de la moyenne élevée du titre d'AATU observé dans le cadre des infections mycobactériennes à MAC ($282 \pm 99,05$) (médiane = 192), il nous a semblé intéressant d'étudier à nouveau la sensibilité et la spécificité pour ce seuil plus élevé d'AATU. Cela est réalisé dans le cadre des infections bactériennes en général (groupes 1 + 2) (Tableau XIIa) et dans celui des infections à MAC (groupe 2) (Tableau XIIb) comme nous venions de le faire pour la première valeur seuil.

TABLEAU XIa

AATU UI/g créatininurie	Infections bactériennes (groupes 1+2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 60	21	8	29
< 60	11	18	29
Total	32	26	58

Sensibilité	: 66 %	Spécificité	: 69 %
VPP	: 72 %	VPN	: 62 %

TABLEAU XIb

AATU UI/g créatininurie	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 60	10	19	29
< 60	0	29	29
Total	10	48	58

Sensibilité	: 100 %	Spécificité	: 60 %
VPP	: 34 %	VPN	: 100 %

TABLEAU XI : Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour une valeur seuil à 60 UI/g créatinine urinaire.

XIa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XIb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2)

TABLEAU XIIa

AATU UI/g créatininurie	Infections bactériennes (groupes 1+2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 100	14	4	18
< 100	18	22	40
Total	32	26	58

Sensibilité	: 44 %	Spécificité	: 85 %
VPP	: 78 %	VPN	: 55 %

TABLEAU XIIb

AATU UI/g créatininurie	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 100	7	11	18
< 100	3	37	40
Total	10	48	58

Sensibilité	: 70 %	Spécificité	: 77 %
VPP	: 39 %	VPN	: 93 %

TABLEAU XII : Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour une valeur seuil à 100 UI/g créatinine urinaire.

XIIa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XIIb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2).

2 - Pour les patients dont le taux de lymphocytes CD4+ est inférieur à 100/mm³

En sachant que les infections à MAC surviennent tardivement dans le cours évolutif de l'infection à VIH et du SIDA il nous a paru intéressant d'étudier à nouveau la sensibilité et la spécificité de l'AATU chez les seuls patients (au nombre de 45) dont le taux de CD4+ est inférieur à 100/mm³. Les valeurs seuils à 60 et 100 UI/g créatininurie sont évidemment les mêmes et ce pour toutes les infections bactériennes d'une part et pour les infections à MAC d'autre part. La Figure 6 représente la répartition des patients ayant moins de 100 CD4+/mm³.

a - Valeur seuil à 60 UI/g créatininurie

Comme précédemment, nous avons étudié la sensibilité et la spécificité, pour les infections bactériennes en général (Tableau XIIIa) et pour les infections à MAC (Tableau XIIIb) pour une première valeur seuil d'AATU à 60 UI/g créatininurie.

b - Valeur seuil à 100 UI/g créatininurie

De la même façon, et chez ces mêmes patients, nous avons exprimé la sensibilité et la spécificité pour les infections bactériennes en général (Tableau XIVa) et pour les infections à MAC (Tableau XIVb) pour une seconde valeur seuil d'AATU à 100 UI/g créatininurie.

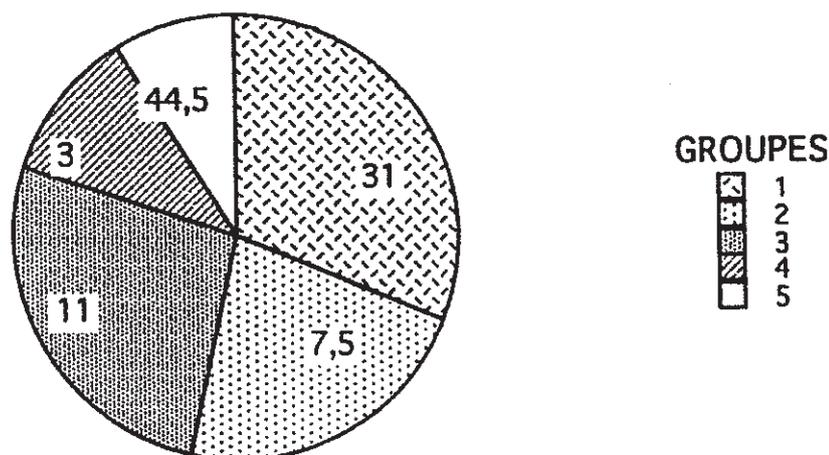


FIGURE 6 : Répartition du nombre des 45 patients ayant moins de 100 CD4+/mm³ par groupe de diagnostic (précision de la médiane pour le nombre de lymphocytes CD4+).

TABLEAU XIIIa

AATU UI/g créatininurie	Infections bactériennes (groupes 1 + 2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 60	19	8	27
< 60	5	13	18
Total	24	21	45

Sensibilité	: 79 %	Spécificité	: 62 %
VPP	: 70 %	VPN	: 72 %

TABLEAU XIIIb

AATU UI/g créatininurie	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 60	10	17	27
< 60	0	18	18
Total	10	35	45

Sensibilité	: 100 %	Spécificité	: 51 %
VPP	: 37 %	VPN	: 100 %

TABLEAU XIII : Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour les 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³ et pour une valeur seuil à 60 UI/g créatininurie.

XIIIa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XIIIb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2)

TABLEAU XIVa

AATU UI/g créatininurie	Infections bactériennes (groupes 1 + 2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 100	12	4	16
< 100	12	17	29
Total	24	21	45

Sensibilité	: 50 %	Spécificité	: 81 %
VPP	: 75 %	VPN	: 59 %

TABLEAU XIVb

AATU UI/g créatininurie	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 100	7	9	16
< 100	3	26	29
Total	10	35	45

Sensibilité	: 70 %	Spécificité	: 74 %
VPP	: 44 %	VPN	: 90 %

TABLEAU XIV : Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³ et pour une valeur seuil à 100 UI/g créatininurie.

XIVa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XIVb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2)

E - CORRELATIONS AATU-PROTEINES DE L'INFLAMMATION

1 - Courbes de corrélation

Les Figures 7 (A, B, C et D) présentent les corrélations entre l'AATU et les 4 protéines de l'inflammation dosées au cours de l'étude. Il nous a semblé pertinent de ne considérer que les valeurs d'AATU supérieures au seuil précédemment défini (60 UI/g créatinine urinaire) et n'incluant que les patients ayant eu un diagnostic de maladies bactériennes (groupes 1 + 2) susceptibles d'entraîner une élévation spécifique de ces protéines. Nous obtenons des corrélations positives mais relativement médiocres ($r = 0,10$ à $0,45$), le meilleur coefficient de corrélation étant obtenu avec l'orosomucoïde.

