



HAL
open science

Intérêt de l'étude des isoenzymes de la créatine kinase et de la détection des macroCK en pathologie foetale

Isabelle Bock

► **To cite this version:**

Isabelle Bock. Intérêt de l'étude des isoenzymes de la créatine kinase et de la détection des macroCK en pathologie foetale. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01732242

HAL Id: hal-01732242

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732242v1>

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2012**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 25 octobre 2012

par Isabelle BOCK
née le 26 janvier 1985 à Toul (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**Intérêt de l'étude des isoenzymes de la créatine kinase
et de la détection des macroCK
en pathologie foetale**

Membres du Jury

Président : Professeur Brigitte LEININGER, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Directeur : Docteur Brigitte DOUSSET, Biologiste, PH CHU Nancy

Juges : Professeur Jean-Luc OLIVIER, Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy

Docteur Alain MITON, Gynécologue-obstétricien, PH Maternité Régionale
Universitaire de Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2012-2013

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL/Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

Faculté de Pharmacie

Présentation

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL ☿	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN ☿	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA ☿	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>

Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT ☞	87	Biologie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAÏ	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE ☞	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☞ En attente de nomination

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ð' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ð'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ðe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A notre Président de Jury

Madame le Professeur Brigitte LEININGER-MULLER
Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

*Veillez trouver ici l'expression de ma
gratitude et de mon profond respect.*

A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Brigitte DOUSSET
PH, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire
Hôpital Central, CHU Nancy

Je vous remercie de m'avoir confié ce travail et de m'avoir guidée tout au long de sa réalisation.

Vous avez été pour moi une parfaite directrice de thèse, impliquée, toujours disponible, encadrante mais également une personne remplie d'humanité, capable d'écouter, de conseiller et de me rassurer dans les moments de doute.

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A nos Juges

Monsieur le Professeur Jean-Luc OLIVIER
Professeur à la Faculté de médecine de Nancy
Chef de service du Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire
Hôpital Central, CHU Nancy

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

*Veillez trouver ici l'expression de
mon profond respect et le témoignage
de mes remerciements sincères.*

Monsieur le Docteur Alain MITON
PH, Gynécologie-Obstétrique,
Maternité Régionale Universitaire de Nancy

*Je vous remercie sincèrement pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée afin
de mener à bien ce travail.*

*Soyez assuré de toute ma reconnaissance
et de mon profond respect.*

**Aux techniciens des laboratoires de Biochimie polyvalente et
d'urgence et de biochimie spécialisée**

pour leur gentillesse et leur contribution à la réalisation de ce travail

**Aux secrétaires du service de gynécologie –obstétrique de la
Maternité Régionale de Nancy**

pour leur accueil chaleureux

Au personnel du DIM de la Maternité Régionale de Nancy

**Au Dr Haritina EL ADSSI du Service d'Epidémiologie et
Evaluation Clinique du CHU de Nancy**

pour son aide à l'analyse statistique des données.

A mes parents

pour leur amour et leur soutien de tous les jours

A mon frère Xavier, Florence et leur petite Camille

A mes amis

A mes co-internes

A tous les biologistes, assistants et techniciens

qui m'ont transmis leur savoir tout au long de ces 4 années d'internat

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	13
Liste des abréviations	18
Liste des figures	20
Liste des tableaux	23
INTRODUCTION	25
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	28
A. <u>LES METHODES DE DIAGNOSTIC ANTENATAL</u>	29
1. L'échographie	29
2. Les examens biologiques chez le fœtus	29
2.1. L'amniocentèse	30
2.2. La biopsie de trophoblaste ou choriocentèse	31
2.3. Le prélèvement de sang fœtal ou cordocentèse	32
2.4. Les biopsies de tissus fœtaux	34
2.5. Les ponctions liquidiennes fœtales	35
3. Les examens biologiques dans le sang maternel	35
3.1. Les cellules fœtales circulantes	35
3.2. L'ADN fœtal libre circulant	36
B. <u>BIOLOGIE DU SANG FOETAL</u>	39
1. Contraintes inhérentes à la biologie fœtale	39
2. Biochimie du fœtus sain	40
2.1. Comparaison des concentrations maternelles et fœtales	42
2.2. Variation au cours de la grossesse	43
3. Application au diagnostic prénatal de la biochimie du sang fœtal	48
C. <u>LA CREATINE KINASE</u>	52
1. Définition	52
2. Structure	52
2.1. Les molécules « classiques »	52
2.1.1. Les isoenzymes de la CK	52
2.1.2. Les isoformes circulantes	54
2.2. Les isoenzymes CK atypiques ou macroCK	56
3. Localisation tissulaire de la créatine kinase	59

4. Rôle physiologique de la créatine kinase	61
5. Principales méthodes de mesure	63
5.1. Mesure de l'activité créatine kinase totale	65
5.2. Dosage des isoenzymes de la créatine kinase	65
5.2.1. <i>Techniques d'électrophorèse</i>	65
5.2.2. <i>Dosage de la CK MB par technique d'immunoinhibition</i>	68
5.2.3. <i>Dosage pondéral de la CK MB</i>	69
5.2.4. <i>La chromatographie d'échange d'ions</i>	70
5.2.5. <i>L'immunoprécipitation</i>	70
5.2.6. <i>Les méthodes radioimmunologiques</i>	70
5.3. Dosage des isoformes de la CKMM et de la CKMB	71
6. Variations préanalytiques de la CK	72
6.1. Facteurs de variation liés au sujet	72
6.2. Facteurs de variation liés au prélèvement	72
6.3. Facteurs de variation liés à l'échantillon	72
7. Valeurs de référence et variations physiologiques	74
7.1. Chez l'enfant	75
7.2. Chez l'adulte	75
7.3. Chez la femme enceinte	77
7.4. Chez le fœtus	78
7.4.1. <i>Activité CK totale</i>	78
7.4.2. <i>Isoenzymes CK</i>	78
8. Variations pathologiques de la créatine kinase	85
8.1. Chez l'adulte	85
8.2. Chez le fœtus	87
8.2.1. <i>Activité CK & isoenzymes : retard de croissance et souffrance foetale</i>	87
8.2.2. <i>Isoenzyme CKMB et atteinte cardiaque</i>	89
8.2.3. <i>Isoenzyme CKBB et souffrance cérébrale</i>	89
9. Fréquence et signification clinique des macroCK de type 1 et 2	90
9.1. Chez l'adulte	90
9.2. Chez l'enfant	94

PRESENTATION DE L'ETUDE	96
A. MATERIEL ET METHODES	97
1. Population	97
2. Prélèvements	98
3. Méthodes de dosage	99
3.1. Activité CK totale	99
3.2. Activité CK MB	99
3.3. Electrophorèse des isoenzymes CK	100
4. Analyse statistique	105
B. RESULTATS	106
1. Analyse des profils électrophorétiques	106
1.1. Profils électrophorétiques de sérum de sujets adultes	106
1.1.1. Profil normal de sérum adulte / CQ Helena	106
1.1.2. Profil de sérum adulte hémolysé	107
1.1.3. Profil de sérum adulte avec macroCK	109
1.2. Profils électrophorétiques de sérums foetaux	110
1.2.1. Profil normal de sérum foetal / CQ Helena	110
1.2.2. Profil de sérum foetal avec hémolyse	111
1.2.3. Profil ininterprétable de sérum foetal	111
1.2.4. Profil de sérum foetal avec macroCK	111
2. Description de la population d'étude (n=116)	118
3. Profils électrophorétiques interprétables	125
3.1. Description de la population d'étude retenue (n=84)	125
3.2. Activités CK totale et CKMB & isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB	129
3.2.1. Influence du sexe foetal	129
3.2.2. Influence de l'âge gestationnel	130
3.2.3. Notion de RCIU	125
3.2.4. Influence du type de pathologies	136
3.2.5. Pourcentages relatifs des isoenzymes et activité CK totale	138
3.3. Etude comparative des foetus avec et sans macroCK	139
3.3.1. Influence de l'âge, du sexe et de la notion de RCIU	140

3.3.2. Influence de la présence de macroCK sur l'activité CK totale et CKMB	141
3.3.3. Influence de la présence de macroCK sur la répartition des isoenzymes ..	142
3.3.4. Relation avec les pathologies fœtales	143
4. Etude des foetus présentant une macroCK (n=20).....	149
4.1. Caractéristiques épidémiologiques : sexe, AG, pathologie	149
4.2. Lien entre présence de macroCK et activité CK totale	150
4.3. Pourcentage de macroCK & sexe, âge gestationnel, type de pathologie foetale	153
4.3.1. Répartition des pourcentages de macroCK	153
4.3.2. Relation avec le sexe foetal	154
4.3.3. Relation avec l'âge gestationnel	154
4.3.4. Relation avec la pathologie foetale	154
4.4. Interférence de la macroCK sur la mesure de l'activité CKMB par technique d'immunoinhibition	155
4.5. Présence de macroCK et détermination des isoenzymes CK	157
C. DISCUSSION	161
1. Population	162
2. Activité CK totale	165
3. Profil électrophorétique des isoenzymes CK du sang foetal	165
3.1. Interférence liée à la présence d'albumine	166
3.2. Influence de l'hémolyse	167
3.3. Profil ininterprétable	167
4. Distribution des isoenzymes CK	168
5. Interférence de la macroCK dans les dosages d'activités enzymatiques	170
5.1. Activité CK totale	170
5.2. Activité CKMB mesurée par immunoinhibition	171
5.3. Dosage de l'isoenzyme CKMM par électrophorèse	173
6. Présence de macroCK en pathologie foetale	173
6.1. Résultats de l'étude	173
6.2. Origine des macroCK chez le foetus	175
CONCLUSION	178
Références bibliographiques	182
Annexes	203

LISTE DES ABREVIATIONS

AAAC	American Association for Clinical Chemistry
ABM	Agence de la Biomédecine
ADN	acide desoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AIFM	allo-immunisation foeto-maternelle
AK	adénylate kinase
ALAT	alanine aminotransférase
AMP	adénosine monophosphate
APSO	atrésie pulmonaire à septum ouvert
ARN	acide ribonucléique
ASAT	aspartate aminotransférase
ATP	adénosine triphosphate
B	sous- unité B de la créatine kinase (Brain)
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIVD	coagulation intravasculaire disséminée
CK	créatine kinase
CK Mi	créatine kinase mitochondriale
CKMM	isoenzyme MM de la créatine kinase (Muscle-Muscle)
CKMB	isoenzyme MB de la créatine kinase (Muscle-Brain)
CKBB	isoenzyme BB de la créatine kinase (Brain-Brain)
CPDPN	Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal
CPK	créatine phosphokinase
CQ	contrôle de qualité
Da	dalton
DAPP	diadénosine-5-pentaphosphate
DEAE	diéthylamino-éthyl Sépharose
DGKC	Deutsche Gesellschaft von Klinische Chemie (Société Allemande de Chimie Clinique)
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EPO	érythropoïétine
Fab	fragment fixant l'antigène
GGT	gamma-glutamyltransférase
G6PD	glucose-6-phosphate deshydrogénase
hCG	hormone chorionique gonadotrope
HK	hexokinase

IDM	infarctus du myocarde
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
Ig	immunoglobuline
IMG	interruption médicale de grossesse
Km	constante de Michaelis
LDH	lactate deshydrogenase
M	sous-unité M de la créatine kinase (Muscle)
NAC	N-acétyl-cystéine
NaCl	chlorure de sodium
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH+H ⁺	forme réduite du NAD
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH+H ⁺	forme réduite du NADP
NBT	nitrobleu de tétrazolium
NS	non significatif
PAL	phosphatase alcaline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMS	phénazine méthosulfate
PSF	ponction de sang foetal
RCIU	retard de croissance intra-utérin
RHD	antigène Rhésus D
RPM	rupture prématurée des membranes
SA	semaine d'aménorrhée
SFBC	Société Française de Biologie Clinique
SNC	système nerveux central
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
SSCC	Société Scandinave de Biochimie Clinique
TSH	thyréostimuline
VDDI	ventricule droit à double issue

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Formation des isoformes de la créatine kinase.....	54
<u>Figure 2</u> :	Localisation des différentes isoformes de la CK MM et de la CK MB sur gel d'électrophorèse	54
<u>Figure 3</u> :	Migration électrophorétique des macroCK.....	57
<u>Figure 4</u> :	Réaction catalysée par la créatine kinase dans le cytosol et les mitochondries au moment de la contraction musculaire.....	62
<u>Figure 5</u> :	Métabolisme énergétique dans la cellule musculaire.....	62
<u>Figure 6</u> :	Migration électrophorétique des isoenzymes CK et des formes atypiques...	67
<u>Figure 7</u> :	Principe du dosage de l'activité CKMB par immunoinhibition.....	68
<u>Figure 8</u> :	Dosage immunologique de la CKMB.....	69
<u>Figure 9</u> :	Variations de l'activité CK totale chez le fœtus en fonction de l'âge gestationnel.....	79
<u>Figure 10</u> :	Mode opératoire de l'électrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose Helena Biosciences®.....	101
<u>Figure 11</u> :	Migration électrophorétique des isoenzymes CK et des macroCK sur gel d'agarose.....	102
<u>Figure 12</u> :	Electrophorèse sur gel d'agarose (Hélène Biosciences®) des isoenzymes CK d'un sérum adulte normal.....	106
<u>Figure 13</u> :	Interférence de l'hémolyse (+, ++, +++) sur l'électrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose (Hélène Biosciences®) (plasma adulte).....	108
<u>Figure 14</u> :	Electrophorèse sur gel d'agarose d'un sérum adulte avec présence de macroCK de type 1.....	109
<u>Figure 15</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose d'un sérum foetal normal.....	110
<u>Figure 16</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus L. (sérum hémolysé/sérum non hémolysé).....	112
<u>Figure 17</u> :	Comparaison des profils « hémolysés » chez l'adulte et chez le fœtus.....	113
<u>Figure 18</u> :	Exemples de profils électrophorétiques ininterprétables (sérum foetal)....	114
<u>Figure 19</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°7 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 8%.....	115
<u>Figure 20</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°8 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 12%.....	115
<u>Figure 21</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°5 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 18%	116

<u>Figure 22</u> :	Electrophorèse des isoenzymes CK du foetus n°15 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 22%	116
<u>Figure 23</u> :	Comparaison d'un profil de sérum foetal avec macroCK de type 1 (22%) et d'un profil de sérum foetal hémolysé.....	117
<u>Figure 24</u> :	Répartition des foetus (n=116) selon les codes « pathologies » définis par l'Agence de la Biomédecine	129
<u>Figure 25</u> :	Répartition des foetus selon le sexe et le code pathologie (n=116)	121
<u>Figure 26</u> :	Profils électrophorétiques des deux foetus présentant une activité CKMB mesurée par immunoinhibition supérieure à l'activité CK totale	124
<u>Figure 27</u> :	Répartition des pathologies des foetus de la population initiale (n=116) et de la population retenue (n=84)	127
<u>Figure 28</u> :	Répartition des foetus selon le sexe et le code pathologie dans la population retenue (n=84)	129
<u>Figure 29</u> :	Variation de l'activité CK totale en fonction de l'âge gestationnel	131
<u>Figure 30</u> :	Variation de l'activité CKMB en fonction de l'âge gestationnel	131
<u>Figure 31</u> :	Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMM (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel	133
<u>Figure 32</u> :	Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMB (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel	133
<u>Figure 33</u> :	Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKBB (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel	134
<u>Figure 34</u> :	Distribution des valeurs d'activité CK totale (UI/L) dans chaque groupe de pathologies	137
<u>Figure 35</u> :	Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMM en fonction de l'activité CK totale	138
<u>Figure 36</u> :	Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMB en fonction de l'activité CK totale	139
<u>Figure 37</u> :	Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKBB en fonction de l'activité CK totale	139
<u>Figure 38</u> :	Distribution des valeurs d'activité CK totale chez les foetus sans (n=64) et avec macroCK (n=20).....	141
<u>Figure 39</u> :	Distribution des valeurs d'activité CKMB (dosage par immunoinhibition) chez les foetus sans (n=64) et avec macroCK (n=20)	141
<u>Figure 40</u> :	Distribution du pourcentage relatif de CKMM chez les foetus avec (n=20) et sans macroCK (n=64)	142
<u>Figure 41</u> :	Distribution du pourcentage relatif de CKMB chez les foetus avec (n=20) et sans macroCK (n=64)	142

<u>Figure 42</u> :	Distribution du pourcentage relatif de CKBB chez les foetus avec (n=20) et sans macroCK (n=64)	143
<u>Figure 43</u> :	Répartition des pathologies observées (%) chez les foetus avec et sans macroCK.....	144
<u>Figure 44</u> :	Répartition des foetus avec présence de macroCK en fonction de l'âge gestationnel	149
<u>Figure 45</u> :	Répartition des foetus avec macroCK selon le code pathologie de l'Agence de la Biomédecine	150
<u>Figure 46</u> :	Répartition des foetus avec macroCK en fonction de l'activité CK totale ...	150
<u>Figure 47</u> :	Distribution de l'activité CK totale chez l'ensemble des foetus étudiés, chez les foetus sans et avec macroCK.....	151
<u>Figure 48</u> :	Répartition de l'activité CK totale en fonction du code pathologie	152
<u>Figure 49</u> :	Variation de l'activité CK totale en fonction du pourcentage relatif de macroCK	153
<u>Figure 50</u> :	Répartition des foetus en fonction du pourcentage de macroCK	153
<u>Figure 51</u> :	Répartition du pourcentage de macroCK en fonction de l'âge gestationnel	154
<u>Figure 52</u> :	Répartition du pourcentage de macroCK en fonction du code pathologie...	155
<u>Figure 53</u> :	Comparaison des pourcentages de CKMB mesurés par immunoinhibition et par électrophorèse (méthode des différences)	156
<u>Figure 54</u> :	Activité CKMB (dosage par immunoinhibition) en pourcentage de l'activité CK totale en fonction du pourcentage de macroCK.....	156
<u>Figure 55</u> :	Variation du pourcentage de CKMM en fonction du pourcentage de macroCK.....	157
<u>Figure 56</u> :	Variation du pourcentage de CKMB en fonction du pourcentage de macroCK.....	158
<u>Figure 57</u> :	Variation du pourcentage de CKBB en fonction du pourcentage de macroCK	158