2 - Sensibilité et spécificité de la CRP

Afin de comparer l'intérêt spécifique du dosage de l'AATU pour le diagnostic d'infection bactérienne et plus particulièrement pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC chez les patients séropositifs pour le VIH et fébriles, nous avons étudié la sensibilité et la spécificité de la CRP chez ces mêmes patients. Comme pour l'AATU, nous avons défini la sensibilité et la spécificité d'une part pour l'ensemble des 58 patients quel que soit le taux de lymphocytes CD4+ (Tableaux XVa,b) et d'autre part pour les 45 patients plus susceptibles de présenter une infection à MAC dont le taux de lymphocytes CD4+ est inférieur à $100/\text{mm}^3$ (Tableaux XVIa,b).

Comme précédemment nous avons fait la distinction entre une classe présentant la totalité des infections bactériennes (groupes 1 + 2) et celle présentant seulement une infection à MAC (groupe 2).

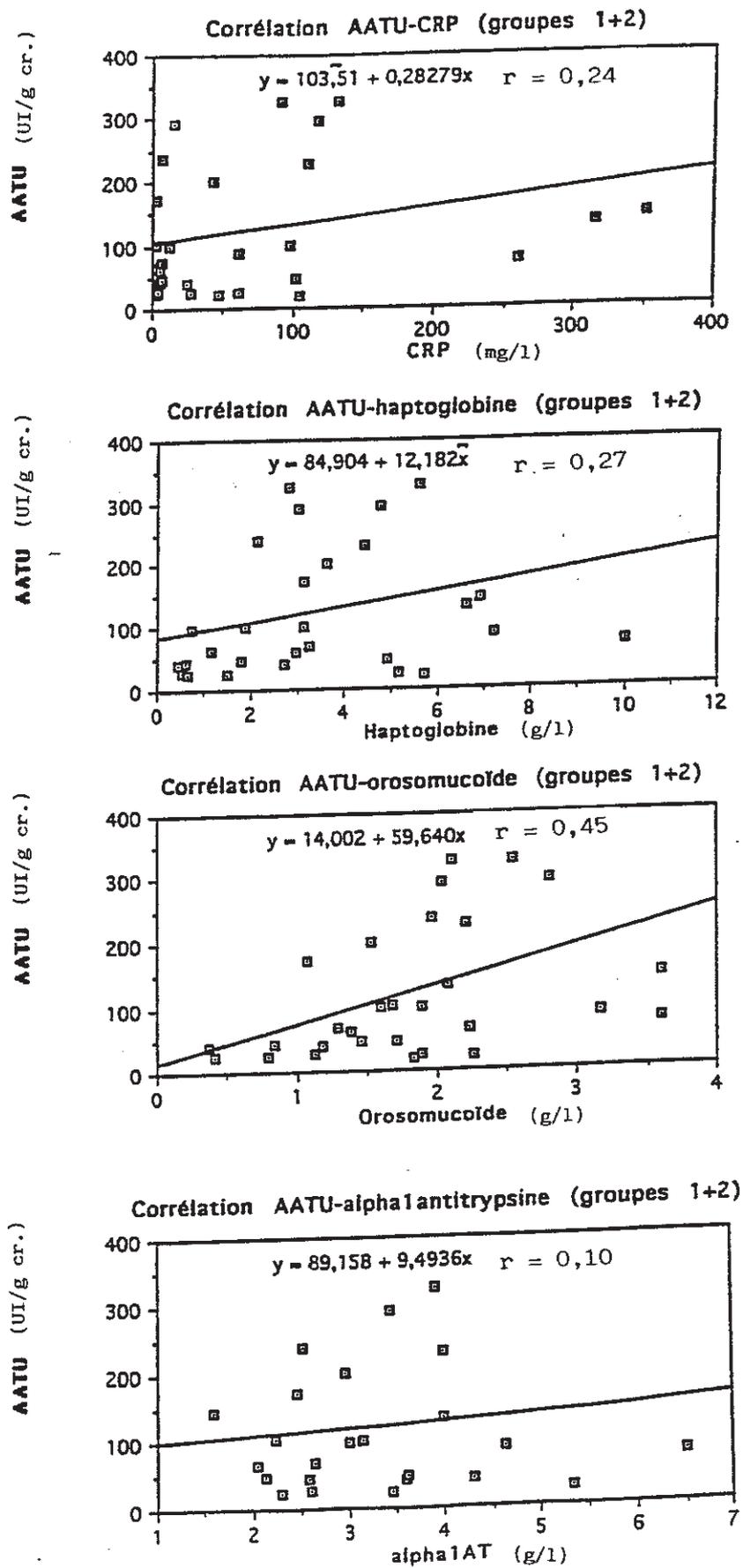


FIGURE 7 : Courbes de corrélations de l'AATU avec les protéines de l'inflammation [groupes (1 + 2) et valeur seuil à 60 UI/g créatininurie].

TABLEAU XVa

CRP (mg/l)	Infections bactériennes (groupes 1+2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 20	18	11	29
< 20	14	15	29
Total	32	26	58

Sensibilité	: 56 %	Spécificité	: 58 %
VPP	: 62 %	VPN	: 52 %

TABLEAU XVb

CRP (mg/l)	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 20	6	23	29
< 20	4	25	29
Total	10	48	58

Sensibilité	: 60 %	Spécificité	: 52 %
VPP	: 21 %	VPN	: 86 %

TABLEAU XV : Evaluation de la performance du dosage de la CRP pour l'ensemble des 58 patients quel que soit le taux de lymphocytes CD4+/mm³.

XVa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XVb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2)

TABLEAU XVIa

CRP (mg/l)	Infections bactériennes (groupes 1+2)	Infections non bactériennes (groupes 3+4+5)	Total
≥ 20	12	8	20
< 20	12	13	25
Total	24	21	45

Sensibilité	: 50 %	Spécificité	: 62 %
VPP	: 60 %	VPN	: 52 %

TABLEAU XVIb

CRP (mg/l)	Infections à MAC (groupe 2)	Infections non MAC (groupes 1+3+4+5)	Total
≥ 20	6	14	20
< 20	4	21	25
Total	10	35	45

Sensibilité	: 60 %	Spécificité	: 60 %
VPP	: 30 %	VPN	: 84 %

TABLEAU XVI : Evaluation de la performance du dosage de la CRP pour les 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³.