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> :	Distribution des isoenzymes de la créatine kinase dans les tissus humains	59
<u>Tableau II</u> :	Concentration finale des réactifs utilisés pour le dosage de l'activité créatine kinase selon la méthode de référence IFCC	64
<u>Tableau III</u> :	Stabilité in vitro de l'activité CK totale et des isoenzymes en fonction de la température de conservation	73
<u>Tableau IV</u> :	Valeurs de référence de l'activité CK totale dans le sérum en fonction de l'âge, du sexe et de la température du milieu réactionnel	74
<u>Tableau V</u> :	Valeurs de référence de la créatine kinase chez l'enfant	75
<u>Tableau VI</u> :	Activité CK totale dans le sang de cordon à la naissance	81
<u>Tableau VII</u> :	Répartition des isoenzymes CK dans le sang de cordon à la délivrance de nouveaux nés à terme en bonne santé	82
<u>Tableau VIII</u> :	Valeurs de référence de la CKMB en néonatalogie (dosage pondéral)	83
<u>Tableau IX</u> :	Corrélation entre le score d'Apgar et l'activité CK totale et CK MM dans le sang de cordon à la naissance.....	88
<u>Tableau X</u> :	Prévalence des macroCK de type 1 et 2 dans la population adulte	91
<u>Tableau XI</u> :	Classification des pathologies foetales selon les codes définis par l'Agence de la Biomédecine	97
<u>Tableau XII</u> :	Reproductibilité du dosage des isoenzymes CK par électrophorèse sur gel d'agarose Hélène Biosciences	103
<u>Tableau XIII</u> :	Activité du CPDPN et répartition annuelle des prélèvements de sang foetal reçus au laboratoire de Biochimie entre le 01/01/2008 et le 31/12/2011 (n = 135)	118
<u>Tableau XIV</u> :	Caractéristiques des foetus (n=116) répartis selon le code « pathologie » ..	120
<u>Tableau XV</u> :	Caractéristiques épidémiologiques, biologiques et pathologiques des foetus présentant un profil électrophorétique ininterprétable des CK.....	122
<u>Tableau XVI</u> :	Répartition des profils ininterprétables (n=18) et interprétables (n=84) en fonction de la valeur de CK totale.....	123
<u>Tableau XVII</u> :	Caractéristiques des 2 foetus présentant un profil ininterprétable des isoenzymes CK	124
<u>Tableau XVIII</u> :	Analyse comparative des caractéristiques générales de la population initiale (n= 116) et de la population retenue (n=84).....	126
<u>Tableau XIX</u> :	Analyse comparative des caractéristiques générales (âge maternel, âge gestationnel, sexe) des foetus répartis par code pathologie dans les deux populations d'étude n= 116 et n=84.....	128

<u>Tableau XX</u> : Comparaison des paramètres biologiques selon le sexe du foetus.....	130
<u>Tableau XXI</u> : Analyse comparative des activités CK totale et CKMB en fonction du terme de la grossesse au moment de la ponction de sang foetal (2 ^{ème} versus 3 ^{ème} trimestre)	132
<u>Tableau XXII</u> : Analyse comparative de la distribution des isoenzymes CK en fonction du terme de la grossesse au moment de la ponction de sang foetal (2 ^{ème} versus 3 ^{ème} trimestre)	134
<u>Tableau XXIII</u> : Comparaison des paramètres biologiques des foetus répartis en deux groupes selon la présence ou l'absence de RCIU	135
<u>Tableau XXIV</u> : Paramètres biologiques des foetus répartis selon les codes « pathologie »	136
<u>Tableau XXV</u> : Description et analyse comparative des foetus avec et sans macroCK.....	140
<u>Tableau XXVI</u> : Description des pathologies observées chez les foetus avec et sans macroCK.....	145

INTRODUCTION

La présence de macroenzymes circulantes, formes de poids moléculaire supérieur aux enzymes normales, est un phénomène décrit depuis une cinquantaine d'années, désormais bien connu des biologistes en raison des interférences potentielles sur le dosage des activités enzymatiques et du risque d'erreur d'interprétation qu'elles peuvent entraîner.

Depuis la première description d'une macroamylase en 1964 par Wilding chez un patient atteint de connectivite (*Wilding et al, 1964*), de nombreuses publications dans les années 1970 et 1980 ont rapporté l'existence de tels complexes macromoléculaires pour la grande majorité des enzymes circulantes couramment dosées : LDH (*Lundh et al, 1965*), PAL (*Nagamine et al, 1975*), CPK (*Lim et al, 1975*), ASAT (*Konttinen et al, 1978*), ALAT (*Kajita, 1978*), phosphatase acide (*Vijri et al, 1985*), GGT (*Artur et al, 1984*), lipase (*Stein et al, 1987*).

Résultant de modifications post-traductionnelles, il s'agit dans la majorité des cas de complexes formés par la liaison de l'enzyme à une immunoglobuline, plus rarement d'une auto-aggrégation de molécules enzymatiques (exemple de la macroCK de type 2) ou d'une association d'enzymes avec des lipoprotéines ou des constituants membranaires (essentiellement décrite pour les enzymes membranaires PAL, GGT et alanine aminopeptidase) (*Maire et al, 1987 ; Artur et al, 1987*).

Ni le mécanisme à l'origine de la formation de ces complexes ni leur signification physiopathologique ne sont à l'heure actuelle parfaitement élucidés.

L'existence de macroenzymes a été décrite chez les adultes ainsi que chez les enfants et les nouveaux-nés. Par contre, à notre connaissance, aucune publication n'a jusqu'à présent rapporté l'existence d'une macroenzyme chez le fœtus.

La biologie foetale constitue un domaine très particulier de la biologie qui a connu un essor considérable grâce à la mise au point de la technique de ponction de sang foetal au cordon par l'équipe de Daffos en 1983. Elle se heurte malheureusement à certaines contraintes inévitables. D'une part, la cordocentèse est un geste invasif, non dénué de complications potentielles pour le fœtus, ce qui en restreint les indications. D'autre part, l'impossibilité de prélever de grandes quantités de sang foetal limite le nombre de paramètres pouvant être analysés simultanément sur le même échantillon. Enfin, pour des raisons éthiques, il est difficile de prélever des fœtus sains afin d'établir des valeurs biologiques de référence. L'ensemble de ces éléments explique la rareté des études cliniques réalisées chez les fœtus.

Une collaboration entre l'unité de médecine foetale de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy et le laboratoire de biochimie spécialisée de l'Hôpital Central du CHU de Nancy a été mise en place afin d'évaluer l'intérêt du dosage de plusieurs paramètres biochimiques comme marqueurs de gravité d'une souffrance tissulaire chez des foetus atteints de pathologies graves. L'envoi de sang foetal prélevé in utéro juste avant l'interruption médicale de grossesse (IMG) a permis de réaliser entre autres, un dosage des activités CK totale et CKMB ainsi qu'une électrophorèse des isoenzymes CK.

Devant l'observation non exceptionnelle de profils atypiques montrant une macroCK, il nous a paru intéressant d'analyser rétrospectivement l'ensemble des profils obtenus chez les foetus sur une période d'activité de 4 ans entre le 1^{er} janvier 2008 et le 31 décembre 2011.

Dans la première partie bibliographique, après une brève revue des différentes méthodes de diagnostic anténatal, nous aborderons la place de la biochimie en médecine foetale, ses limites et ses applications. Nous rappellerons ensuite les connaissances actuelles concernant la créatine kinase, les macroCK et leur signification physiopathologique.

La seconde partie comprendra l'étude de 116 prélèvements sanguins effectués chez 116 foetus présentant diverses pathologies graves. Notre objectif est de répondre aux questions suivantes :

- l'activité CK totale et les isoenzymes MM, MB et BB peuvent-elles être utilisées comme marqueurs de lésions tissulaires chez le foetus ?
- la présence de macroCK est -t-elle fréquente dans le sang foetal ? De quel type de macroCK s'agit-il ?
- l'existence de macroCK est-elle liée à une pathologie foetale particulière ?

Enfin, nous analyserons nos résultats au vu des connaissances actuelles sur les macroCK chez l'adulte afin de déterminer l'intérêt de la recherche d'une macroCK en pathologie foetale.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A. LES METHODES DE DIAGNOSTIC ANTENATAL

Le diagnostic anténatal permet de mettre en évidence, plus ou moins précocement au cours de la vie intra-utérine, l'existence chez le fœtus d'anomalies plus ou moins graves. Il repose principalement sur l'anamnèse, les signes cliniques, les signes échographiques et la biologie.

1. L'échographie

L'échographie donne des renseignements sur l'âge, la vitalité et la croissance foetale et permet d'étudier la morphologie du fœtus et les annexes (placenta, liquide amniotique, cordon ombilical). Elle permet le diagnostic des malformations du fœtus avec une parfaite innocuité, à la condition qu'elle soit correctement effectuée et renouvelée car toutes les anomalies ne s'observent pas au même stade de grossesse et peuvent évoluer au cours de la gestation. Elle permet en outre de guider les différents prélèvements foetaux.

2. Les examens biologiques chez le fœtus

Les examens biologiques sont le complément indispensable de l'exploration échographique dans un but à la fois diagnostique et pronostique afin d'évaluer la gravité de l'atteinte foetale et étudier le risque de récurrence pour les grossesses ultérieures.

Le diagnostic prénatal biologique nécessite l'obtention d'échantillons provenant du fœtus ou des structures ovulaires par différentes techniques telles que l'amniocentèse, le prélèvement des villosités choriales, le prélèvement de sang foetal et plus rarement les biopsies tissulaires et les ponctions liquidiennes foetales. Le choix de la technique dépend de l'indication et du terme de la grossesse.

Etant donné qu'il s'agit de méthodes invasives, la décision de réaliser un prélèvement foetal doit être étudiée au cas par cas en tenant compte de l'analyse du rapport bénéfice-risque.

Tous les types de prélèvements sont réalisés dans des conditions d'asepsie stricte et sous contrôle échographique permanent.

2.1. L'amniocentèse

(Colmant & Senat, 2012 ; Levy et al, 2003 ; Daffos & Forestier, 1988)

L'amniocentèse est le plus ancien et le plus fréquent des prélèvements foetaux. Elle consiste à prélever du liquide amniotique (20 mL) à travers la paroi abdominale maternelle à l'aide d'une aiguille sous échoguidage continu.

Les indications principales sont :

- l'étude du caryotype foetal,
- la recherche orientée d'anomalies génétiques moléculaires,
- la mise en évidence d'une contamination foetale par un agent infectieux viral ou parasitaire,
- l'étude biochimique du liquide amniotique sur signes d'appel échographique.

Pour illustrer cette dernière indication, on peut citer :

- le dosage de l'alpha-foeto-protéine, augmenté dans les défauts de fermeture de la paroi abdominale (omphalocèle, laparoschisis), dans les anomalies hautes des voies digestives (atrésie de l'oesophage) ainsi que dans les anomalies de fermeture du tube neural (anencéphalie, spina bifida) et en cas de souffrance foetale pré-mortem
- le dosage de l'acétylcholinestérase dans les défauts de fermeture du tube neural,
- le dosage des enzymes des villosités intestinales (gamma-glutamyl-transpeptidase, leucine amino-peptidase, isoenzymes des phosphatases alcalines) qui a un intérêt dans les malformations digestives pour préciser le niveau de l'obstruction
- le dosage de la bilirubine en cas d'anémie hémolytique par allo-immunisation foeto-maternelle (AIFM)
- l'évaluation de la maturation pulmonaire par le calcul du rapport lécithine/sphingomyéline
- le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme (aminoacidopathies, mucopolysaccharidoses...)

L'amniocentèse est classiquement réalisée à partir de 15 semaines d'aménorrhée (SA). Elle est possible avant ce terme, dès 11-12 SA mais le risque de fausse couche après amniocentèse précoce est majoré (CEMAT, 1998 ; Alfievic et al, 2003). Il n'y a pas de limite « supérieure » : le prélèvement peut être pratiqué en fin de grossesse, mais le rapport entre le volume foetal et le volume de liquide amniotique est moins favorable à partir du troisième trimestre.

En fin de grossesse, les cultures de cellules foetales du liquide amniotique poussent très lentement (le nombre de cellules foetales viables diminuent au delà de 32 SA), ne permettant d'obtenir que tardivement un résultat : les analyses cytogénétiques et

moléculaires seront réalisées de préférence sur prélèvement de sang foetal (*Daffos & Forestier, 1988*).

Les complications foetales sont très rares, leur fréquence étant inversement proportionnelle à l'expérience de l'opérateur. Les complications infectieuses sont exceptionnelles et les blessures foetales rarissimes. La fissuration des membranes survient après amniocentèse dans 0,6 à 1,5 % des cas (*Daffos & Forestier, 1988*), le plus souvent sans conséquence, l'écoulement de liquide étant habituellement transitoire. Le risque de fausse couche après amniocentèse est estimé, dans la littérature, entre 0,5 et 1% (*Tabor & Alfirevic, 2010*). Dans les équipes spécialisées en médecine foetale, il est légèrement inférieur, se situant entre 0,2 et 0,5% (*Blessed et al, 2001*). L'allo-immunisation foeto-maternelle Rhésus est un risque réel, majoré en cas de ponction transplacentaire et doit être systématiquement prévenue par injection de gamma-globulines anti-D chez les femmes Rhésus négatif.

2.2. La biopsie de trophoblaste

(*Colmant & Senat, 2012 ; Levy et al, 2003 ; Daffos & Forestier, 1988*)

La biopsie de trophoblaste ou prélèvement de villosités choriales est réalisée à partir de 11 SA par voie abdominale ou par voie transcervicale. L'intérêt par rapport à l'amniocentèse est de pouvoir obtenir des résultats de cytogénétique, de génétique moléculaire ou de biochimie, plus tôt dans la grossesse à un terme où une éventuelle indication d'interruption médicale de grossesse est encore réalisable par aspiration. Les indications sont principalement l'existence d'un risque de récurrence élevé pour une maladie génétique ou chromosomique, une hyper-clarté nucale, une anomalie morphologique à l'échographie du 1^{er} trimestre ou lorsque les marqueurs sériques maternels du 1^{er} trimestre sont élevés.

En termes de risque lié au geste, Tabor et Alfirevic conclut en 2010, dans une revue de la littérature, à un taux de perte foetale attribuable à la biopsie de trophoblaste de l'ordre de 0,5 à 1% comme celui attribuable à l'amniocentèse (*Tabor & Alfirevic, 2010*).

En revanche, le risque de la biopsie trophoblastique semble significativement moindre que celui d'une amniocentèse précoce réalisée avant 13 SA (*Alfirevic, 2000*).

2.3. Le prélèvement de sang foetal

(Colmant & Senat, 2012 ; Daffos et al., 2004 ; Levy et al, 2003 ; Daffos & Forestier, 1988)

Mis au point par l'équipe de Daffos en 1983, la ponction de sang foetal (PSF) échoguidée ou cordocentèse a ouvert la porte du compartiment vasculaire du foetus (Daffos et al, 1983).

Le prélèvement peut se faire à partir de 18 SA : avant cette date, la taille des vaisseaux ombilicaux, inférieur à 3 mm, rend la ponction très difficile. Le volume de sang prélevé est de 2 à 4 mL, ce qui permet d'obtenir une quantité suffisante pour la réalisation des différents dosages tout en limitant le retentissement sur l'hémodynamique foetale.

Le prélèvement se fait de préférence au niveau de la veine ombilicale car elle est plus large que l'artère ; de plus, sa ponction n'entraîne pas de spasme et est moins souvent associée à un risque de bradycardie foetale.

L'insertion placentaire du cordon est le site de ponction généralement choisi car il a l'avantage d'être relativement fixe mais il n'est pas toujours visible en raison de la présence du foetus qui peut en gêner l'accès.

Dans ce cas, l'opérateur peut prélever sur une anse libre du cordon ou au niveau de l'insertion ombilicale. Le prélèvement sur cordon libre est plus difficile techniquement du fait de la mobilité du cordon. Le site d'insertion ombilicale est également très mobile car le foetus tourne en général sur lui-même lorsqu'on essaie d'introduire l'aiguille dans le cordon. L'avantage majeur de ces 2 sites de ponction est l'absence de risque de contamination par du sang maternel.