XVIa : toutes infections bactériennes (groupes 1 + 2)

XVIb : infections mycobactériennes à MAC (groupe 2)

DISCUSSION

I - VALIDITE DE LA METHODE

A - EFFET DES CONDITIONS DE CONSERVATION DE L'URINE SUR LE DOSAGE DE L'AATU

D'après Loufti et coll. [38], pour le dosage de l'AATU due à l'inhibiteur apparenté à l'ITI, les échantillons d'urine peuvent être conservés au moins 5 jours à 4°C sans perte d'activité. Mais que devient cette activité antitrypsique après 5 jours de conservation ?

L'analyse de nos résultats sur l'effet des conditions de conservation de l'urine sur le dosage de l'AATU (Tableau V) montre une augmentation significative de l'AATU aussi bien après 8 jours de conservation à 4°C qu'à -20°C par rapport au dosage effectué à JO. Après 15 jours de conservation à 4°C ou -20°C, l'élévation de l'AATU reste encore significative. Par contre, nous n'observons aucune différence significative de l'AATU après 8 ou 15 jours si l'on compare pour chacun de ces délais les 2 températures testées.

A la vue de ces résultats, on pourrait proposer l'hypothèse suivante : après 8 jours de conservation, l'UTI ne subirait-il pas une dégradation qui conduirait à des inhibiteurs qui exerceraient également une activité antitrypsique d'où l'élévation du taux.

Nous pensons qu'il est donc préférable d'effectuer le dosage de l'AATU dans un délai maximum de 5 jours après le prélèvement, au mieux le jour même du prélèvement des urines. Pour le contrôle, on conseille de le conserver au maximum 5 jours de préférence à -20°C.

B - CRITERES DE QUALITE DE LA METHODE

La précision de la méthode est appréciée par la détermination des répétabilités et des reproductibilités intra-et intersérielles. L'analyse statistique des résultats à partir de ces différentes données montre que la précision est bonne, puisque les coefficients de variation pour le témoin et pour le malade sont

respectivement de 8,85 % et 4,26 % pour la répétabilité intrasérielle et de 10,3 % et 6,9 % pour la reproductibilité intersérielle.

En outre, il est intéressant de noter que le dosage de l'AATU est un dosage simple, rapide (1 heure maximum) et peu onéreux puisqu'il ne nécessite aucun appareillage coûteux (bain-marie, spectrophotomètre) et dont les réactifs sont également peu onéreux.

II - INTERET CLINIQUE DE LA DETERMINATION DE L'AATU

A - AIDE AU DIAGNOSTIC DU PARAMETRE AATU

1 - Intérêt général du paramètre AATU

Le clinicien confronté à un état inflammatoire aigu ou chronique fait doser les protéines de l'inflammation pour apprécier l'intensité du syndrome inflammatoire, surveiller l'évolution de l'affection en cause ou orienter son diagnostic. Les modifications des concentrations sériques de ces protéines sont la conséquence d'une synthèse hépatique accrue induite par des médiateurs comme l'interleukine I [25].

D'autres marqueurs de l'inflammation ne sont encore guère utilisés en clinique humaine, tel l'inhibiteur urinaire de la trypsine (UTI). Rappelons que l'UTI se forme par protéolyse limitée de l'ITI sous l'action de l'élastase leucocytaire et est capable de passer dans l'urine où il est responsable de l'essentiel de l'activité antitrypsique urinaire. Gosset et coll [25] ont montré que l'activité antitrypsique urinaire représente en cas de syndrome inflammatoire, un marqueur spécifique du processus infectieux bactérien.

Le rôle de l'infection paraît clairement mis en évidence également par nos résultats. En effet, l'AATU de la population témoin est très faible (12 UI/g créatinine \pm 1,52) et une élévation de l'AATU a pu être retrouvée dans l'urine de malades appartenant aux différents groupes de la population étudiée.

2 - Définition d'une valeur seuil de l'AATU

Compte tenu d'une première valeur seuil retenue pour l'AATU (60 UI/g créatininurie), l'analyse statistique des résultats du dosage de l'AATU chez les 58 patients VIH+ fébriles de notre étude montre qu'ils sont nettement significatifs

dans le sens d'une élévation de l'AATU dans les infections mycobactériennes à MAC (groupe 2) par rapport aux infections bactériennes non mycobactériennes (groupe 1), aux infections parasitaires et fongiques (groupe 3) et virales (groupe 4) ($p < 0,001$ dans tous les cas).

Chez ces patients une valeur d'AATU ≥ 60 UI/g créatininurie a une sensibilité de 66 %, une spécificité de 69 %, une valeur prédictive positive (VPP) de 72 % et une valeur prédictive négative (VPN) de 62 % pour le diagnostic de toutes les infections bactériennes (groupes 1 + 2). De plus, la même valeur seuil d'AATU (≥ 60 UI/g créatininurie) a une sensibilité de 100 %, une spécificité de 60 % et une VPP de 34 % qui serait probablement plus importante dans un contexte de fièvres inexplicables pouvant relever essentiellement de MAC ; cette valeur médiocre s'explique par la réalisation du dosage quelles que soient les orientations diagnostiques. Il nous faut surtout souligner l'obtention d'une VPN de 100 % pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC (groupe 2) permettant d'éliminer avec certitude le diagnostic de MAC en cas de valeur < 60 UI/g créatininurie.

Un second seuil d'AATU ≥ 100 UI/g créatininurie a une sensibilité de 44 %, une spécificité de 85 %, une VPP de 78 % et une VPN de 55 % pour le diagnostic de toutes les infections bactériennes (groupes 1 + 2). Pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC (groupe 2), ce nouveau seuil d'AATU a une sensibilité de 70 %, une spécificité de 77 %, une VPP de 39 % (pour laquelle nous faisons la même remarque que pour une valeur seuil à 60), une VPN de 93 %.

On peut en conclure qu'un seuil d'AATU ≥ 100 UI/g créatininurie permet de diminuer le nombre de faux positifs mais en diminuant la sensibilité de ce test pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC et surtout ne permet plus d'exclure le diagnostic de MAC en cas de valeur < 100 UI/g créatininurie.

Il nous paraît donc judicieux de fixer le seuil d'AATU à 60 UI/g créatininurie plutôt qu'à 100 UI/g créatininurie et ce pour le diagnostic d'infection bactérienne et plus particulièrement pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC. En effet, une élévation au-delà de 60 peut laisser supposer un processus en cours d'évolution qui serait peut être confirmé quelques semaines après par un taux au-delà de 100. Cette hypothèse n'a jamais été vérifiée par le suivi de nos malades ce qui aurait certes apporté un argument complémentaire. Par contre la VPP est plus faible. D'autre part, un taux d'AATU < 60 UI/g créatininurie élimine dans 100 % des cas l'hypothèse diagnostique

d'une infection à MAC. La VPN reste excellente pour un titre < 100 UI/g créatininurie.

3 - Influence du taux de lymphocytes CD4+

a - Répartition de notre population

Si on s'interroge sur l'éventuelle influence du taux de lymphocytes CD4+/mm³, il apparaît que 90 % des patients de notre étude ont un taux de lymphocytes CD4+ < 200/mm³ et 10 % ont un taux compris entre 200 et 499/mm³. Aucun des patients ne présente un taux de CD4+ dépassant 500/mm³. Il s'agit donc de patients pour la majorité d'entre eux très immunodéprimés.

En raison de l'échantillonnage des patients de notre étude (n = 58) et du fait que 90 % des patients ont moins de 200 lymphocytes CD4+/mm³, les valeurs d'AATU en fonction du nombre de lymphocytes CD4+/mm³ pour chacun des 5 groupes de patients demeurent sensiblement les mêmes. On retrouve toujours une augmentation significative de l'AATU dans les infections mycobactériennes à MAC (groupe 2) par rapport aux infections bactériennes (groupe 1) et aux infections parasitaires ou fongiques (groupe 3) et virales (groupe 4).

b - Intérêt de l'étude chez les patients avec un taux de CD4+ < 100/mm³

Sachant que l'infection à MAC sera d'autant plus probable que le taux de CD4+ est < 100/mm³ il était primordial de comparer pour ce taux les résultats d'AATU obtenus pour le groupe 2 à MAC par rapport aux autres groupes.

Nos résultats sont statistiquement significatifs dans le sens d'une élévation de l'AATU dans les infections mycobactériennes à MAC (groupe 2) qui demeure d'ailleurs identique par rapport aux infections bactériennes (groupe 1) mais aussi par rapport aux infections parasitaires et fongiques (groupe 3) et aux infections virales (groupe 4).

Comme les 10 patients ayant développé une infection mycobactérienne à MAC avaient d'emblée et logiquement moins de 100 lymphocytes CD4+/mm³ (médiane = 7,5) et en raison de l'échantillonnage modéré de patients (n=45) on retrouve sensiblement les mêmes valeurs de sensibilité, de spécificité, de VPP et de VPN pour le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC quelle que soit la valeur seuil d'AATU choisie.

B - CORRELATION AVEC LES AUTRES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION

Les protéines de la réaction inflammatoire jouent un rôle essentiel dans la réponse de la phase aiguë de l'inflammation. Ces protéines, biosynthétisées par le foie peuvent être classées selon l'amplitude des variations de leur concentration plasmatique et leur vitesse d'apparition dans le plasma après le début de la réaction inflammatoire. Nous ne citerons ici que les protéines dosées au cours de notre étude :

- la C-Réactive Protéine est la protéine dont la concentration augmente de 300 à 1000 fois et dont la vitesse d'apparition est très précoce (12 heures) ;
- l'haptoglobine, l'orosomucoïde ou $\alpha 1$ glycoprotéine acide, et l' $\alpha 1$ antitrypsine sont les protéines dont la concentration augmente de 2 à 4 fois et dont la vitesse d'apparition est plus tardive (2 à 4 jours).

Rappelons brièvement que la CRP est classiquement dosée au cours des infections bactériennes, des nécroses tissulaires et des traitements antibiotiques et anti-inflammatoires.

L'haptoglobine permet de mesurer avec précision une réaction inflammatoire modérée et permet également d'apprécier la fin de la réponse systémique de la réaction inflammatoire.

L'orosomucoïde est plus intéressante en cas de syndrome inflammatoire associé à une hémolyse intra-vasculaire.

Notre analyse se limitera essentiellement à comparer la performance du dosage plus classique de la CRP par rapport à celui de l'AATU, principalement en cas d'infections mycobactériennes à MAC.

En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent, que les corrélations entre AATU et les 4 protéines inflammatoires : CRP, haptoglobine, orosomucoïde, $\alpha 1$ antitrypsine étaient certes positives mais relativement médiocres.

Il apparaît que le dosage de la CRP est moins performant que celui de l'AATU (quel que soit le choix du seuil de positivité) chez les patients VIH+ fébriles de notre étude si l'on prend la totalité des patients quel que soit le taux de CD4+, cette observation est faite dans le diagnostic d'infections bactériennes (groupes 1 + 2) : sensibilité = 56 % (contre 66 % pour l'AATU à une valeur seuil de 60 UI/g), spécificité = 58 % (contre 69 %), VPP = 62 % (contre 72 %) et VPN = 52 % (contre 62 %). Cette observation est également valable pour le diagnostic spécifique d'infection mycobactérienne à MAC (groupe 2) : sensibilité = 60 %

(contre 100 %), spécificité = 52 % (contre 60 %), VPP = 21 % (contre 34 %) et VPN = 86 % (contre 100 %). Nous obtenons le même ordre de différence si l'on compare CRP et AATU pour les seuls patients ayant un taux de CD4+ < 100/mm³.

Dans cette étude prospective, la mesure de l'AATU est donc un test tout à fait intéressant pour orienter le clinicien vers le diagnostic d'infection mycobactérienne à MAC chez les patients VIH+ fébriles. L'infection à MAC est en effet le plus souvent très protéiforme sur le plan clinique et des arguments diagnostiques indirects sont souhaitables pour initier le plus rapidement possible le traitement. L'AATU est constamment élevée dans les infections mycobactériennes de notre série au-delà d'un seuil à 60 UI/g créatininurie, qui est le seuil considéré comme pathologique dans la majorité des études disponibles [23, 43].

Nos résultats sont donc en faveur d'une élévation plus importante de l'AATU dans les infections à MAC que dans d'autres maladies infectieuses chez les patients VIH+ fébriles.

Nous estimons que ce test réalisé chez un patient VIH+ immunodéprimé (CD4+ < 100/mm³) et fébrile peut en cas de valeur > 60 UI/g créatininurie orienter le clinicien vers la décision d'un traitement antimycobactérien d'épreuve avant la confirmation définitive du diagnostic fournie par le résultat microbiologique.

Enfin, soulignons que l'aspect économique du dosage de l'AATU ainsi que sa réalisation aisée peuvent paraître intéressants certes de façon générale mais notamment dans les pays en voie de développement principalement touchés par le virus VIH.