D'autres sites de ponction plus rarement utilisés sont possibles :

- le prélèvement intracardiaque foetal : les cavités cardiaques peuvent être ponctionnées dès 14 SA et le risque de contamination par du sang maternel est évidemment nul. Ce site est cependant très peu utilisé en raison des risques de lésions cardiaques à court et à long terme et du risque de fausse couche ou mort foetale in utero qui est assez élevé autour de 4% (Antsaklis et al, 1992).
- le prélèvement de la veine ombilicale dans son trajet intra-abdominal foetal (Nicolini et al, 1990) : l'avantage est également l'absence de contamination par du sang maternel. Ses inconvénients sont l'impossibilité d'accès lorsque le foetus se présente dos en avant et le risque théorique plus important de déchirure de la paroi de la veine qui est très mince dans sa portion abdominale.

La ponction de sang foetal se fait avec une aiguille de 20 Gauge dont la progression est suivie en permanence par échographie. Une seringue contenant du citrate de sodium est adaptée dès le départ à l'aiguille, ce qui permet de limiter le risque de coagulation dans

l'aiguille et de vérifier que le sang « monte » facilement lorsque l'aiguille est en place dans la veine. Dès que le sang « monte », la seringue de citrate de sodium est remplacée par une seringue sèche de 5 mL.

2 à 4 mL de sang foetal sont prélevés et transférés dans des tubes contenant les anticoagulants appropriés aux dosages biologiques.

Le prélèvement de sang foetal reste à ce jour indispensable dans certaines indications telles que :

- l'exploration d'une anémie foetale avec indication de transfusion in utéro (AIFM ; infections à parvovirus, rubéole, CMV ; hémorragies foeto-maternelles spontanées ou post-traumatiques ; grossesse gemellaire avec syndrome transfuseur-transfusé).

La réalisation d'un hémogramme sur sang foetal permet d'apprécier le type d'anémie et sa gravité. La PSF permet en outre de disposer d'une voie d'abord vasculaire pour une éventuelle transfusion in utéro.

- l'exploration de l'hémostase foetale : on peut réaliser le dosage des facteurs de la coagulation ou l'étude de la fonction plaquettaire foetale dans le cas où l'anomalie génétique n'est pas identifiée dans la famille (ce qui rend donc impossible un diagnostic par biologie moléculaire sur trophoblaste ou liquide amniotique).

La PSF permet également le diagnostic de syndromes hémorragiques acquis tels qu'une CIVD (le plus souvent secondaire à une infection congénitale sévère) ou une thrombopénie d'origine immunologique ou infectieuse, d'en apprécier la gravité, de disposer d'un abord vasculaire pour une éventuelle transfusion in utéro de concentrés plaquettaires ou de facteurs de coagulation et de décider de la conduite à tenir obstétricale.

- l'exploration des déficits immunitaires congénitaux

- la réalisation du caryotype foetal sur lymphocytes circulants (en cas d'anamnios ou de terme tardif). En effet, la possibilité d'obtenir du sang foetal jusqu'à la fin de la grossesse, la rapidité (72h) et la qualité des caryotypes sur lymphocytes expliquent l'intérêt particulier de cette technique au troisième trimestre.

- le diagnostic des maladies métaboliques congénitales

- le dosage de la $\beta 2$ microglobuline : ne passant pas la barrière placentaire, son taux est donc seulement dépendant du métabolisme foetal. C'est un marqueur glomérulaire

indépendant du terme. Son dosage est utilisé comme facteur prédictif de l'insuffisance rénale foetale potentielle dans les uropathies (Berry et al, 1995 ; Dommergues et al, 2000).

A l'origine, la PSF a tenu une place considérable dans le diagnostic des infections foetales mais est actuellement remplacée par la détection directe des agents pathogènes par technique de PCR dans le liquide amniotique.

La ponction de sang foetal est un geste relativement plus délicat que ceux précédemment décrits et qui nécessite donc un opérateur expérimenté. Le taux de complications directement imputable à la PSF, est faible autour de 1% (Duchatel et al, 2003) mais légèrement supérieur aux autres prélèvements. Les risques théoriques de rupture prématurée des membranes et d'infection ovulaire existent mais sont en pratique exceptionnelles. La bradycardie foetale et les saignements au niveau du point de ponction ne sont pas rares mais sans conséquence lorsqu'ils sont de courte durée. Une évaluation des risques des PSF a montré que la durée du prélèvement était bien corrélée aux complications (Daffos et al, 1994). Il a été noté logiquement que les accidents surviennent plus fréquemment sur les foetus fragiles, malformés ou en hypoxie.

2.4. Biopsies de tissus foetaux

Les indications sont devenues exceptionnelles du fait du développement de la génétique moléculaire. Dans certaines situations, il faut cependant recourir à une biopsie d'organe pour effectuer un diagnostic prénatal.

Les biopsies cutanées foetales sont réalisables dès la 20^{ème} semaine d'aménorrhée pour la recherche des anomalies de pigmentation, de kératinisation ou d'épidermolyses bulleuses (Daffos & Forestier, 1988 ; Dieusaert, 1998).

La biopsie de foie reste également à ce jour le seul moyen de diagnostic prénatal pour mettre en évidence dans certaines familles conductrices un déficit en ornithine-carbonyl-transférase (Levy et al, 2003).

Les biopsies musculaires peuvent être (très rarement) nécessaires pour le diagnostic prénatal de myopathies congénitales lorsque l'anomalie génétique primitive est inconnue.

2.5. Les ponctions liquidienne foetales

Les collections liquidiennes - kystes, épanchements, masses abdominales anéchogènes - sont accessibles à la ponction échoguidée. Ce geste peut être à la fois diagnostique (dosage de l'oestradiol pour affirmer l'origine ovarienne d'un kyste) et thérapeutique (réduction du volume de la masse liquidienne) (*Levy et al, 2003*).

Dans le cadre des anomalies des reins et des voies excrétrices, en particulier les uropathies obstructives, la fonction rénale foetale peut être appréciée par l'analyse biochimique des urines foetales. La ponction d'urine est réalisée à l'aiguille sous échoguidage. Elle n'est possible que sur des cavités dilatées (vessie ou bassinnet).

Les valeurs normales ont été établies à partir de prélèvements d'urine réalisés dans des situations d'uropathies obstructives chez des enfants chez qui on a pu affirmer par la suite la normalité de la fonction rénale à l'âge de 1 an ou plus sur la base de la créatininémie (*Muller et al, 1996*). Ces valeurs doivent impérativement être interprétées en fonction du terme. Avant 20 semaines, les valeurs ne sont pas interprétables en raison de l'immaturité tubulaire.

De nombreux composants ont été étudiés parmi lesquels le sodium et la β_2 microglobuline se sont révélés être les plus discriminants pour la prédiction de la fonction rénale postnatale en cas d'uropathies obstructives (*Lipitz et al, 1993 ; Muller et al, 1993*). Ils étudient la fonction tubulaire.

Cependant, d'autres auteurs considèrent que l'analyse biochimique des urines foetales ne permet pas de prédire avec exactitude la fonction rénale foetale (*Wilkins et al, 1987 ; Morris et al, 2007*).

3. Les examens biologiques dans le sang maternel

C'est un enjeu majeur de la recherche actuelle en médecine foetale. En effet, accéder aux cellules foetales ou à l'ADN foetal de façon non invasive permet d'envisager le diagnostic prénatal précoce de nombreuses pathologies en évitant le risque lié aux prélèvements foetaux.

3.1. Les cellules foetales circulantes

Plusieurs types de cellules foetales sont présents dans le sang maternel : des cellules trophoblastiques, des lymphocytes, des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques et des érythroblastes (*Ganshirt et al, 1994*).

Les cellules foetales circulantes dans le sang maternel sont rares ; leur nombre varie en fonction du terme et de la technique utilisée, il est estimé approximativement à 1 cellule/mL de sang maternel (*Bianchi et al, 1997*). Elles n'ont pas été mises en évidence avant la 7^{ème} semaine d'aménorrhée (*Ariga et al, 2001*). Les érythroblastes ont une durée de vie courte (inférieure à 5 jours) tandis que les lymphocytes et les progéniteurs hématopoiétiques peuvent persister entre 1 et 27 ans après une grossesse (*Bianchi et al, 1996*) ; l'analyse de ces dernières cellules peut donc être faussée par des grossesses antérieures.

Bien qu'en théorie très prometteuse, l'utilisation des cellules foetales circulantes comme moyen de diagnostic prénatal reste encore aujourd'hui très limitée en raison des problèmes techniques d'isolement (absence de marqueurs de surface spécifiques des cellules foetales) et d'enrichissement préalables. Le diagnostic prénatal des maladies monogéniques a déjà été réalisé par le passé par ce moyen, mais il reste anecdotique. La seule étude clinique réalisée à grande échelle en 2002 pour le diagnostic non invasif de la trisomie 21 a abouti à la conclusion qu'un tel diagnostic ne peut être proposé actuellement en raison d'un manque de sensibilité et de spécificité (*Bianchi et al, 2002*).

Malgré les développements récents, l'utilisation clinique à court terme des cellules foetales circulantes semble peu probable.

3.2. L'ADN foetal libre circulant

La présence d'ADN foetal libre circulant dans le plasma ou le sérum maternel a été mise en évidence par Lo et al, en 1997. Depuis quelques années, l'analyse de cet ADN foetal fait partie intégrante des outils de diagnostic prénatal même si ces tests sont réservés à de rares laboratoires très spécialisés.

L'ADN foetal libre circulant est essentiellement d'origine placentaire, provenant de l'apoptose des cellules trophoblastiques (*Alberry et al, 2007*). Il représente environ 3 à 6% de la totalité de l'ADN libre retrouvé en circulation dans le sang maternel (le restant correspondant à l'ADN libre maternel) (*Lo et al, 1998*) et est majoritairement constitué de petits fragments d'ADN plutôt que de chromosomes entiers (80% de l'ADN de taille inférieure à 193 paires de bases) (*Chan et al 2004*). Détectable à partir de la 5^{ème} semaine de grossesse (*Illanes et al, 2007*), la concentration d'ADN foetal libre circulant augmente tout au long de la grossesse, atteignant un maximum dans les 8 dernières semaines (*Lo et al, 1998*).

Contrairement aux cellules foetales, l'ADN foetal circulant est totalement éliminé de la circulation maternelle moins de 48 heures après l'accouchement (*Lo et al, 1999*).

D'un point de vue technique, l'analyse de l'ADN foetal dans le sang maternel s'affranchit des problèmes d'isolement et d'enrichissement préalables à l'étude des cellules foetales. Elle ne nécessite qu'une simple extraction des acides nucléiques à partir du sang maternel suivie d'une amplification par PCR en temps réel des séquences d'intérêt.

Il faut néanmoins retenir que l'ADN foetal n'est pas contenu dans un noyau cellulaire (cell-free DNA) et par conséquent aucune analyse chromosomique (caryotype foetal) n'est envisageable.

D'autre part, cet ADN foetal est « dilué » au sein d'un ADN largement majoritaire qu'est l'ADN libre circulant d'origine maternelle sans qu'on puisse l'isoler spécifiquement actuellement. Ne pourront donc être recherchées et/ou étudiées que les seules séquences géniques foetales absentes ou différentes du génome maternel. Par conséquent, les deux indications essentielles de l'analyse de l'ADN foetal circulant dans le sérum maternel sont d'une part, la détermination du sexe foetal et d'autre part le génotypage Rhésus D foetal. (*Costa et al, 2004*).

La détermination non invasive et précoce (entre 10 et 12 semaines d'aménorrhée) du sexe foetal par la mise en évidence dans le sérum maternel de séquences géniques spécifiques du chromosome Y (principalement le gène foetal SRY) modifie très avantageusement la prise en charge des femmes enceintes conductrices d'une maladie génétique liée au chromosome X (hémophilie, myopathie de Duchenne, retards mentaux liés à l'X, adrénoleucodystrophies...) en réservant les biopsies de trophoblastes aux seules patientes porteuses d'un foetus de sexe masculin. L'intérêt de déterminer aussi précocement le sexe foetal en début de grossesse peut également être utile pour la prise en charge des couples à risque d'hyperplasie congénitale des surrénales, situation dans laquelle un traitement par corticoïdes instauré très tôt peut éviter la virilisation des organes génitaux féminins.

D'autre part, la possibilité de déterminer précocement entre 12 et 15 semaines d'aménorrhée le statut RHD foetal doit permettre de mieux cibler la prophylaxie anti-D et d'intensifier la surveillance sérologique des seules patientes à risque c'est-à-dire celles dont le foetus est rhésus positif.

D'autres applications se développent :

- l'analyse de l'ADN foetal peut être utile pour poser le diagnostic d'atteinte foetale en cas de maladies monogéniques à transmission dominante lorsque le père est porteur de l'allèle muté ou déficient (la mère ne présentant pas cet allèle muté ou déficient, si celui-ci est détecté, il provient nécessairement du foetus atteint) : par exemple chorée de Huntington, achondroplasie, dystrophie myotonique de Steinert (*Wright et al, 2009*)

- la quantification de l'ADN foetal pourrait être un marqueur de « bien-être » : une élévation de sa quantité est observée au décours de prééclampsie (*Zhong et al, 2001*) d'accouchement prématuré (*Leung et al, 1998*), d'hémorragie foetomaternelle (*Lau et al, 2000*), d'hydramnios (*Zhong et al, 2000*). Enfin de nombreux travaux portent actuellement sur l'association entre la quantité d'ADN foetal circulant et une trisomie foetale. La quantification de cet ADN pourrait être un marqueur sérique au même titre que l'hCG, l'estriol et l'inhibine A (*Otashi et al, 2001*). Cependant, toutes ces études ne sont possibles que pour les seuls foetus masculins pour lesquels on peut détecter spécifiquement leur génome (séquences portées par le chromosome Y).

La démonstration que des **ARN foetaux** sont également présents dans la circulation maternelle ouvre de nouvelles perspectives (*Poon et al, 2000*). Ces transcrits étant produits par des cellules du placenta, leur analyse est indépendante du génome maternel et peut donc être élargie à l'ensemble des foetus quel que soit leur sexe. L'analyse des ARN foetaux du gène PLAC4 (placenta-specific 4) a permis le diagnostic de trisomie 21 avec une sensibilité supérieure à 90% (*Lo et al, 2007*).

B. BIOLOGIE DU SANG FOETAL

1. Contraintes inhérentes à la biologie foetale

Parmi les techniques de prélèvements les plus utilisées, la cordocentèse représente la seule voie d'abord directe du fœtus. Celui-ci devient donc un patient à part entière dont le compartiment vasculaire est accessible de la 18^{ème} semaine d'aménorrhée jusqu'au terme.

L'étude biologique du sang foetal nous permet de mieux comprendre la physiologie propre du fœtus et surtout d'établir d'éventuels critères biologiques diagnostiques et pronostiques de pathologies foetales.

Cependant la biologie foetale se heurte à 3 difficultés techniques principales : les faibles volumes prélevés, le risque de contamination du sang foetal et la difficulté d'établir des valeurs de référence chez des fœtus sains.

Le volume de sang pouvant être prélevé est très limité, de l'ordre de 2 à 4 mL selon le terme, ce qui impose l'utilisation de micro-méthodes.

La technique même de prélèvement expose au **risque de contamination du sang foetal**

- soit par du sang maternel lors de la ponction du cordon au niveau du site d'insertion placentaire

- soit par du liquide amniotique.

Selon la source de contamination, les répercussions sur les paramètres biologiques mesurés chez le fœtus sont différentes.

Ainsi, la contamination par du *sang maternel* risque d'induire un résultat faussement positif d'infection congénitale (présence d'IgM maternelles). Elle rend également ininterprétable le caryotype foetal (présence de cellules sanguines maternelles) ainsi que les dosages biochimiques du fait de la dilution et des valeurs différentes chez la mère et le fœtus.

La contamination par *le liquide amniotique* interdit toute étude correcte de l'hémostase foetale car il contient des facteurs activateurs de la coagulation et peut entraîner une agrégation plaquettaire.

Le contrôle de la pureté du sang foetal est donc un prérequis indispensable à toute analyse biologique fiable. Il existe différentes méthodes pour déceler la présence d'éventuelles contaminations (*Daffos & Forestier, 1988 ; Forestier et al, 1988*).

Pour déceler la présence d'une contamination par le sang maternel, on peut utiliser les tests suivants :

- une numération globulaire (le volume globulaire moyen étant beaucoup plus élevé chez le fœtus) et une formule leucocytaire (la population leucocytaire foetale étant essentiellement lymphocytaire)
- un test de Kleihauer
- l'agglutination érythrocytaire avec des anticorps monoclonaux anti-I et anti-i (les hématies foetales n'expriment que l'antigène i, cet antigène ne mûrit en I qu'en période post-natale)
- le dosage de β hCG dans le sang foetal : il s'agit d'un marqueur sensible de contamination en raison de la faible teneur en hCG du sérum foetal comparativement à celle du sang maternel et du liquide amniotique.

Si une contamination par du liquide amniotique est suspectée, on peut réaliser les dosages des facteurs V et VIII qui sont des témoins précieux de l'activation de l'hémostase et le dosage de β hCG.

L'établissement de valeurs biologiques de référence chez le fœtus humain est indispensable si l'on veut effectuer, de façon fiable, des diagnostics anténataux. La difficulté essentielle est le choix de la population de fœtus dits normaux. Il est bien entendu, éthiquement impossible de prélever, par ponction de cordon échoguidée, des fœtus en parfaite santé, recrutés parmi des grossesses tout à fait normales, dans le seul but d'établir des valeurs de référence.

En général, les cordocentèses sont réalisées dans des indications précises liées à un risque encouru par le fœtus. Après exclusion des pathologies suspectées et vérification que les fœtus étudiés possèdent une morphologie, une croissance et une vitalité normales pour leur âge gestationnel, ils sont assimilés à une population de référence.

Nous nous limiterons dans la suite de l'exposé à l'étude exclusive des variables biochimiques du sang foetal.

2. Biochimie du fœtus sain

Quelques équipes ont étudié les variations des principaux paramètres biochimiques dans le sang foetal au cours de la grossesse. La revue de la littérature est assez difficile et on est confronté parfois à des discordances.

La ponction de sang foetal ne pouvant être réalisée avant 18 SA, seules les données du 2^{ème} et du 3^{ème} trimestre de la grossesse sont disponibles.

Les valeurs varient selon :

- la méthodologie : les résultats obtenus par ponction de sang foetal in utero différent de ceux obtenus par ponction de sang de cordon à la délivrance chez des nouveaux-nés à terme car dans ce cas le travail de la parturiente, l'analgésie et/ou anesthésie et le traumatisme physique subi par le foetus selon la voie d'accouchement peuvent influencer les résultats.

- la technique de dosage utilisée, en particulier pour la détermination des activités enzymatiques

- l'âge gestationnel

Les conclusions des études peuvent être discordantes du fait de la taille des échantillons analysés.

Les 2 études réalisées respectivement par Freer en 1979 et Perkins en 1993, portant sur l'analyse de 21 paramètres dans le sang de cordon prélevé à la délivrance de nouveaux nés en bonne santé (supérieur à 34 semaines de grossesse pour Freer et 37 semaines pour Perkins) ne montrent pas de différence significative entre le sang de cordon veineux et artériel ni selon le mode de délivrance (césarienne versus voie basse) (*Freer et al, 1979 ; Perkins et al, 1993*).

Il n'y a pas non plus de différence selon le sexe du nouveau né (*Freer et al, 1979 ; Perkins et al, 1993*), les autres études ne prenant pas en considération ce paramètre dans leurs résultats.

Lorsque le prélèvement a lieu in utero, le site de ponction n'a pas d'influence sur les résultats. Pour Gozzo, les résultats sont identiques que la ponction ait lieu au niveau du site d'insertion placentaire du cordon ou au niveau d'une anse libre (*Gozzo et al, 1998*). Pour Nava, aucune différence n'a été mise en évidence entre les ponctions réalisées au niveau du site d'insertion placentaire du cordon ou au niveau de la portion intrahépatique de la veine ombilicale.

Il faut souligner que les valeurs foetales pour les principaux paramètres biochimiques et hématologiques sont significativement différentes des valeurs de référence de l'adulte, à quelques exceptions près (*Freer et al, 1979 ; Perkins et al, 1993 ; Gozzo et al, 1998*). Le foetus est un donc un individu à part entière avec une physiologie et un

métabolisme qui lui sont propres et pour lequel les valeurs classiquement admises pour l'adulte ne sont pas applicables.

2.1. Comparaison des concentrations maternelles et fœtales

Afin de comparer pour chaque paramètre la concentration dans le sang fœtal et dans le sang maternel, un échantillon de sang veineux est prélevé simultanément chez la mère le même jour que la ponction de sang fœtal et analysé dans les mêmes conditions.

Il n'est pas retrouvé de différence significative, quel que soit l'âge gestationnel, pour les paramètres du ionogramme (sodium, potassium, chlorures) entre le sang fœtal et le sang maternel, les valeurs restant stables tout au long de la grossesse (*Moniz et al, 1985*) et comparables aux valeurs de l'adulte pour les nouveaux-nés (*Perkins et al, 1993 ; Gozzo et al, 1998*). Cela témoigne de la remarquable capacité de régulation de la balance hydroélectrolytique par l'unité foetoplacentaire.

De même, l'étude de Freer ne met pas en évidence de différence significative entre les concentrations néonatale (pour des fœtus d'âge gestationnel supérieur à 34 semaines) et adulte pour l'alpha-1-antitrypsine, l'alpha-2-macroglobuline et l'orosomucoïde (*Freer et al, 1979*).

Pour la majorité des auteurs, les concentrations fœtales sont inférieures aux concentrations maternelles pour les paramètres biochimiques suivants : protides totaux, albumine, cholestérol, triglycérides, glucose, acide urique, amylase, alanine-aminotransférase (ALAT) (*Moniz et al, 1985 ; Orlandi, 1987 ; Forestier et al, 1987 ; Perkins et al, 1993 ; Gozzo et al, 1998 ; Nava et al, 1996*).

Au contraire, les concentrations fœtales sont supérieures aux concentrations maternelles quel que soit l'âge gestationnel pour les acides aminés (*Mac Intosh et al., 1984 ; Economides et al., 1989*), la bilirubine totale et conjuguée, le phosphore et la plupart des activités enzymatiques (ASAT, PAL totales et PAL osseuses, GGT, CPK totales, LDH) (*Freer et al, 1979 ; Moniz et al, 1985 ; Forestier et al, 1987 ; Berrebi et al, 1992 ; Perkins et al, 1993 ; Gozzo et al, 1998 ; Nava et al, 1996 ; Weiner et al, 1992*).

Il existe des discordances entre les études pour 3 paramètres : calcium, créatinine et urée.

En ce qui concerne la calcémie totale, pour Forestier il n'y a pas de différence significative entre les concentrations foetale et maternelle entre la 20^{ème} et la 26^{ème} semaine de grossesse (Forestier et al, 1987) ; pour Moniz, la calcémie totale du fœtus est inférieure à la calcémie maternelle de la 15^{ème} à la 30^{ème} semaine de grossesse puis devient supérieure à partir de la 30^{ème} semaine jusqu'au terme (Moniz et al, 1985) ce qui est confirmé par Perkins qui retrouve dans son étude des valeurs de calcémie néonatale supérieures aux valeurs de l'adulte (prélèvement réalisé à la délivrance chez des fœtus d'âge gestationnel supérieur à 37 semaines de grossesse) (Perkins et al, 1993).

En ce qui concerne l'urée, la concentration dans le sang foetal est supérieure à la concentration maternelle pour Nava (résultats globaux sur la période 18-37 semaines de grossesse) et pour Moniz à partir de la 20^{ème} semaine mais inférieure pour Forestier sur la période 20-26 semaines de grossesse (Nava et al, 1996 ; Moniz et al, 1985 ; Forestier et al, 1987).

La concentration en créatinine dans le sang foetal ne diffère pas significativement de la concentration maternelle entre 20 et 26 semaines de grossesse pour Forestier (1987) ; elle est globalement inférieure à la concentration maternelle pour Nava (entre 18 et 37 semaines) mais est supérieure à celle-ci à partir de 30 semaines pour Moniz (Nava et al, 1996 ; Moniz et al, 1985).

Dans les deux cas, les concentrations en urée et créatinine mesurées chez les nouveau-nés à terme (prélèvement à la délivrance) sont inférieures aux valeurs de référence d'un adulte sain (Perkins et al, 1993 ; Gozzo et al, 1998).

Une corrélation entre les concentrations foetale et maternelle n'a été mise en évidence que pour 4 paramètres biochimiques : glucose, urée, créatinine, acide urique (Forestier et al, 1987 ; Nava et al, 1996). L'explication tient au fait qu'il s'agit de molécules de petit poids moléculaire donc très diffusibles et témoigne de la rapidité d'équilibre entre les circulations maternelle et foetale. Les différences de concentrations materno-foetale diminuent pour le glucose et l'urée mais augmentent pour l'acide urique et la créatinine en fonction de l'âge gestationnel (Nava et al, 1996).

Ces paramètres sont le reflet du fonctionnement de l'unité foeto-placentaire.

2.2. Variations des principaux paramètres biochimiques au cours de la grossesse

Les taux sériques de **protides totaux et d'albumine** chez le fœtus sont fortement corrélés à l'âge gestationnel (Moniz et al, 1985 ; Weiner et al, 1992 ; Nava et al, 1996). Bien que restant toujours inférieures aux concentrations maternelles, la protidémie et l'albuminémie foetales augmentent à partir du 2^{ème} trimestre de la grossesse en raison de l'augmentation

des capacités de synthèse du foie foetal : les taux sont multipliés par 2 entre la 20^{ème} semaine et le terme. L'albumine représente environ 60% des protides totaux du sérum foetal (*Perkins et al, 1993*). Parallèlement, on constate une diminution de la concentration d'**alpha-foetoprotéine** dans le sang foetal à partir de la 18^{ème} semaine (*Forestier et al, 1987*). L'ensemble de ces variations évoque un switch de la synthèse hépatique de l'alphafoetoprotéine vers l'albumine, ces 2 protéines étant capables de se lier à la bilirubine (*Aoyagi et al, 1979*).

Les concentrations des **acides aminés** totaux et individuels sont plus élevées dans le sang foetal que dans le sang maternel tout au long de la grossesse (*Mac Intosh et al, 1984 ; Economides et al, 1989*), grâce à un transport actif des acides aminés à travers le placenta (*Moe et al, 1995*). Elles ne varient pas significativement entre le 2^{ème} et le 3^{ème} trimestre de grossesse, le ratio materno-foetal restant constant (*Kamoun et al, 1985 ; Cetin et al, 1990*).

La **glycémie** foetale est toujours inférieure à la glycémie maternelle quel que soit l'âge gestationnel ainsi qu'à la naissance et est bien corrélée à la concentration maternelle. Pour Forestier, la glycémie foetale reste stable entre 20 et 26 semaines (*1987*) alors qu'elle diminue pour Legras entre 20 et 38 semaines (*1990*). Les concentrations faibles en glucose et en acides gras libres (*Bon et al, 2007*) reflètent les besoins énergétiques majorés du foetus en croissance. Les teneurs moyennes élevées en acéto-acétate et en bêta-hydroxybutyrate indiquent vraisemblablement une cétogénèse foetale (*Bon et al, 2007*).

Le taux de **cholestérol** est très bas chez le foetus (1/5^{ème} du taux maternel) et reste stable au cours de la grossesse (*Forestier et al, 1987 ; Legras et al, 1990 ; Nava et al, 1996*) ce qui suggère une consommation importante du cholestérol dans le compartiment foetal nécessaire à la synthèse des membranes cellulaires et la biosynthèse des stéroïdes.

Le taux de **triglycérides** est également faible chez le foetus ; il reste stable dans l'étude de Legras au cours de la grossesse (*Legras et al, 1990*) alors que pour Forestier il diminue progressivement pour atteindre une valeur minimale à la naissance, ce qui est probablement lié à la constitution des réserves adipeuses du foetus (*Forestier et al, 1987*). Dans son étude, Nava montre que le taux de triglycérides atteint un nadir à 30-32 semaines puis augmente en fin de grossesse ; l'hypothèse de la lipolyse induite par l'augmentation parallèle du cortisol a été avancée (*Nava et al, 1996*).

La concentration foetale en **urée** augmente de façon modérée à partir du milieu de la grossesse (*Nava et al, 1996 ; Moniz et al, 1985*) alors que ce taux reste stable dans l'étude

de Forestier qui ne couvre que la période 20-26 semaines (Forestier et al, 1987). L'augmentation de la production d'urée serait liée à une augmentation du catabolisme des acides aminés (Nava et al, 1996).

L'augmentation de la **créatininémie** foetale (Moniz et al, 1985 ; Legras et al, 1990 ; Nava et al, 1996) à partir du milieu de la gestation reflèterait l'augmentation de la masse musculaire foetale (Moniz et al, 1985).

Le taux **d'acide urique**, témoin du renouvellement cellulaire, est abaissé dans le sérum foetal par rapport au sang maternel et est stable entre 20 et 26 semaines (Forestier et al, 1987). L'étude des précurseurs de l'acide urique chez le foetus permettrait de dire s'il s'agit d'une baisse de production ou au contraire d'une augmentation de la production et de l'élimination.

Dans l'étude de Moniz, la **calcémie totale** chez le foetus augmente à partir de la 20^{ème} semaine de grossesse, devenant supérieure à la calcémie maternelle à partir de la 30^{ème} semaine tandis la phosphorémie diminue progressivement (Moniz et al, 1985).

Grâce à un transport placentaire actif, les taux de **calcium ionisé et de phosphore inorganique** sont plus élevés dans le sérum foetal ; ceci, associé à une augmentation de l'activité PAL osseuse est le témoin d'une activité ostéoblastique accrue chez le foetus (Moniz et al, 1985).

La majorité des **activités enzymatiques** mesurées (CPK, LDH, ASAT, GGT, PAL) sont plus élevées dans le sang foetal (à l'exception de l'ALAT et de l'amylase) que dans le sang maternel (Moniz et al, 1985 ; Orlandi, 1987 ; Forestier et al, 1987 ; Legras et al, 1990 ; Berrebi et al, 1992 ; Weiner et al, 1992 ; Nava et al, 1996) et augmentent en fonction de l'âge gestationnel (Moniz et al, 1985 ; Legras et al, 1990 ; Weiner et al, 1992 ; Nava et al, 1996) sauf l'amylase (Nava et al, 1996). Seuls 2 auteurs ne mettent pas en évidence de variation : Forestier dans une étude couvrant la période restreinte de 20 à 26 semaines de grossesse (CPK, LDH, GGT, PAL, ASAT) (Forestier et al, 1987) et Berrebi dans une étude incluant des foetus âgés de 20 à 34 semaines où les valeurs de LDH, GGT, ASAT et ALAT sont globalement stables en fonction de l'âge gestationnel (Berrebi et al, 1992).

Il faut toutefois garder à l'esprit que les valeurs obtenues pour les activités enzymatiques sont très variables en fonction des techniques de dosage utilisées et donc difficilement comparables d'une étude à l'autre. De plus il existe une grande dispersion des valeurs mesurées pour chaque paramètre chez le foetus sain.

Aucune corrélation n'a été démontrée entre les activités enzymatiques foetales et maternelles (*Forestier et al, 1987; Nava et al, 1996*) ce qui implique que les valeurs observées chez le fœtus ne sont pas liées à la présence d'un composant d'origine maternelle mais sont bien le reflet direct et réel du métabolisme foetal.

Freer a montré que plus de 80 % de l'activité **PAL** chez le fœtus était liée à l'isoenzyme osseuse (*Freer et al, 1979*). La PAL d'origine placentaire, responsable de l'augmentation des PAL chez la mère, ne circule quasiment pas dans le sang foetal (*Nava et al, 1996*). Il est observé une augmentation de l'activité PAL totale chez le fœtus avec un maximum atteint au 2^{ème} trimestre (entre 21 et 25 SA pour Gozzo et entre 25 et 29 SA pour Legras) puis une diminution au 3^{ème} trimestre (*Legras et al, 1990; Nava et al, 1996; Gozzo et al, 1998*). A noter que Moniz est le seul à trouver une augmentation de l'activité PAL totale tout au long de la grossesse (étude réalisée chez 344 fœtus âgés de 15 à 38 semaines) (*Moniz et al, 1985*).

Les valeurs élevées de **GGT** observées chez le fœtus et leur augmentation au cours de la grossesse ne sont pas clairement élucidées. L'électrophorèse en gel d'agarose d'échantillons de sérums foetaux a éliminé l'hypothèse de la présence d'une isoforme foetale spécifique (*Perkins et al, 1993*). Etant donné que les taux d'ALAT, marqueur spécifique du foie, restent faibles tout au long de la grossesse, les valeurs de GGT et d'ASAT observées ne sont pas le reflet d'une altération de la fonction hépatique du fœtus (en dehors de toute pathologie foetale connue) (*Nava et al, 1996*).

Il n'y a pas de corrélation entre les valeurs foetales de GGT et de PAL totales (*Freer et al, 1979*).

En ce qui concerne les **LDH**, il n'y a guère plus d'explication dans la littérature quant aux résultats observés. Freer a montré que dans le sang veineux de cordon des nouveaux-nés (d'âge gestationnel supérieur à 34 SA) prélevés à la délivrance, la répartition des isoenzymes LDH est différente de celle de l'adulte avec en particulier une diminution relative de l'isoforme LDH 1 et une augmentation relative de l'isoforme LDH 5 (*Freer et al, 1979*). Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre les activités LDH totale et CK totale ni de profil enzymatique particulier qui auraient pu faire suspecter une origine tissulaire spécifique (en particulier augmentation LDH 1, LDH2 et ASAT dans le cadre d'une hémolyse ou LDH5 avec CPK dans le cadre d'une atteinte musculaire) (*Freer et al, 1979*). L'origine hépatique de l'augmentation des LDH est également très peu probable étant donné que l'activité ALAT reste faible tout au long de la grossesse. La signification de l'augmentation des LDH dans le sang de cordon n'a pas jusqu'à présent été établie (*Perkins et al, 1993*).

Dans l'étude de Nava, l'activité **CK** totale du fœtus est supérieure à l'activité enzymatique maternelle mais n'augmente significativement qu'après 28 semaines de grossesse, ce qui est probablement lié à l'accroissement de la masse musculaire du fœtus en fin de grossesse (*Nava et al, 1996*). De la même façon, Gozzo met en évidence une corrélation positive entre l'activité CK et l'âge gestationnel, avec des valeurs en fin de grossesse supérieures à celle du 2^{ème} trimestre (*Gozzo et al, 1998*). Les valeurs mesurées dans le sang de cordon des nouveaux-nés à la délivrance sont environ trois fois supérieures à celles observées chez l'adulte (*Freer et al, 1979*) et continuent d'augmenter en postpartum pour atteindre un maximum 24h après l'accouchement (*Sutton et al, 1981*).