CONCLUSION

L'inhibiteur trypsique urinaire (UTI) et l'inter α trypsine inhibiteur (ITI) présentent une parenté immunologique et structurale [40]. Ce dernier apparaît donc comme le précurseur probable de l'inhibiteur urinaire (ou AATU) auquel il donnerait naissance sous l'action de diverses protéases, et en particulier de l'élastase leucocytaire. Ce mécanisme reste cependant discuté [47]. Il permettrait de considérer l'AATU comme un marqueur de l'activation des granulocytes neutrophiles. L'UTI, une fois formé, est excrété très rapidement dans l'urine. L'activité antitrypsique qu'il y exerce est très stable vis-à-vis des protéases comme des conditions de pH ou de force ionique existant dans ce milieu.

Tous ces éléments se conjuguent pour faire de l'AATU un marqueur très accessible (dosage simple, rapide, peu coûteux) permettant de dépister de manière spécifique un processus infectieux bactérien et plus particulièrement une infection mycobactérienne à MAC chez les patients infectés par le VIH et fébriles ayant moins de 100 lymphocytes CD4+/mm³. Il s'avère qu'il en soit qu'une valeur d'AATU < 60 UI/g créatininurie élimine à 100 % un diagnostic de MAC.

Ainsi le clinicien pourrait-il disposer dans un délai très bref d'une orientation très probable aidant à la décision de mise en route d'un traitement antimycobactérien d'épreuve. Toutefois, l'AATU ne peut que précéder sans s'y substituer l'analyse microbiologique qui reste l'argument diagnostique majeur et définitif d'une infection mycobactérienne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AROOR A.R., PATTABIRAMAN T.N.
Serum and urinary protease inhibitors in renal disorders.
Ind. J. Med. Res., 1979, 69 : 798-803.
- [2] BALDUYCK-AOUADI M.
Une antiprotéase de l'urine humaine : isolement, caractérisation, intérêt clinique.
Thèse pour le Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques Lille 2, 1983.
- [3] BALDUYCK M., HAYEM A., KERCKAERT J.P., MIZON C., MIZON J.
Isolation of a human urinary trypsin inhibitor.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1982, 109 : 1247-1255.
- [4] BALDUYCK M., LAROUÏ S., LOUFTI H., MIZON C., MIZON J.
L'inter- α -trypsine inhibiteur du plasma : étude immunoélectrophorétique chez le sujet sain et au cours de la réaction inflammatoire.
4^o Symposium sur les marqueurs de l'inflammation (Germi, 1987).
- [5] BALDUYCK M., MIZON C., LOUFTI H., RICHET C., ROUSSEL P., MIZON J.
The major urinary trypsin inhibitor is a proteoglycan.
Eur. J. Biochem., 1986, 158 : 417-422.
- [6] BALDUYCK M., MIZON J.
L'inter-alpha-trypsine inhibiteur et ses dérivés plasmatiques et urinaires.
Ann. Biol. Clin., 1991, 49 : 273-281.
- [7] BARTHELEMY-CLAVEY V., YAPO E.A., VANHOUTTE G., HAYEM A., MIZON J.
Purification et caractérisation des inhibiteurs de protéases de l'urine humaine.
Biochem. Biophys. Acta, 1979, 580 : 154-165.
- [8] BAUER J., REICH Z.
Über die antitrypsische Wirkung des Harns.
Med. Klin., 1909, 46 : 1744-1747.
- [9] BELEC L., RIPOLL L., MOTTA F., MBOPI KEOU F.X., COTIGNY S., LONGUET MF., ET JACOB A.
Marqueurs biologiques prévisionnels d'évolution au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine.
Ann. Biol. Clin., 1992, 50 : 621-637.

- [10] BISSUEL et coll.
Mycobactéries atypiques et SIDA.
12^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse. Déc. 1992,
Paris.
- [11] BOURGUIGNON J., SESBOÛE R., DIARRA-MEHRPOUR M., DAVEAU M.,
MARTIN J.P.
Human inter- α -trypsin inhibitor : synthesis and maturation in hepatoma Hep G2
cells.
Biochem. J., 1989, 261 : 305-308.
- [12] Ministère de la Santé.
Définition du SIDA avéré (Révision 1987).
Bull. Epidémio. Hebd., 1987, 51 : 201-203.
- [13] Ministère de la Santé.
Révision de la définition du SIDA en France.
Bull. Epidémio. Hebd., 1993, 11 : 47-48.
- [14] Ministère de la Santé.
Données épidémiologiques du SIDA en 1994.
Bull. Epidémio. Hebd., 1994, 45 : 211.
- [15] BYRJALSEN I., HANSEN-NORD G., ODUM L.
Human inter- α -trypsin inhibitor and immunologically related inhibitors
investigated by quantitative immunoelectrophoresis. 1. Method and reference
material.
Clin. Chim. Acta., 1986, 61 : 59-68.
- [16] CHAWLA R.K., WADSWORTH A.D., RUDMAN D.
Relation of the urinary cancer-related glycoprotein EDC 1 to plasma inter- α -
trypsin inhibitor.
J. Immunol., 1978, 121 : 1636-1639.
- [17] CHIDIAC C., MOUTON Y.
Infections à mycobactéries atypiques au cours du SIDA.
Press. Med., 1993, 22 : 1405-1412.

- [18] DIETZ A.A., RUBINSTEIN H.M. AND HODGES L.
Measurement of alpha 1-antitrypsin in serum by immunodiffusion and by enzymatic assay.
Clin. Chem., 1974, 20 : 396-399.
- [19] DIETZ A.A., RUBINSTEIN H.M., HODGES L.K.
Use of α -N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide as trypsin substrate in estimation of α 1-antitrypsin.
Clin. Chem., 1976, 22 : 1754-1755.
- [20] DILLARD G.H.L.
The trypsin inhibitor of the urine in health and disease.
J. Lab. Clin. Med., 1950, 36 : 266-271.
- [21] ENGHILD J.J., THOGERSEN I.B., PIZZO S.V., SALVESEN G.
Analysis of inter- α -trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre- α -trypsin inhibitor from human plasma.
J. Biol. Chem., 1989, 264 : 15975-15981.
- [22] FAARVANG H.J.
The urinary trypsin inhibitor in men ("mingin").
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1965, 17 : 1-76.
- [23] GEBHARD W., HOCHSTRASSER K.
Inter- α -trypsin inhibitor and its close relatives.
In : Barrett, Salvesen, Proteinase Inhibitors (Elsevier Science Eds), 1986, pp 389-401.
- [24] GEBHARD W., SCHREIT MÜLLER T., HOCHSTRASSER K., WACHTER E.
Two out of the three kinds of subunits of inter- α -trypsin inhibitor are structurally related.
Eur. J. Biochem., 1989 ; 181 : 571-576.
- [25] GOSSET D., MIZON C., SAVINEL P., BALDUYCK M., BONIFACE B., HATRON P.Y., MIZON J., DEVULDER B.
Intérêt clinique de la détermination de l'activité antitrypsique urinaire.
Press. Méd., 1988, 17 : 329-332.