La concentration de **bilirubine** totale (*Moniz et al, 1985 ; Forestier et al, 1987 ; Nava et al, 1996 ; Gozzo et al, 1998*) et de bilirubine conjuguée (*Forestier et al, 1987 ; Nava et al, 1996 ; Gozzo et al, 1998*) est significativement plus élevée chez le fœtus et augmente au cours de la grossesse (*Moniz et al, 1985 ; Nava et al, 1996*). Cependant, Forestier ne constate pas de variation significative entre 20 et 26 semaines de grossesse (*1987*).

L'hyperbilirubinémie foetale peut s'expliquer par :

- une production accrue de bilirubine en raison de l'augmentation de la masse globulaire circulante (*Daffos & Forestier, 1988 ; Berrebi et al, 1992 ; Weiner et al, 1992*) chez le fœtus secondaire à l'hypoxémie et de la durée de vie raccourcie des globules rouges foetaux d'environ 70 jours (*Pearson, 1971*) avec par conséquent une augmentation du turn-over cellulaire

- un défaut d'élimination de la bilirubine en raison de l'immaturation hépatique du fœtus responsable d'un défaut de glycurono-conjugaison (*Moniz et al, 1985 ; Forestier et al, 1987*)

Cette deuxième explication est probablement mineure car le foie foetal ne métabolise qu'une infime partie de la bilirubine foetale, la majeure partie étant, après passage placentaire de bilirubine non conjuguée, glycuronoconjuguée par le foie maternel pour être éliminée comme en témoigne l'absence d'augmentation de la bilirubine foetale au cours des grossesses avec allo-immunisation foeto-maternelle.

La présence de bilirubine conjuguée dans le sérum foetal pourrait être le reflet d'une immaturité des voies biliaires intrahépatiques du fœtus (*Daffos & Forestier, 1988*).

En ce qui concerne **l'équilibre acido-basique et la gazométrie** sanguine foetale, les études de Daffos et de Berrebi montrent que le pH foetal est sensiblement identique à celui de la mère et constant tout au long de la grossesse (*Daffos & Forestier, 1988 ; Berrebi et al, 1992*) tandis que pour Weiner et Nava, le pH foetal a tendance à diminuer (*Weiner et al, 1992 ; Nava et al, 1996*). Pour les autres paramètres de la gazométrie, seule l'étude de Berrebi conclut à une stabilité globale quel que soit l'âge foetal.

Les autres travaux montrent que la pO₂ foetale est significativement plus basse que dans le sang maternel et diminue au cours de la grossesse (*Daffos & Forestier, 1988 ; Weiner et al, 1992 ; Nava et al, 1996*) alors que la pCO₂ et les bicarbonates sont plus élevés et augmentent avec l'âge foetal (*Daffos&Forestier, 1988 ; Weiner et al, 1992*). L'hypoxémie foetale serait liée à une consommation accrue de l'oxygène à la fois par le foetus et par le placenta (forte activité métabolique) et à une moindre efficacité de la diffusion de l'O₂ à travers le placenta.

La lactatémie est significativement plus élevée dans le sang veineux foetal que dans le sang veineux maternel (*Daffos & Forestier, 1988 ; Bon et al, 2007*). Le passage transplacentaire de lactate a lieu par simple diffusion. Il semble être bi-directionnel (*Haggarty et al, 2002*) et peut changer de sens selon les conditions métaboliques et le rapport de concentration materno-foetal. In vitro, il a été démontré que le placenta est un producteur de lactates quel que soit le degré d'hypoxie foetale (*Daffos & Forestier, 1988*).

Enfin le lactate a aussi un rôle de substrat énergétique pour le foetus (*Père et al, 2003*).

3. Application de la biochimie du sang foetal au diagnostic prénatal

L'interprétation des résultats obtenus chez le foetus nécessite de connaître les valeurs de référence et les variations physiologiques selon l'âge gestationnel mais doit également tenir compte des relations materno-foetales. La recherche d'une corrélation mère-foetus renseigne ainsi sur la valeur prédictive d'un dosage en pathologie foetale.

En effet, lorsqu'il existe une corrélation entre les concentrations sériques maternelles et foetales comme c'est le cas pour le glucose, l'urée, la créatinine et l'acide urique, la mesure de ces paramètres chez le foetus ne peut être utilisée pour le diagnostic prénatal car ils ne reflètent pas une réalité foetale mais l'ensemble foeto-maternel. Par exemple, une augmentation de la créatinine foetale ne reflète pas une insuffisance rénale foetale : dans le cas d'une hydronéphrose foetale sévère, l'équipe de Daffos et Forestier n'a jamais observé d'augmentation de la créatinine foetale (*1988*).

Lorsqu'il n'existe pas de corrélation entre les taux maternels et foetaux comme c'est le cas pour les autres substrats et les activités enzymatiques détaillés dans le paragraphe précédent, le dosage de ces paramètres chez le foetus rend compte réellement du métabolisme foetal, indépendamment de celui de la mère et peut être utile dans le cadre du diagnostic anténatal.

Dans de rares cas, les dosages biochimiques réalisés dans le sang foetal contribuent au diagnostic d'une pathologie chez le foetus.

Par exemple, l'équipe de Daffos & Forestier a pu effectuer le diagnostic anténatal d'hypercholestérolémie congénitale chez un foetus homozygote de 24 semaines : le taux de

cholestérol de ce fœtus était de 14,04 mmol/L par rapport à des valeurs usuelles à ce terme de 1,5+/- 0,05 mmol/L (*Daffos & Forestier, 1988*).

Bien que le diagnostic des maladies métaboliques héréditaires soit essentiellement effectué par la mesure de l'activité enzymatique déficiente sur prélèvement de villosités chorales (au 1er trimestre) ou sur les cultures de cellules fœtales du liquide amniotique (au 2ème trimestre), il est possible d'envisager le diagnostic des aminoacidopathies par le dosage des acides aminés dans le sang fœtal. De la même façon, les troubles du métabolisme des acides organiques, des vitamines (folates), du zinc, du cuivre peuvent être mis en évidence par le dosage des paramètres correspondants dans le sang fœtal.

Dans la majorité des cas, la mesure des paramètres biochimiques dans le sang fœtal a un intérêt pronostic : elle permet d'évaluer le retentissement organique et par conséquent le degré de souffrance fœtale en cas d'infection ou d'anomalie détectée à l'échographie (RCIU, malformations). Ceci permettra d'apporter au clinicien un argument supplémentaire dans les situations difficiles quant à la conduite à tenir pour la grossesse en cours.

La gazométrie et les paramètres de l'équilibre acidobasique sont particulièrement utiles dans l'évaluation de la souffrance fœtale hypoxique.

De la même façon, les paramètres des métabolismes glucidique, lipidique et protidique ont été étudiés au cours de grossesses compliquées de RCIU. Dans une étude réalisée en 2007 portant sur 35 grossesses, Bon et al. ont mis en évidence une diminution de la glycémie, une augmentation de la pyruvatémie et de la lactatémie et de la concentration en acides gras libres ainsi qu'une diminution de la cholestérolémie dans le sang veineux ombilical en cas de RCIU sévère et isolé ; au contraire, les anomalies métaboliques sont peu nombreuses dans les cas de RCIU sévères associés à un syndrome malformatif et absentes en présence de retard de croissance modéré (*Bon et al., 2007*). Les concentrations des acides aminés essentiels sont significativement plus faibles en cas de RCIU par rapport à un fœtus de croissance normale pour l'âge (*Economides et al., 1989 ; Cetin et al, 1990 ; 1996*). Cette diminution est corrélée au degré d'hypoxémie fœtale (*Economides et al, 1989*).

Enfin, il existe une forte corrélation entre l'augmentation du taux d'EPO dans le sang fœtal et l'intensité de l'hypoxie fœtale (*Teramo & Widness, 2009*).

Le dosage de la β 2microglobuline est reconnu comme facteur prédictif de l'insuffisance rénale foetale potentielle dans les uropathies (*Berry et al, 1995 ; Dommergues et al, 2000*).

De rares équipes se sont intéressées à l'étude des paramètres biochimiques courants en tant que marqueurs non spécifiques d'une atteinte foetale.

Dans une étude menée en 1994 par Hallak et al. incluant 72 foetus atteints de pathologies variées (24 malformations, 23 AIFM, 17 suspicions d'infection foetale, 5 oligo/ hydramnios, 3 purpuras thrombopéniques immunologiques), sur les 6 marqueurs de la fonction hépatique étudiés (protides totaux, albumine, bilirubine totale, ASAT, ALAT, GGT), seule la GGT apparaît comme un marqueur associé à une anomalie foetale. Les taux de GGT observés sont significativement plus élevés chez les foetus pathologiques (157,1 +/- 15,1 UI/L ; n=72) que chez les foetus témoins sains (106,2 +/- 17,5 UI/L ; n=18). Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents groupes de pathologies (*Hallak et al, 1994*).

Dans une autre étude rétrospective de grande échelle incluant 3129 échantillons de sang foetal, Mirlesse et al. ont observé des taux des GGT supérieurs à dix fois les valeurs normales pour l'âge gestationnel chez 33 foetus sans pour autant réussir à mettre en évidence un lien avec une pathologie foetale spécifique bien que les infections foetales soient les plus représentées (11 cas sur 33). Les autres pathologies étaient réparties comme suit : 12 malformations rénales ou du tube digestif, 5 anomalies génétiques, 2 cas de mucoviscidose, 1 syndrome d'alcoolisme foetal, 2 cas d'augmentation de GGT non expliquée (*Mirlesse et al., 1996*).

La fonction hépatique des foetus au cours d'alloimmunisations a été évaluée par Nicolini et al. par PSF au cours d'exsanguinotransfusions chez 25 foetus souffrant d'alloimmunisations Rhésus sévères dont 8 en état d'anasarque. Les taux de transaminases (ALAT et ASAT) étaient significativement plus élevés chez les foetus en anasarque par rapport à la population témoin et aux foetus alloimmunisés sans anasarque. Cette atteinte hépatique serait secondaire à l'érythropoïèse extramédullaire. Par ailleurs, les auteurs ont montré une augmentation du taux de GGT après la 2^{ème} transfusion chez l'ensemble des 25 foetus, cette augmentation étant transitoire et corrélée à l'augmentation de l'hématocrite foetal après la 1^{ère} transfusion. Les auteurs évoquent le rôle de l'hypertension portale liée aux transfusions dans l'augmentation de la GGT foetale (*Nicolini et al, 1991*).

Dans le cas d'infection congénitale toxoplasmique, il peut être observé une augmentation importante conjointe des GGT et des LDH suggérant une atteinte hépatique foetale par le toxoplasme. La GGT chez 163 foetus normaux est de 30+/- 10 UI/L et de 180+/- 80 UI/L chez les foetus infectés, la LDH étant respectivement de 279+/- 50 UI/L et 480+/- 110 UI/L) (*Daffos & Forestier, 1988*). Une observation similaire est retrouvée par Berrebi et al. qui ont évalué 9 paramètres chez 22 foetus infectés par *Toxoplasma gondii* : seuls 4 sont significativement plus élevés chez les foetus infectés, à savoir le taux de leucocytes, la concentration d'IgM , la fraction C4 du complément et le taux de GGT (*Berrebi et al., 1992*).

Enfin, l'isoenzyme CKBB apparaît dans la littérature comme un bon marqueur de lésions cérébrales secondaires à une souffrance hypoxique chez les nouveaux nés (*Becker et al, 1978 ; Lavaud et al, 1979 ; Chopin et al, 1980 ; Cuestas et al, 1980 ; Niklinski et al, 1987 ; Fonseca et al, 1995*).

La détermination des paramètres biochimiques chez le foetus peut donc contribuer soit directement au diagnostic anténatal d'une affection biochimique congénitale soit indirectement en tant que marqueurs non spécifiques d'une affection foetale infectieuse ou non.

C. LA CREATINE KINASE

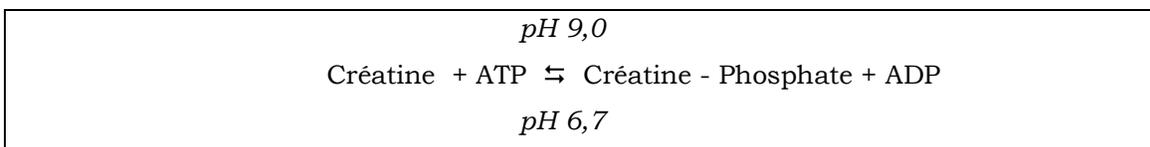
1. Définition

Plusieurs dénominations existent dans la littérature :

ATP créatine N phosphotransférase EC 2.7.3.2. selon la nomenclature internationale ou plus simplement créatine kinase (CK) ou créatine phosphokinase (CPK).

Par souci de clarté, le terme « créatine kinase ou CK » sera utilisé dans la suite de l'exposé.

Il s'agit d'une enzyme à double localisation cellulaire (cytosolique et mitochondriale) qui catalyse la phosphorylation réversible de la créatine en créatine-phosphate par le complexe Mg^{2+} -ATP selon la réaction suivante :



Cette réaction est inhibée par les ions magnésium Mg^{2+} en excès et par la majorité des cations bivalents ainsi que par les ions iodoacétate, citrate, sulfate, nitrate et tous les anions monovalents dont les ions fluorure (Doré, 1994).

2. Structure

2.1. Les molécules « classiques »

2.1.1. Les isoenzymes de la créatine kinase

La CK existe sous forme de plusieurs isoenzymes cytosoliques. Chaque isoenzyme est un dimère résultant de l'association de deux monomères différents M et B, appelés M pour « Muscle » et B pour « Brain » en raison du tissu dans lequel ils ont été isolés pour la première fois.

L'association de ces sous-unités entre elles aboutit à trois isoenzymes différentes : MM ou CK3, MB ou CK2 et BB ou CK1. La numérotation officielle CK1 à CK3 fait référence à la mobilité électrophorétique par rapport à l'anode (*Lang & Wurzburg, 1982*).

Chaque monomère est une chaîne peptidique de 360 acides aminés avec un site catalytique comprenant un groupe sulfhydryl. L'activité catalytique de chaque sous-unité est indépendante. Les monomères M et B ont un poids moléculaire respectif de 43 et 44,5 kDa (*Perryman et al, 1983*) ; les dimères MM, MB et BB ont donc un poids moléculaire respectif de 86, 87 et 89 kDa.

Ces 3 isoenzymes sont localisées dans le cytosol des cellules.

Elles diffèrent par :

- leur composition en acides aminés, qui conditionne leur mobilité électrophorétique
- leur thermostabilité : l'isoenzyme MM est plus stable à la chaleur que l'isoenzyme BB
- leur stabilité en fonction du pH : l'isoenzyme BB est très rapidement dénaturée à pH acide
- leur dégradation in vivo : chaque isoenzyme a une demi-vie courte, à savoir 18 h pour la CK-MM (*Lang, 1981*), 12 h pour la CKMB (*Neumeier et al, 1978*) et moins de 2 h pour la CK-BB (*Landaas et al, 1981*). La demi-vie très courte de la CK-BB s'explique par une clairance élevée et une inhibition rapide (*Lang, 1981*) en particulier par liaison à l'albumine (*Nealon & Henderson, 1977*) et aux IgG (*Prabhakaran et al, 1979*).

Une quatrième isoenzyme a été isolée dans les mitochondries (*Roberts et al, 1980*). La CK mitochondriale (CK Mi) est également un dimère composé de deux sous-unités spécifiques, différentes des sous-unités M et B. Ces sous-unités mitochondriales Mi ne se lient jamais avec les sous-unités M et B. Le poids moléculaire du dimère CK MiMi est de 84 kDa. La CK mitochondriale diffère des CK cytosoliques par ses propriétés physicochimiques (*Roberts et al, 1980*) ; en particulier l'énergie d'activation est supérieure à 100 kJ/mol pour la CK MiMi et inférieure à 50 kJ /mol pour les CK cytosoliques (*Stein et al, 1982*).

La synthèse des différentes isoenzymes de CK est codée par 4 gènes différents : un pour la sous-unité M localisé sur le chromosome 19, un pour la sous-unité B sur le chromosome 14 et deux pour les sous-unités mitochondriales.

2.1.2. Les isoformes circulantes

Les isoenzymes CKMM et CKMB existent dans le sang circulant sous plusieurs isoformes (Panteghini et al, 1988 ; Wu et al, 1992) provenant de la dégradation progressive in vivo de leur forme tissulaire par une carboxypeptidase-N sérique, qui clive la lysine C-terminale des sous-unités M (Perryman et al, 1984).

Ainsi, la CKMM comporte trois isoformes : la CKMM3 native, la CKMM2 et la CKMM1.

La CKMB comporte deux isoformes : la CKMB2 native et la CKMB1 transformée.

La formation des isoformes est illustrée à la figure 1.

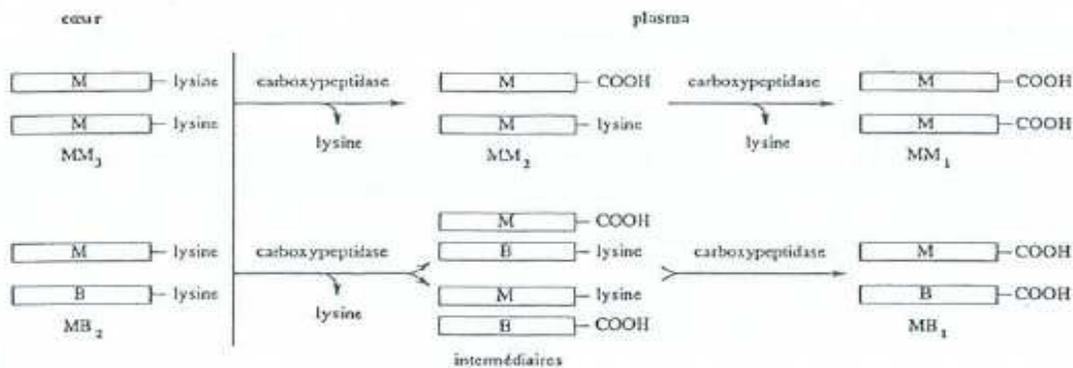


Figure 1 : Formation des isoformes de la créatine kinase (d'après Doré, 1994)

Les isoformes peuvent être séparées par électrophorèse en gel d'agarose à pH alcalin sous haut voltage (Figure 2). La perte du résidu lysine C-terminal confère à l'isoforme transformée une mobilité électrophorétique plus anodique que la forme native.

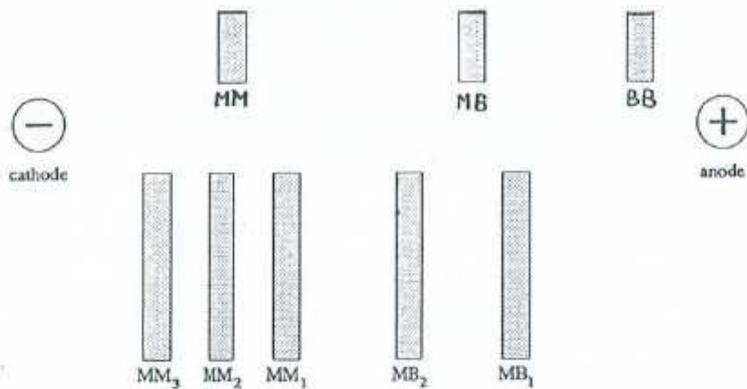


Figure 2 : Localisation des différentes isoformes de la CK MM et de la CK MB sur gel d'électrophorèse (d'après Doré, 1994)

Une partie de la CKBB libérée est transformée dans le sérum en une CKBB' par un mécanisme complexe et mal connu (*Stein et Decker, 1989*). Cette CKBB' peut être détectée par électrophorèse et chromatographie d'échange d'ions.

Dans les conditions physiologiques, la forme native MM3 est maintenue à des taux faibles dans le plasma. Le sérum d'un sujet sain contient 47 à 60% de CKMM1, 24 à 32% de CKMM2 et 12 à 18% de CKMM3 (*Panteghini et al, 1988*).

Dans les années 1980, plusieurs auteurs ont démontré l'intérêt du dosage des isoformes des isoenzymes dans les syndromes coronariens aigus (*Yasmineh et al, 1981 ; Morelli et al, 1983 ; Panteghini et al, 1986*). Un diagnostic précoce d'infarctus du myocarde (IDM) peut être réalisé par le calcul des rapports MM3/MM1 et MB2 /MB1 qui s'élèvent 1 à 2 heures après le début de la douleur (*Jaffe et al, 1986 ; Yang et al, 1993*). Un rapport CKMB2 / CKMB1 supérieur à 1,5 semble avoir une bonne sensibilité diagnostique dans les 6 premières heures de l'IDM (*Laurino et al, 1996*). En fonction du temps écoulé après l'IDM, les formes tissulaires MM3 et MB2 libérées par la nécrose myocardique sont transformées en MM1 et MB1 et les ratios se normalisent. L'analyse du profil sérique des isoformes permet d'évaluer le délai écoulé par rapport au début de la nécrose tissulaire mais aussi de détecter un nouvel infarctus et de suivre l'efficacité de la reperfusion myocardique après thrombolyse (*Apple et al, 1987 ; Panteghini et al, 1987*).

Cependant, le temps nécessaire et les contraintes techniques relatives à la mise en oeuvre de techniques électrophorétiques ne sont pas compatibles avec l'urgence de la situation clinique.

De plus, on observe des faux positifs (élévation de l'isoforme MM3) en cas de traumatismes des muscles squelettiques ou de myopathies (*Morelli et al, 1983 ; Wu et al, 1992*).

L'analyse de sang foetal prélevé chez des foetus du 2^{ème} et du 3^{ème} trimestre et chez des nouveaux nés a montré que les isoformes n'apparaissent qu'à partir du 3^{ème} trimestre. Cela s'explique par le fait que la synthèse de carboxypeptidases ne débute qu'entre 24 et 30 semaines de gestation (*Edwards et al, 1987*).

2.2. Les isoenzymes CK atypiques ou MacroCK

La séparation des isoenzymes CK par électrophorèse a permis la découverte de bandes supplémentaires de migration électrophorétique inhabituelle (*Lim et al, 1975 ; Sax et al, 1976 ; Ljungdahl et al, 1978*). Après élimination d'éventuels artéfacts, il a été montré que ces bandes correspondent à des isoenzymes CK variantes ou atypiques résultant de modifications post-traductionnelles. Il s'agit de complexes de haut poids moléculaire d'où le terme habituellement utilisé de macroCK. Ils résultent soit d'une liaison de l'isoenzyme à une immunoglobuline ou autre composant sérique soit d'une autopolymérisation de l'isoenzyme (*Kwong & Arvan, 1981*). Les macroCK sont caractérisées par une diminution de la clairance plasmatique (*Stein et al, 1985, Remaley & Wilding, 1989*) d'où une demi-vie plus longue ainsi que par une plus grande stabilité à la chaleur (*Bohner et al, 1981*) et aux variations de pH (*Maire et al, 1987*) par rapport aux isoenzymes classiques.

On distingue habituellement deux types de macroCK selon leurs caractéristiques électrophorétiques et leurs propriétés immunologiques.

Les macroCK de type 1 sont des complexes formés par l'association d'une isoenzyme CK (BB, MB ou MM) et d'une immunoglobuline, dont le poids moléculaire est supérieur à 240 000 daltons (*Kanemitsu & Okigaki, 1988*).

Les immunoglobulines sont le plus souvent dirigées contre la sous-unité B.

La macroCK de type 1 la plus fréquemment rapportée dans la littérature est un complexe CK BB-IgG (*Bohner et al, 1979 ; Chemnitz et al, 1979 ; Prabhakaran et al, 1982 ; Urdal & Landaas, 1979 ; Stein et al, 1981 ; Dick & Blick, 1982 ; Stein, 1983 ; Pesce, 1985*), plus rarement CK MB-IgG (*Pudek & Jacobson, 1982 ; Stein & Bohner, 1985*). Plusieurs auteurs ont démontré que le complexe CK BB-IgG ne résulte pas d'une interaction non spécifique protéine-protéine mais bien d'une réaction spécifique antigène-anticorps. En effet, la CK BB n'a pas subi d'altérations, la liaison avec l'IgG est réversible, spécifique et de haute affinité (*Urdal, 1981*) ; de plus la CK BB se lie aux régions Fab de l'immunoglobuline (*Urdal, 1981 ; Stein et al, 1981*) selon un ratio CK BB –IgG de 1:1 ou 2:1 (*Stein et al, 1980 ; Stein et al, 1983*). La CK deviendrait donc antigénique après libération dans la circulation sanguine (*Remaley & Wilding, 1989 ; Laureys et al, 1991*).

Selon Prabhakaran, le complexe CK BB –IgG serait une voie de catabolisme intravasculaire de la CK BB (*Prabhakaran et al, 1979*).

Les immunoglobulines d'isotype IgA sont plus rarement impliquées dans la constitution des macroCK de type 1 : il a été rapporté des complexes CK MM-IgA dans des contextes néoplasiques (*Kanemitsu et al, 1980 ; Yuu et al, 1980 ; Kanemitsu et al, 1981 ;*

Chevrot et al, 1982) et des complexes CK BB-IgA (Jockers-Wretou & Plessing, 1979 ; Yasmineh et al, 1984 ; Medeiros et al, 1985 ; Jay, 1988).

Plus exceptionnellement, les macroCK résultent d'une liaison avec une IgM (Yasmineh et al, 1984 ; Tozawa, 1989).

Enfin, un cas a été rapporté d'association entre une CK mitochondriale et une IgA. (Kanemitsu, 1986).

A l'électrophorèse, la macroCK de type 1 migre sous forme d'une bande anormale plus anodique que la fraction MM : elle est habituellement située entre la fraction MM et la fraction MB. Cependant, il a été décrit des cas où la macro CK type 1 migre à la position CKMB (Medeiros et al, 1985 ; Jay, 1988 ; Venta et al, 1989) ou à la position CKMM, ce qui induit des élévations artificielles de ces fractions.

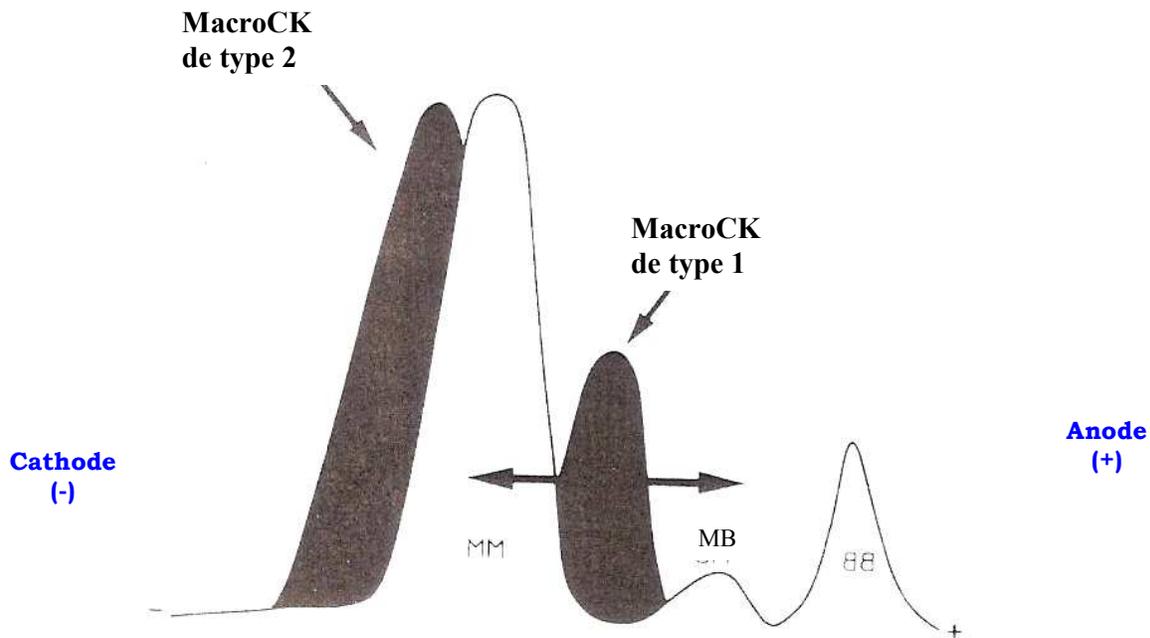


Figure 3 : Migration électrophorétique des macroCK (d'après Lee, 1994)

La macroCK de type 2 est un complexe de poids moléculaire supérieur à 300 000 daltons (Lang & Wurzburg, 1982 ; Stein & Bohner, 1985) et de migration cathodique par rapport à la fraction CK MM à l'électrophorèse (Lang & Wurzburg, 1982).

Ses propriétés physico-chimiques (mobilité électrophorétique cathodique, haut poids moléculaire), ses propriétés enzymatiques - stabilité à haute température (Bohner et al,

1981), haute énergie d'activation (Stein et al, 1982), valeur de Km (Stein et al, 1983 ; Stein et al, 1984) - et ses caractéristiques immunologiques (non inhibition par les anticorps anti M et anti B, absence de réaction avec les immunoglobulines) sont identiques à la CK mitochondriale des tissus sains et suggèrent que cette macroCK correspond à un polymère de CK mitochondriale (Stein et al, 1985b). Elle serait libérée dans le sang après rupture de la membrane mitochondriale lors d'un turn over cellulaire important entraînant de multiples destructions cellulaires.

La macroCK de type 2 existe sous 2 formes : une forme dimérique migrant avant la CK MM sur le gel d'électrophorèse et une forme oligomérique migrant au niveau de la position CKMM (Sommer et al, 1974). La macro CK de type 2 est donc difficile à distinguer de la fraction CK MM.

A côté des macroCK de type 1 et 2, on note quelques descriptions plus occasionnelles d'autres variants tels que des complexes associant CK et β lipoprotéines (Velletri et al, 1975 ; Kanemitsu et al, 1981). Delahunty met en évidence une bande électrophorétique migrant comme la macroCK de type 2 chez 37% d'une série de malades traités par théophylline mais ne l'identifie pas formellement à de la CK de type mitochondrial (Delahunty, 1983). Enfin, il a été mis en évidence un variant génétique de CK BB non lié à une Ig, migrant entre les fractions CKMB et CKMM chez 4 patients atteints de cancer de la prostate métastatique (Pesce et al, 1987).

Les macroCK peuvent être la cause de valeurs faussement élevées de CK MB et conduire à un diagnostic erroné d'infarctus du myocarde, puisqu'elles interfèrent à la fois :
- dans les techniques de dosage de la CK MB par immunoinhibition (Fiehn & Seiler, 1981; Pesce, 1983 ; Raga et al, 1992) à cause de la non inhibition par les anticorps anti M
- et dans les techniques d'électrophorèse et de chromatographie par échange d'ions en raison de la co-migration possible (Medeiros et al, 1985 ; Jay, 1988 ; Venta et al, 1989) ou co-élution de certaines macroCK de type 1 avec la fraction CK MB.

A l'inverse, les auto-anticorps peuvent masquer la CK MB à l'électrophorèse (Pudek & Jacobson, 1982), en radioimmunologie ou en immunoenzymologie (Stein, 1985a). Le risque est alors d'altérer la migration de la CK MB ou de minorer sa concentration. Une telle altération de la migration de la CK MB a conduit à méconnaître le diagnostic biologique d'un infarctus du myocarde chez un patient qui possédait également une macro LDH (Pudek & Jacobson, 1982).

L'hypothèse de l'existence d'une macroCK doit être évoquée :

- devant une augmentation persistante isolée de l'activité CK totale sans étiologie définie

- ou devant une activité CK MB supérieure à l'activité CK totale
- ou encore si l'activité CK MB représente plus de 20% de l'activité CK totale (Lang & Wurzburg, 1982).

Elle doit être confirmée par électrophorèse, seule technique permettant de mettre en évidence une macroCK.

3. Localisation tissulaire de la créatine kinase

Chez l'Homme, la créatine kinase est présente dans la plupart des organes, en proportion relative très variable selon les différentes études, les méthodes de mesure utilisées et les isoenzymes recherchées. Globalement, une activité créatine kinase a été mise en évidence dans les organes suivants : aorte, cerveau, coeur, estomac, foie, intestin, muscle, pancréas, placenta, poumons, prostate, rein, sein, thyroïde, utérus. La créatine kinase est absente des érythrocytes.

Le pourcentage de chaque isoenzyme dans les tissus varie, mais on peut retenir à titre indicatif, la répartition proposée par Kanemitsu dans un article publié en 1988 (tableau I). A cette revue il faut ajouter le placenta, qui est un organe riche en isoenzyme BB (Chemnitz *et al*, 1979 ; Steghens *et al*, 1984).

L'intérêt de ces études est d'établir une spécificité tissulaire des isoenzymes CK MM, CK MB et CK BB mesurées dans le sang circulant.

Tissu	Activité CK totale (U/g tissu congelé)	Distribution des isoenzymes de la créatine kinase (%)		
		MM	MB	BB
Muscle du squelette	860 - 1310	96 - 100	0 - 3	0 - 1
Langue	225 - 292	90 - 99	1 - 5	0 - 5
Diaphragme	140	96	4	2
Coeur d'adulte	100 - 280	71 - 96	4 - 27	0 - 2
Coeur d'enfant	78 - 250	96 - 100	0 - 4	0
Aorte	3 - 7	81 - 88	8 - 14	3 - 5
Rein	0 - 1	70 - 100	0	0 - 30
Rate	0 - 1	65 - 75	0	25 - 35
Thyroïde	13 - 34	64 - 79	6	15 - 30
Surrénale	0 - 1	35 - 60	0 - 10	25 - 40
Poumon	2 - 9	27 - 72	0 - 4	18 - 69
Carotide	2	56	2	42
Artère	1	39	7	54
Foie	0 - 1	50	0	50
Prostate	7 - 10	34 - 69	2 - 6	59 - 60
Utérus	3 - 9	5 - 16	2 - 20	64 - 93
Pancréas	0 - 1	21 - 29	5 - 9	66 - 73
Intestin	5 - 6	11 - 13	7 - 9	78 - 80
Vessie	14 - 35	2 - 7	3 - 5	89 - 93
Estomac	15 - 23	3	2 - 6	91 - 95
Hypophyse	11	0	0	100
Moelle épinière	23 - 37	0	0	100
Cervelet	50 - 87	0	0	100
Cerveau	55 - 90	0	0	100

Tableau I : Distribution des isoenzymes de la créatine kinase dans les tissus humains
(d'après Kanemitsu, 1988)

Au cours du développement embryonnaire normal, la sous-unité CK B est la première à être synthétisée dans le **muscle squelettique** foetal puis elle est

progressivement remplacée par la sous-unité CK M (Cao et al, 1968 ; Tzvetanova, 1971). Le profil des isoenzymes du muscle squelettique varie donc en fonction de l'âge du fœtus. Ainsi, durant le 1^{er} et le 2^{ème} mois de gestation, la CK BB est la principale isoenzyme du muscle squelettique foetal mais est rarement détectable au delà de 6 mois (Goto et al, 1969 ; Tzvetanova, 1971 ; Foxall & Emery, 1975).