[26] GOSSET D., MIZON C., SOUDAN B., HEBBAR M., BALDUYCK M., HATRON P.Y., MIZON J., DEVULDER B.

Valeur relative du dosage de la CRP, de l'élastase leucocytaire et de la mesure de l'activité antitrypsique urinaire au cours du lupus systématique.

XX° Congrès National de Médecine Interne, Lille, 1989 pp 120.

[27] GROSSET J., TRUFFOT-PERNOT C., BOISVERT H., CALANDE V.

Qu'est-ce que les mycobactéries atypiques ?

Med. Mal. Infect., 1991, 21 : 7-15.

[28] HEIDE K., HEINBURGER N., HAUPT H.

An inter-alpha-trypsin inhibitor of human serum.

Clin. Chim. Acta, 1965, 11 : 82-85.

[29] HOCHSTRASSER K., BRETZEL G., FEUTH H., HILLA W. AND LEMPART K.

The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable proteinase inhibitor in human serum and urine.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, 357 : 153-162.

[30] HOCHSTRASSER K., NIEBEL J., LEMPART K.

Säurelabile derivat des Inter- α -Trypsin Inhibitors.

Klin. Wschr., 1977, 55 : 343-345.

[31] HOCHSTRASSER K., SCHÖNBERGER O.L., ROSSMANITH I., WACHTER E.

Künitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. V. Attachments of carbohydrates in the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1981, 362 : 1357-1362.

[32] HORN R., LASZLO A., ROBSON H.G.

Recovery of *Mycobacterium avium* intracellulare from blood specimens using the routine BACTEC 6B blood culture system.

J. Clin. Microbiol., 1989, 27 : 348-349.

[33] HORSBURGH C.R. JR.

Mycobacterium avium complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome.

N. Engl. J. Med., 1991, 324 : 1332-1338.

- [34] LAMBIN P., FINE J.M., STEINBUCH M.
Nouvelles données sur une antiprotéase du plasma humain : l'inter-alpha-trypsine inhibiteur.
Revue Française de Transfusion et d'Immuno-Hématologie, 1975, 18 : 385-400.
- [35] LAROUÏ S., BALDUYCK M., MIZON C., SELLOUM L., MIZON J.
Plasma proteins immunologically related to inter- α -trypsin inhibitor.
Biochem. Biophys. Acta, 1988, 953 : 263-268.
- [36] LEVASSEUR S.
In purification et caractérisation des dérivés urinaires et bronchiques de l'inhibiteur inter-alpha de la trypsine.
Thèse pour le Doctorat du 3ème cycle de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Rouen 1988.
- [37] LEVEILLARD T., SESBOÛE R., DEFOUILLY C., VERRA F., VOISIN S., PIQUET J., DE CREMOUX H., MARTIN J.P., BIGNON J.
An allele of the human inter- α -trypsin inhibitor light chain gene is more common in patients suffering from pulmonary emphysema than in general population.
Am. Rev. Resp. Dis., 1990, 141 : A 355.
- [38] LOUTFTI H., MIZON C., BALDUYCK M., GOSSET D., TACQUET A., MIZON J.
Activité antitrypsique de l'urine et α 1 protéase inhibiteur.
Ann. Biol. Clin., 1989, 47 : 261-267.
- [39] MIZON C., BALDUYCK M., BONNETERRE J.P., MIZON J.
Urinary trypsin inhibitory capacity determination : study in patients with disseminated cancers.
Bull. Cancer (Paris), 1983, 70 : 266-270.
- [40] MORII M., TRAVIS J.
The reactive site of human inter- α -trypsin inhibitor is in the amino-terminal half of the protein.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1985, 366 : 19-21.

[41] NIGHTINGALE STEPHEN D., CAMERON W., GORDIN F., SULLAM PAUL A., COHN DAVID L., CHAISSON RICHARD E., ERON LAURENCE J., SPARTI PAULA D., BIHARI BERNARD, KAUFMAN DAVID L., STERN JOHN J., PEARCE DANIEL D., WEINBERG WINKLER G., LAMARCA ANTHONY, SIEGAL FREDERICK P.

Two controlled trials of Rifabutin prophylaxis against Mycobacterium Avium complex infection in Aids.

N. Engl. J. Med., 1993, 329 : 828-833.

[42] NOWAK S.

The urinary trypsin inhibitors in some diseases.

Enzym. Biol. Clin., 1968, 9 : 41-52.

[43] ODUM L., HANSEN-NORD G., BYRJALSEN I.

Human inter- α -trypsin inhibitor and immunologically related inhibitors investigated by quantitative immunoelectrophoresis. II Pathological conditions.

Clin. Chim. Acta, 1987, 162 : 189-198.

[44] PERLMUTTER D.H., DINARELLO C.A., PUNSAL P.I., COTTEN H.R.

Cachectin tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression.

J. Clin. Invest., 1986, 78 : 1349-1354.

[45] PIETTE A.M., LIVARTOWSKI J., BERNARD N., LESPRIT P., GEPNER P., CHAPMAN A.

Valeur de la mesure de l'activité antitrypsique urinaire pour le diagnostic d'infection bactérienne aigüe chez les patients séropositifs pour le VIH.

XXVI Congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Toulon 1992.

[46] PIETTE A.M., SABA J., BERNARD N., POUGHEON M., ABAT O., FERMANIAN J., PIETTE J.C., CHAPMAN A.

Urinary trypsin inhibitory activity for the diagnosis of bacterial infection : a prospective study in 690 patients.

Eur. J. Med., 1992, 1, 273-276.

[47] PRATT C.W., PIZZO S.V.

In vivo metabolism of inter- α -trypsin inhibitor and its proteinase complexes : evidence for proteinase to $\alpha 2$ macroglobulin and $\alpha 1$ -proteinase inhibitor.

Arch. Biochem. Biophys., 1986, 248 : 587-596.