Entre la 8^{ème} et la 11^{ème} semaine de gestation, c'est la CK MB qui devient prépondérante (Tzvetanova, 1971 ; Foxall & Emery, 1975).

Puis on observe une diminution progressive de la proportion de CKMB à 20-46% de l'activité CK totale aux environs de la 30^{ème} semaine de gestation (Foxall & Emery, 1975 ; Schmidt et al, 1979). Chez les fœtus nés à terme, le muscle squelettique contient principalement l'isoenzyme CK MM, les proportions relatives de CK MM, MB et BB étant respectivement de 78,2%, 21,8% et 0% d'après les travaux de Foxall (Foxall & Emery, 1975). Schmidt trouve une répartition des isoenzymes MM, MB et BB assez similaire, respectivement 91,5%, 8% et 0,5% chez 2 fœtus entre 36 et 40 semaines de gestation et 88,3%, 11,3% et 0,3% chez 3 enfants nés à terme (Schmidt et al, 1979).

A l'âge adulte, le muscle squelettique contient presque exclusivement de la CK MM (99%), la CK MB est minoritaire (1%) et la CK BB n'est plus détectable car le gène codant la sous-unité B est réprimé dans les premières semaines après la naissance. La répartition de type adulte des isoenzymes CK dans le muscle squelettique est obtenue très précocément, probablement durant le premier mois de vie.

Cependant, le muscle squelettique d'un marathonien peut contenir jusqu'à 8% de CK MB (Siegel et al, 1983 ; Apple et al, 1984). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette constatation.

Premièrement, il a été montré que le muscle d'un marathonien contient une plus grande proportion de fibres lentes de type I : 65% versus 46% chez des non marathoniens (Costill et al, 1976 ; Apple et al, 1984). Or les fibres lentes sont plus riches en isoenzyme CK MB que les fibres rapides de type II (Lavoigne et al, 1997). Il y a ainsi une corrélation entre la proportion de CK MB et le pourcentage de fibres lentes dans le muscle squelettique (Apple et al, 1984).

Deuxièmement, les lésions répétées du muscle induites par l'entraînement intensif et le processus de régénération tissulaire qui s'en suit conduiraient à la réapparition d'un profil enzymatique de type foetal avec réactivation ou dérèglement du gène codant la sous-unité B (Goto et al, 1969) permettant à nouveau la synthèse de CK MB.

On retrouve d'ailleurs ce même profil de type foetal de la créatine kinase avec augmentation de la CK MB dans les muscles de patients atteints de myopathies

(dystrophie de Duchenne, polymyosite) probablement aussi par ré-expression du gène de la sous-unité B (*Tzvetanova, 1971*).

C'est au niveau du **muscle cardiaque** adulte que l'on retrouve la plus forte proportion d'isoenzyme CK MB à l'intérieur du cytosol cellulaire : entre 15 et 25% de CKMB pour 75% à 85% de CK MM avec des traces (inférieures à 1%) de CK mitochondriale et de CKBB (*Lang, 1981*).

Par contre le myocarde d'un enfant contient majoritairement de la CKMM (*Kanemitsu, 1988*).

La **CK BB** est l'isoenzyme exclusive du système nerveux central.

Elle est prépondérante dans le tractus gastro-intestinal (estomac, intestin, pancréas), le tractus génital (utérus, prostate), la vessie, le rein, le foie et le placenta (*Kanemitsu et al, 1988*).

La **CK mitochondriale** n'a pas de spécificité tissulaire. Elle a été mise en évidence dans le muscle cardiaque (*Kanemitsu et al, 1982a*), le foie (*Kanemitsu et al, 1982a*) et le cerveau (*Wevers et al, 1981*).

La créatine kinase passe dans le sang circulant après lyse cellulaire. En raison de son poids moléculaire, elle n'est pas filtrée par le glomérule rénal et sa concentration plasmatique n'est pas influencée par une insuffisance rénale. Elle est probablement épurée par le système réticulo-endothélial, en particulier dans le foie (*George et al, 1984*).

Dans le **sérum d'un adulte**, à l'état physiologique, ne sont détectées que l'isoenzyme MM (représentant plus de 95% de l'activité CK totale), prédominante en raison de la masse des muscles squelettiques (100 fois supérieure à la masse musculaire cardiaque) et l'isoenzyme MB, minoritaire (inférieure à 5%). La CK BB, ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique, est normalement indétectable.

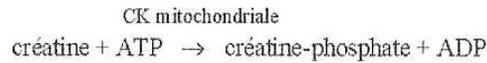
4. Rôle physiologique de la CK

C'est une enzyme qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique de la cellule musculaire permettant de reconstituer les réserves cellulaires en ATP et le transfert de l'énergie des mitochondries vers le cytoplasme.

La créatine -phosphate constitue une réserve d'énergie immédiatement disponible pour la cellule. Elle est synthétisée dans les mitochondries grâce à la CK mitochondriale puis

stockée dans le cytoplasme et utilisée au moment de la contraction musculaire. Sous l'influence de la CK cytosolique, l'hydrolyse de la créatine phosphate libère de la créatine (qui sera transformée en créatinine éliminée dans les urines) et une molécule d'ATP (figure n°4).

Mitochondrie



Cytoplasme

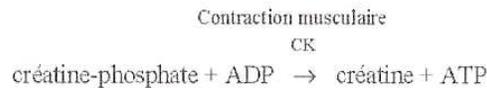


Figure 4 : Réaction catalysée par la créatine kinase dans le cytosol et les mitochondries au moment de la contraction musculaire (d'après Bessman & Carpenter, 1985)

Cependant c'est une réaction qui est limitée dans le temps (Figure 5) et qui est relayée par deux autres réactions nécessaires pour des exercices musculaires prolongés et plus rentables en terme de quantité d'ATP formé : la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative.

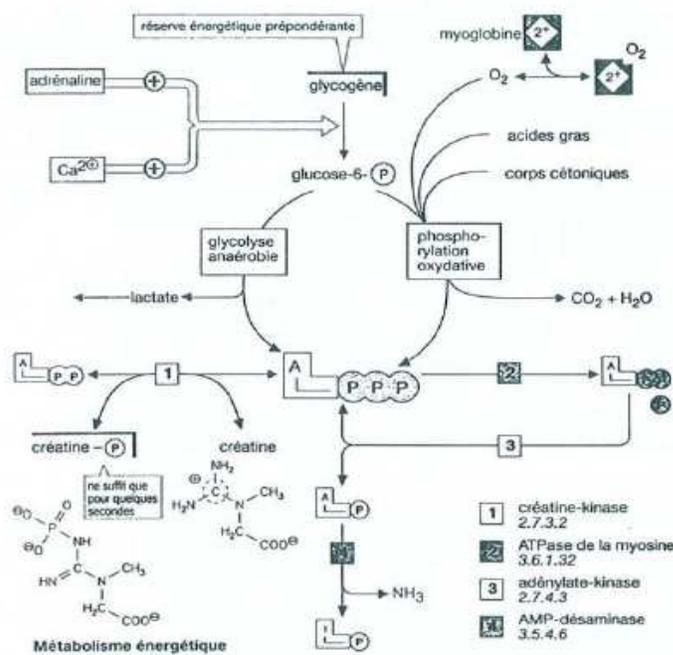


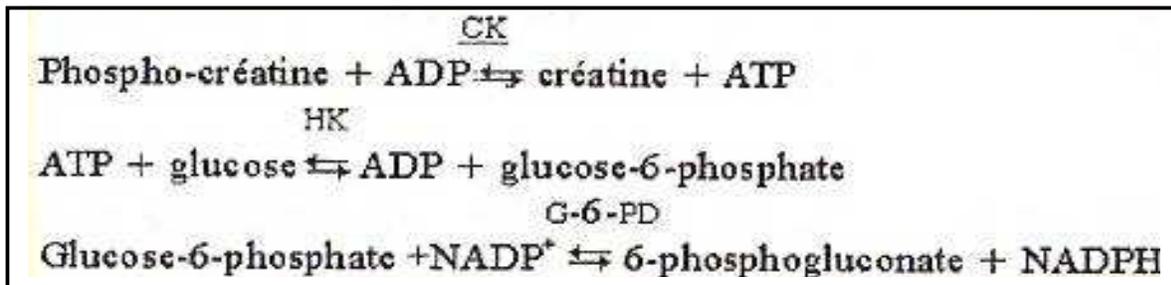
Figure 5 : Métabolisme énergétique de la cellule musculaire (d'après Sibernagl et al, 1987)

5. Principales méthodes de mesure

5.1. Activité Créatine Kinase totale

Les méthodes de mesure de l'activité de la CK totale sont toutes basées sur le même principe proposé par Oliver en 1955, modifié ultérieurement par Rosalski en 1967 puis par Szaz en 1976.

La réaction enzymatique primaire, catalysée par la créatine kinase, est couplée à une réaction auxiliaire (hexokinase) et une réaction indicatrice (glucose-6-phosphate deshydrogenase) selon la séquence suivante :



Cette méthode de dosage a été optimisée par l'introduction d'ion Mg^{2+} et la réactivation des groupements thiols de la CK par différents agents réducteurs tels que la N-acétyl-L-cystéine (NAC), le β mercapto-éthanol, le dithiothréitol ou le glutathion. De l'EDTA est ajouté pour prévenir l'auto-oxydation des activateurs et pour chélater les ions calcium et ferriques qui pourraient inhiber la réaction. Un mélange d'adénosine monophosphate (AMP) et de diadénosine-5-pentaphosphate (DAPP) est ajouté au milieu réactionnel pour inhiber l'adénylate kinase (AK) présente dans les érythrocytes, les plaquettes, le foie et les muscles squelettiques (appelée myokinase), qui pourrait faussement augmenter la réaction par production d'ATP (selon la réaction $2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$). Enfin, le pH optimum de la réaction est entre 6,5 et 6,7.

La vitesse de formation du NADPH est proportionnelle à l'activité catalytique de la CK et est suivie en continu par mesure spectrophotométrique à 340 nm. L'activité de la CK est déterminée à partir de la variation d'absorbance du milieu réactionnel par unité de temps (augmentation) et exprimée en unités internationales (UI/L).

La technique de référence proposée par l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) (*Hörder et al, 1991*) utilise comme activateur du NAC. Le tableau II indique la composition du mélange réactionnel.

Température.....	30 °C
Longueur d'onde.....	339 nm
pH.....	6.60
ADP.....	2.0 mmol/l
Acétate de magnésium.....	10 mmol/l
Tampon.....	Imidazole 100 mmol/l
D-Glucose.....	20 mmol/l
NADP ⁺	2.0 mmol/l
AMP.....	5.0 mmol/l
DADP.....	10.0 µmol/l
NAC.....	20 mmol/l
Hexokinase.....	3 000 U/l (50 µkat/l)
G6PD.....	2 000 U/l (33 µkat/l)
EDTA.....	2.0 mmol/l
Rapport de dilution du sérum.....	0.0435
Phase de préincubation.....	5 minutes
Phosphocréatine.....	30 mmol/l
Phase de latence.....	120 secondes
Phase de mesure.....	> 60 secondes

Tableau II : Concentration finale des réactifs utilisés pour le dosage de l'activité créatine kinase selon la méthode de référence IFCC (*Hörder et al, 1991*)

Les sociétés nationales ont recommandé des techniques très voisines : citons en particulier la société Allemande en 1977 (*DGKC, 1977*), la Société Scandinave en 1981 (*SSCC, 1981*) et la Société Française de Biologie Clinique en 1982 (*SFBC, 1982*).

Toutes ces techniques sont actuellement réalisées avec des réactifs prêts à l'emploi sur des analyseurs automatiques.

La différence essentielle entre les techniques actuellement disponibles provient de la température utilisée : 30°C pour la technique de référence IFCC ainsi que pour celle de la SFBC et des sociétés anglaise, suisse et hollandaise ; 37°C pour la technique de la Société Scandinave (SSCC) et 25°C pour la Société Allemande (DGKC).

Cependant, la plupart des analyseurs automatiques travaillent à 37°C. Un facteur de conversion de 0,629 +/- 0,042 de 37°C à 30°C pourrait être utilisé pour uniformiser les résultats par rapport à ceux de la technique de référence (*Hennequin et al, 1990*).

L'activité créatine kinase totale est mesurée en unité internationale par litre

(1 IU/L correspondant à la transformation d'une μmol de substrat par minute) ou en Katal par litre (1kat/L correspondant à la transformation d'une mole de substrat par seconde). La conversion des valeurs se fait facilement grâce à un facteur multiplicatif : pour passer d'un $\mu\text{kat/L}$ à une UI/L, il faut multiplier la valeur par 60 alors que dans l'autre sens, le facteur multiplicatif est de 0,0167.

5.2. Dosage des isoenzymes de la créatine kinase

Il existe plusieurs méthodes de mesure différentielle des isoenzymes CK basées sur des principes différents tels que :

- l'électrophorèse
- la chromatographie d'échange d'ions
- l'immunoinhibition
- l'immunoprécipitation
- les méthodes immunoenzymatiques
- les méthodes radioimmunologiques.

Les méthodes les plus utilisées sont l'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose ou sur gel d'agarose ainsi que l'immunoinhibition utilisant des anticorps anti CK-M humaine.

5.2.1. Techniques d'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique semi-quantitative qui permet de séparer les différentes formes circulantes de la CK (isoenzymes et macroCK) sur un support solide, dans un tampon à pH alcalin. De nombreuses techniques sont décrites.

Par exemple, on peut utiliser comme support une membrane d'acétate de cellulose en milieu tamponné alcalin (pH 8,6). Le volume de sérum déposé, généralement de 3 μL , est adapté aux concentrations totales en activité CK. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes dans une chambre refroidie (pour éviter l'inactivation des isoenzymes sensibles à la chaleur) (*Mathieu, 1990*).

Le gel d'agarose très utilisé lui aussi présente l'avantage de permettre le dépôt de volumes d'échantillons plus importants, jusqu'à 20 μL de sérum : la migration en tampon alcalin (pH 8,2) se fait en milieu refroidi sous un courant de 10 à 15 volts/cm pendant 20 à 40 minutes (*Mathieu, 1990*).

Le tampon alcalin permet d'obtenir des protéines à charge globale négative qui migrent vers l'anode dans le champ électrique.

Après séparation, la révélation des différentes fractions de CK se fait par contact du support avec le mélange révélateur selon une réaction enzymatique identique à celle de la mesure d'activité de la CK (Cf paragraphe 5.1.) avec formation finale de NADPH:

- soit par immersion simple
- soit en imprégnant une bande de papier filtre de révélateur
- soit en incluant ce mélange révélateur dans de la gélatine ou un gel d'agar ou d'agarose qui est coulé sur le support.

Deux systèmes de révélation sont utilisés :

- l'un est une mesure fluorimétrique, basée sur la propriété du NADPH d'émettre une fluorescence bleuâtre lorsqu'il est exposé à une lumière ultraviolette
- l'autre est colorimétrique, faisant intervenir une réaction d'oxydoréduction entre le NADPH formé et le phénazine méthosulfate (PMS), qui à son tour réduira le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en formazan coloré.

L'intégration densitométrique des bandes fluorescentes ou colorées permet de visualiser le profil électrophorétique et d'identifier les différentes formes de CK par rapport à un témoin.

La méthode de révélation par fluorescence est plus sensible que la colorimétrie et est de ce fait recommandée (*Kanemitsu & Okigaki, 1988*). Cependant, on décrit des artefacts correspondant à la présence d'albumine liée à des substances fluorescentes.

Les bandes fluorescentes diffusent plus sur membrane d'acétate de cellulose que dans un gel d'agarose dont la résolution est meilleure (*Kanemitsu & Okigaki, 1988*).

A pH alcalin, l'isoenzyme BB migre le plus rapidement vers l'anode (CK 1), la CK – MM reste au point d'origine (CK3) et la CKMB a une migration électrophorétique intermédiaire (CK 2) (Figure 6).

Un sérum normal d'adulte fait apparaître une ou deux bandes. La CK MM représente 96 à 100% de la CK totale ; si elle est présente, la CK MB représente moins de 4% de la CK totale. Il n'y a pas de bande CK BB.

En cas d'infarctus du myocarde, la CK MM et la CKMB augmentent toutes deux en intensité et la CK MB représente plus de 4% de l'activité CK totale.

L'électrophorèse est la seule technique permettant de mettre en évidence les macroCK : la macro CK de type 1 migre classiquement entre la CK MM et la CK MB alors que la CK mitochondriale et la macro CK de type 2 ont une migration cathodique par rapport à la CKMM. Sont également décrits des variants génétiques de la CK de mobilité intermédiaire entre la CK BB et la CK MB (Figure 6).