- [48] PRATT C.W., PIZZO S.V.
Mechanism of action of inter- α - trypsin inhibitor.
Biochem., 1987, 26 : 2855-2863.
- [49] RAMESH-BHAT A. AND PATTABIRAMAN T.N.
Urinary-proteinase inhibitor in premature infants and its comparison with amniotic-fluid-acid-stable proteinase inhibitor.
Biochem. Med., 1982, 27 : 168-179.
- [50] RUDMAN D., CHAWLA R.K., HENDRICKSON L.J., VOGLER W.R., SOPHIANOPOULOS A.J.
Isolation of a novel glycoprotein (EDC1) from the urine of a patient with acute myelocytic leukemia.
Cancer Res., 1976, 36 : 1837-1846.
- [51] RUDMAN D., CHAWLA R.K., NIXON D.W., VOGLER W.R., KELLER J.W., MAC DONELL R.C.
Proteinuria with disseminated neoplastic diseases.
Cancer Res., 1979, 39 : 699-703.
- [52] SALIER J.P., MARTIN J.P., LAMBIN P., MCPHEE H., HOCHSTRASSER K.
Purification of the human serum inter- α -trypsin inhibitor by zinc chelate and hydrophobic interaction chromatographies.
Anal. Biochem., 1980, 109 : 273-283.
- [53] SALIER J.P., SESBOÛE R., VERCAIGNE D., BOURGUIGNON J., MARTIN J.P.
Inter- α -trypsin inhibitor (ITI) : use of a new antisera for qualitative studies and discrete quantification of ITI and its derivatives.
Anal. Biochem., 1983, 133 : 336-343.
- [54] STEINBUCH M.
The inter-alpha-trypsin inhibitor.
Meth. Enzymol., 1976, 45 : 760-772.
- [55] STEINBUCH M., LOEB J.
Isolation of an alpha-2-globulin from human plasma.
Nature, 1961, 192 : 1196.

[56] YOUNG L.S.

Treatable aspects of infection due to human immunodeficiency virus.

Lancet, 1987, ii : 1503-1506.

TABLE DES MATIERES

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	p. 3
<u>INTRODUCTION</u>	p. 4
<u>1ère PARTIE : GENERALITES</u>	p. 7
<u>I - RAPPEL SUR LE SYNDROME D'IMMUNO-DEFICIENCE ACQUISE (SIDA)</u>	p. 8
A - Définition.	p. 8
B - Révision de la définition du SIDA en France.	p. 9
1 - Nombre de lymphocytes CD4+ circulants.	p. 9
2 - Catégories cliniques.	p. 11
C - Marqueurs biologiques prévisionnels d'évolution au cours de l'infection par le VIH.	p. 12
D - Infections opportunistes : problème diagnostique des mycobactéries atypiques.	p. 12
<u>II - ACTIVITE ANTITRYPSIQUE DE L'URINE (AATU)</u>	p. 14
A - Définition.	p. 14
B - Rappel biochimique sur l'inter- α -trypsique inhibiteur (ITI)	p. 14
1 - Isolement.	p. 15
2 - Concentration et masse moléculaire.	p. 15
3 - Structure.	p. 15
4 - Stabilité.	p. 16
5 - Composition.	p. 16
6 - Métabolisme de l' ITI :	p. 16
a - Biosynthèse.	p. 16
b - Catabolisme.	p. 18
7 - Rôle physiologique de l' ITI :	p. 18
a - Activité antiprotéasique.	p. 18
b - Activité de facteur de croissance.	p. 19
c - Activité anti-inflammatoire.	p. 19

C - Rappel biochimique sur l'antiprotéase UTI (Urinary Trypsin Inhibitor : Inhibiteur Trypsique Urinaire)	p. 19
1 - Historique, Définition.	p. 19
2 - Structure :	p. 20
a - Composition en acides aminés de UTI.	p. 21
b - Composition en sucres de UTI.	p. 21
c - Copule glucidique de UTI.	p. 21
3 - Biosynthèse	p. 24
4 - Variations physiopathologiques de l'AATU :	p. 24
a - Excrétion chez le sujet sain :	p. 24
α - Cycle nyctéméral.	p. 24
β - Variation selon l'âge.	p. 24
γ - Excrétion au cours de la grossesse.	p. 24
b - Excrétion anormale :	p. 25
α - Maladies rénales.	p. 25
β - Interventions chirurgicales.	p. 25
γ - Thrombose coronarienne.	p. 25
δ - Cancers.	p. 25
ε - Maladies inflammatoires.	p. 26

2ème partie : MATERIEL et METHODES D'ETUDE p. 27

I - POPULATION ETUDIEE p. 28

A - Population témoin	p. 28
1 - Population témoin proprement dite	p. 28
2 - Population témoin appelée contrôle	p. 28
B - Population de malades	p. 29
1 - Critères d'inclusion	p. 29
2 - Classification de la population de malades	p. 29

II - METHODES D'ETUDE p. 29

A - Prélèvements	p. 29
1 - Prélèvement urinaire à J1 de l'hospitalisation	p. 29
2 - Prélèvement veineux à J1 de l'hospitalisation	p. 30

B - Dosage de l'AATU	p. 30
1 - Principe du dosage : méthode en point final	p. 30
2 - Interférence de l' α 1 protéase inhibiteur (α 1 PI) sur le dosage de l'AATU	p. 32
3 - Mode opératoire	p. 32
a - Protéinurie	p. 32
b - Créatininurie	p. 33
c - Dosage de l'AATU proprement dit : technique de Foch	p. 33
C - Dosage des protéines sériques	p. 36
<u>3ème partie : RESULTATS</u>	p. 37
<u>I - VALIDITE DE LA METHODE</u>	p. 38
A - Conservation des échantillons d'urine	p. 38
B - Critères de qualité de la méthode	p. 40
C - Valeur normale de l'AATU	p. 40
<u>II - RESULTATS BIOLOGIQUES</u>	p. 40
A - Description des patients	p. 40
B - Valeurs de l'AATU	p. 43
1 - Selon les 5 groupes de patients	p. 43
2 - Selon le taux de lymphocytes CD4+	p. 45
C - Valeurs des protéines de l'inflammation	p. 46
1 - Selon les 5 groupes de patients	p. 46
2 - Selon le taux de lymphocytes CD4+	p. 47
D - Détermination de la valeur seuil de l'AATU	p. 47
1 - Pour l'ensemble des 58 patients quel que soit le taux de CD4+	p. 47
a - Valeur seuil à 60 UI/g créatininurie	p. 47
b - Valeur seuil à 100 UI/g créatininurie	p. 47

2 - Pour les patients dont le taux de lymphocytes CD4+ est inférieur à 100/mm ³	p. 50
a - Valeur seuil à 60 UI/g créatininurie	p. 50
b - Valeur seuil à 100 UI/g créatininurie	p. 50
E - Corrélations AATU - Protéines de l'inflammation	p. 53
1 - Courbes de corrélation	p. 53
2 - Sensibilité et spécificité de la C Réactive Protéine (CRP)	p. 53
<u>4ème partie : DISCUSSION</u>	p. 57
<u>I - VALIDITE DE LA METHODE</u>	p. 58
A - Effet des conditions de conservation de l'urine sur le dosage de l'AATU.	p. 58
B - Critères de qualité de la méthode.	p. 58
<u>II - INTERET CLINIQUE DE LA DETERMINATION DE L'AATU</u>	p. 59
A - Aide au diagnostic du paramètre AATU	p. 59
1 - Intérêt général du paramètre AATU	p. 59
2 - Définition d'une valeur seuil de l'AATU	p. 59
3 - Influence du taux de lymphocytes CD4+	p. 61
a - Répartition de notre population	p. 61
b - Intérêt de l'étude chez les patients avec un taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm ³	p. 61
B - Corrélation avec les autres marqueurs de l'inflammation	p. 62
<u>CONCLUSION</u>	p. 64
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 66
<u>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</u>	p. 79
<u>ANNEXE</u>	p. 82

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU I	p. 10
Révision 1993 du système de classification de l'infection VIH pour les adultes et les adolescents.	
TABLEAU II	p. 22
Composition en acides aminés de UTI (% de résidus).	
TABLEAU III	p. 23
Composition en glucides de UTI.	
TABLEAU IV	p. 34
Mode opératoire pour le dosage de l'AATU.	
TABLEAU V	p. 39
Influence des conditions de conservation (durée et température) sur le dosage de l'AATU.	
TABLEAU VI	p. 41
Répétabilité et reproductibilités intra-et intersérielles pour un prélèvement de témoin et un prélèvement de malade.	
TABLEAU VII	p. 42
Description des groupes de patients selon les diagnostics.	
TABLEAU VIII	p. 44
Valeurs de l'AATU dans les divers groupes de patients.	
TABLEAU IX	p. 45
Valeurs de l'AATU en fonction du taux de CD4+/mm ³ .	

- TABLEAU X** p. 46
Valeurs des protéines de l'inflammation dans les cinq groupes de patients.
- TABLEAU XI** p. 48
Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour une valeur seuil à 60 UI/g créatinine urinaire.
- TABLEAU XII** p. 49
Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour une valeur seuil à 100 UI/g créatinine urinaire.
- TABLEAU XIII** p. 51
Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour les 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³ et pour une valeur seuil à 60 UI/g créatinine urinaire.
- TABLEAU XIV** p. 52
Evaluation de la performance du dosage de l'AATU pour les 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³ et pour une valeur seuil à 100 UI/g créatinine urinaire.
- TABLEAU XV** p. 55
Evaluation de la performance du dosage de la CRP pour l'ensemble des 58 patients quel que soit le taux de CD4+/mm³.
- TABLEAU XVI** p. 56
Evaluation de la performance du dosage de la CRP pour les 45 patients dont le taux de lymphocytes CD4+ < 100/mm³.
- FIGURE 1** p. 17
Structure de l'ITI et de ses dérivés.
- FIGURE 2** p. 20
Détermination de la masse moléculaire de UTI par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS, gradient 5-25 %.
- FIGURE 3** p. 31
Mécanisme d'hydrolyse du substrat en présence de trypsine.

- FIGURE 4** **p. 43**
Valeurs de l'AATU dans la population des patients présentant un taux de CD4+ < 100/mm³.
- FIGURE 5** **p. 45**
Répartition des patients en fonction du nombre de lymphocytes CD4+.
- FIGURE 6** **p. 50**
Répartition du nombre des 45 patients ayant moins de 100 CD4+/mm³ par groupe de diagnostic.
- FIGURE 7** **p. 54**
Courbes de corrélation de l'AATU avec les protéines de l'inflammation (groupes 1 + 2) et valeur seuil à 60 UI/g créatinine.

ANNEXE

Composition des réactifs utilisés pour le dosage de l'AATU

◆ TAMPON tris-HCL

- tris hydroxyméthylamino méthane 12,114 g
- CaCl₂ (20 mM) 2,940 g
- H₂O QSP 1000 ml
- Ajuster à pH 8,2 avec HCl N.
- Conservation à 4°C.

◆ SOLUTION DE TRYPSINE

*** solution mère :**

- 10 mg de trypsine (Merck) dans 20 ml HCl 10⁻³ M, conservation 4°C.

*** solution fille (extemporanée) :**

- dilution au 1/10 dans HCl 10⁻³ M.
- Conservation à température ambiante.

◆ SOLUTION BAPNA (Substrat AATU) → p nitroaniline)

*** solution mère :**

- 50 mg de BAPNA (Merck) dans 1,15 ml de diméthylformamide (Merck).
- Conservation 4°C (attention à l'éventuelle cristallisation).

*** solution fille :**

- au 1/100 en tampon tris-HCl (extemporanée).

◆ CH₃ COOH 30 % (solution arrêt)

- 30 ml de CH₃ COOH glacial dans 100 ml eau.
- Conservation à température ambiante.



RESUME

L'activité antitrypsique urinaire (AATU) est due essentiellement à l'excrétion d'une antiprotéase (UTI) acido et thermostable apparentée à l'inter α trypsine inhibiteur dont elle pourrait dériver par protéolyse.

Cinq groupes de malades ont été définis chez les 67 patients séropositifs pour le VIH et fébriles recrutés pour notre étude prospective : 22 infections bactériennes non mycobactériennes (groupe 1), 10 infections mycobactériennes à mycobactéries atypiques (MAC) (groupe 2), 14 infections parasitaires et fongiques (groupe 3), 7 infections virales (groupe 4), 5 autres (groupe 5).

Très faible chez le sujet sain ($12 \pm 1,52$ UI/g créatinine urinaire), l'AATU était nettement augmentée en cas d'infections bactériennes (médiane à 60) et plus particulièrement en cas d'infections mycobactériennes à MAC (médiane à 192).

Ce test paraît plus discriminant en terme de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative vis-à-vis du processus infectieux bactérien que la détermination de la C-Réactive Protéine, dosée conjointement dans le sérum de ces malades.

La détermination de l'AATU (simple, rapide, peu onéreuse) peut orienter le clinicien vers une infection à MAC chez un patient VIH+ fébrile ayant moins de 100 lymphocytes CD4+/mm³ ; une VPN de 100 % pour une valeur seuil à 60 UI/g créatininurie permet d'écartier avec certitude le diagnostic de MAC en-dessous de cette valeur. Cela devrait aider à la décision de mise en route d'un traitement antimycobactérien d'épreuve précocément dans l'attente d'une confirmation microbiologique.

MOTS-CLES

- Trypsine
- Inter alpha-Trypsine Inhibiteur
- Infections opportunistes
- SIDA
- Mycobactéries atypiques