En cas d'hémolyse, il apparaît une bande supplémentaire sur le profil correspondant à l'adénylate kinase (AK) libérée par les érythrocytes. La mobilité électrophorétique de l'AK varie selon les systèmes d'électrophorèse utilisés : elle peut migrer en position cathodique (épaulement à gauche) (*Nanji, 1983*) ou en position anodique (épaulement à droite) (*Massey & Barta, 1982*) par rapport au pic de CK MM. L'artéfact lié à l'hémolyse peut ainsi être confondu avec la présence d'une macroCK de type 1 ou 2 selon les cas.

Enfin la présence d'albumine est à l'origine d'une bande artéfactuelle au niveau de la zone de migration de la CKBB ou entre les fractions CK MB et CK BB (Figure 6).

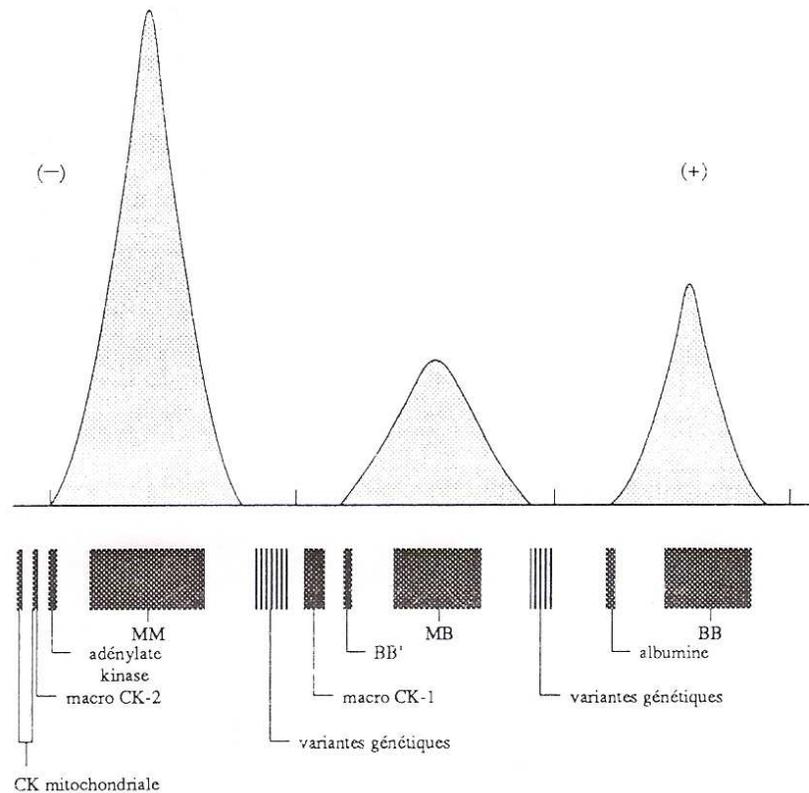


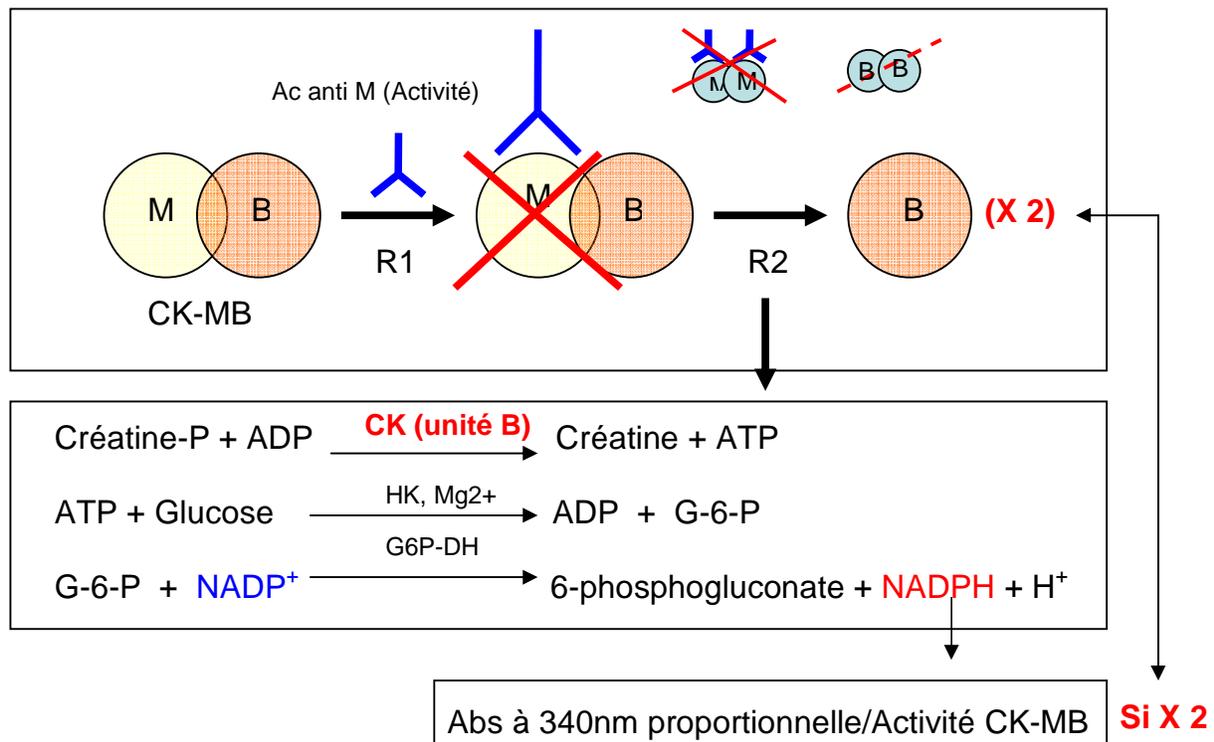
Figure 6 : Migration électrophorétique des isoenzymes CK et des formes atypiques
(d'après Doré, 1994)

Les techniques d'électrophorèse sont seulement semi-quantitatives et longues à mettre en oeuvre, ce qui est peu compatible avec l'urgence mais elles ont l'avantage de permettre l'identification des isoenzymes atypiques présentes dans le sérum étudié.

5.2.2. Dosage de la CK MB par technique d'immunoinhibition

C'est une méthode assez largement utilisée en routine. Elle repose sur l'inhibition de l'activité catalytique de la sous-unité M par un anticorps spécifique anti M. L'activité catalytique résiduelle qui est mesurée correspond donc à celle de la CK BB et à celle de la sous-unité B constituant l'isoenzyme CK MB. En admettant que la CK BB est indétectable dans un sérum normal, il suffit de multiplier par 2 le résultat obtenu pour quantifier l'activité CK MB.

Un schéma récapitulatif est présenté à la figure 7.



R1 : réactif 1

R2 : réactif 2

Créatine-P : créatine -phosphate

HK : hexokinase

G6P-DH : Glucose 6-phosphate deshydrogénase

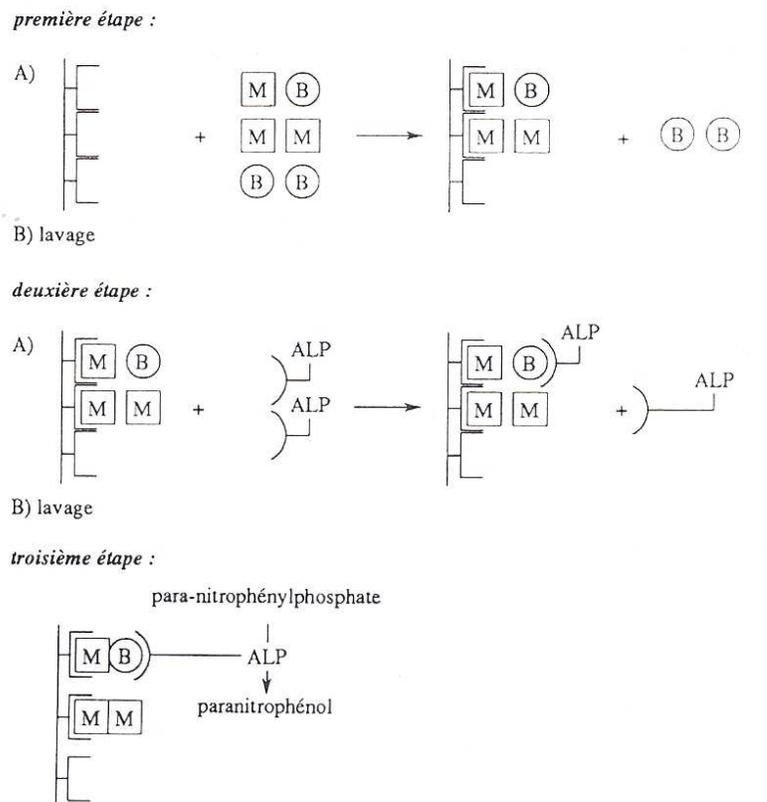
Abs : absorbance

Figure 7 : Principe du dosage de l'activité CKMB par immunoinhibition

Cette méthode a l'avantage d'être automatisable et rapide mais elle manque de sensibilité pour des concentrations normales de CK totale et elle est prise en défaut dès lors qu'il existe d'autres formes que la CK MB dans le sérum à analyser, que ce soit la présence de CK BB, de macro CK de type 1 ou de type 2 (toutes deux étant résistantes à l'action inhibitrice de l'anticorps) ou d'adénylate kinase en cas d'hémolyse. Dans ces trois cas, il y a surestimation du résultat. La présence de macroCK conduit parfois à des résultats aberrants avec une activité CK MB supérieure à l'activité CK totale.

5.2.3. Dosage pondéral de la CK MB

Elle consiste à doser la CK MB en tant que protéine en $\mu\text{g/L}$ par une méthode immunométrique de type sandwich utilisant deux anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de la molécule de CK-MB : un anticorps anti-CK M et un anticorps anti-CK B. Un premier anticorps est fixé sur une phase solide, permettant de lier la CK-MB ; le deuxième anticorps marqué soit à la phosphatase alcaline soit à une molécule chimiluminescente reconnaît spécifiquement la fraction MB fixée, permettant sa quantification.



ALP : phosphatase alcaline

Figure 8 : Dosage immunologique de la CK-MB (d'après Doré, 1994)

Une standardisation a été validée en 1999 par l'AACC (American Association for Clinical Chemistry) (*Christenson et al, 1999*). Le matériau de référence choisi est de la CK MB2 recombinante provenant de coeur humain, sous forme lyophilisée plus stable. Ceci permet de réduire de 40% les différences entre les résultats des tests commercialisés.

Les techniques de dosage pondéral de la CK MB ont le grand avantage d'être plus spécifiques car elles sont insensibles à l'hémolyse et à la présence de CK-BB ou de macro-CK. Elles sont également plus sensibles que la mesure de l'activité CKMB par immunoinhibition. Les seuils décisionnels varient entre 5 et 10 µg/L selon les techniques.

Elles sont automatisables avec un résultat obtenu en moins de 30 min. Leur limite de détection est inférieure à 1µg/L (*Bugugnani, 2002*).

5.2.4. La chromatographie d'échange d'ions (Mathieu, 1990)

Cette méthode est basée sur les affinités différentes des isoenzymes de la créatine kinase pour les résines anioniques. Ces affinités varient avec la charge ionique de chaque isoenzyme, reflétant leur composition en acides aminés. La méthode la plus couramment répandue fait appel à des microcolonnes qui utilisent comme phase stationnaire une résine DEAE (diéthylamino-éthyl Sépharose) associant la propriété de gel filtration à celle d'échanges d'ions. La phase liquide est un tampon Tris (HCl 50 mM à pH 7,5). L'étape d'élution est faite avec des solutions de NaCl aux concentrations croissantes de 30 à 300 mM. Cette technique nécessite un dépôt de 250µL de sérum. Les fractions éluées sont mesurées en concentrations catalytiques de CK à l'aide des techniques utilisées pour la mesure de l'activité totale dans le sérum.

La chromatographie d'échanges d'ion est une technique longue qui n'est pas plus utilisée en pratique courante. Elle est réservée à des activités de recherche.

5.2.5. L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation utilise des anticorps précipitants dirigés contre la CK MM ou la CK BB. Cette méthode spécifique et sensible, n'est cependant que peu utilisée en chimie clinique courante car la précipitation des complexes immuns demande environ 5 heures.

5.2.6. Les méthodes radioimmunologiques

Très sensibles, elles ne mesurent pas l'activité catalytique de la CK mais utilisent un traceur (iode 125) et permettent la mesure de la concentration massique d'une isoenzyme.

Elles ne sont pas d'une utilisation courante en chimie clinique.

5.3. Dosage des isoformes de la CKMM et de la CKMB

On peut utiliser une technique d'électrophorèse en gel d'agarose à haut voltage (900 V, 60mA) à 24°C pendant 6 minutes. Les isoformes sont ensuite révélées par réaction enzymatique avec quantification en fluorescence. Le résultat est obtenu en 30 minutes. La limite de détection est de 1,2 UI/L mais cette technique nécessite un équipement particulier (*Bugugnani, 2002*).

On peut aussi employer une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (à une température de 4°C pendant 5 heures avec un champ électrique de 400 volts et 20 µL de sérum (*Stein & Decker, 1989*).

Les techniques de focalisation isoélectrique permettent également de séparer les isoformes de CK MM et de CKMB.

Enfin il existe une technique immunométrique de dosage de la CKMB2 par inhibition de la CKMB1 par un anticorps spécifique puis mesure de la CKMB2 résiduelle (*Laurino et al, 1995*). Sa sensibilité analytique est de 0,2 µg/L.

En pratique, la méthode préconisée par la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) pour le dosage de la CK s'est imposée dans pratiquement toutes les méthodes analytiques des automates et des semi-automates.

La mesure de l'activité de la CK MB par méthode d'immunoinhibition tend à disparaître, du fait du manque de spécificité au profit du dosage pondéral de la CK MB de sensibilité et de spécificité supérieures.

Les séparations par des techniques électrophorétiques des isoenzymes et isoformes de la CK qui présentent un intérêt indéniable dans l'identification des CK atypiques, restent du ressort des laboratoires spécialisés.

Quant aux autres techniques, elles sont soit abandonnées car inadaptées à la pratique biologique de routine (immunoprécipitation), soit réservées à des laboratoires de recherche (isofocalisation électrique, radioimmunologie).

6. Variations préanalytiques de la CK

6.1. Facteurs de variation liés au sujet

L'exercice physique est à éviter pendant les trois jours précédant le prélèvement car il est à l'origine d'une libération de créatine kinase dans le sang à partir des tissus musculaires (SFBC, 1982) : l'élévation de la CKMM est immédiate, devient maximale à la 6^{ème} heure puis revient à la normale en 3 jours. Les valeurs peuvent être multipliées par 2 ou 3 (Clarkson et al, 1987).

La prise de repas ne modifie pas les valeurs physiologiques (SFBC, 1982).

Il est recommandé de prélever le patient en position allongée (SFBC 1982).

6.2. Facteurs de variation liés au prélèvement

Tout sérum hémolysé est à interpréter avec prudence. En effet, l'hémolyse conduit à la libération d'adénylate kinase érythrocytaire ce qui majore le résultat de la mesure de l'activité créatine kinase du sérum via la production d'ATP et est responsable de l'apparition d'une bande supplémentaire sur le profil électrophorétique. L'hémolyse interfère avec toutes les techniques à l'exception du dosage pondéral de la CKMB.

La pose prolongée du garrot (> 10minutes), un prélèvement capillaire ou un prélèvement veineux difficile sont des facteurs pouvant favoriser l'hémolyse.

L'inhibition de l'adénylate kinase par le mélange AMP et DAPP contenu dans le milieu réactionnel n'est que partielle. En cas d'hémolyse visible, on peut pallier cet inconvénient par la réalisation d'un blanc réactif comportant tous les éléments de la réaction à l'exception de la créatine phosphate (SFBC, 1982 ; Kanetmisu, 1988) : dans ce cas, l'activité créatine kinase est nulle et seules les réactions non spécifiques persistent, réactions qu'il suffit de soustraire.

6.3. Facteurs de variation liés à l'échantillon

Le prélèvement sur tube sec sans anticoagulant doit être préféré (Gerhardt et al, 1979 ; SFBC, 1982). En effet, le fluorure et l'iodoacétate peuvent favoriser l'hémolyse ; le citrate trisodique et l'héparinate de lithium peuvent légèrement inhiber l'activité CK.

Une altération de la créatine kinase dans le sérum peut se produire après inactivation thermique, oxydation des groupements thiols, acidification et irradiation à la

lumière. Le prélèvement doit donc être conservé à l'abri de la lumière, des agents oxydants et à un pH optimum compris entre 6,5 et 7 (IFCC, 1986).

Le prélèvement doit être rapidement centrifugé, dans les 2 heures, afin de limiter le temps de contact du sérum avec les érythrocytes et le risque d'hémolyse (SFBC, 1982).

La durée de conservation de l'échantillon est variable selon la température de stockage comme le montre le tableau III (Nealon & Henderson, 1977b ; Szaz & Gruber, 1982 ; SFBC, 1982). De plus, les isoenzymes ont également des stabilités variables, l'isoenzyme MM étant la plus stable, suivie par la MB et la BB. La macroCK de type 1 est aussi extrêmement stable.

A température ambiante, la CK totale et la CKMB peuvent être mesurées jusqu'à 24 heures après le prélèvement, la CKMM jusqu'à 48 heures après le prélèvement alors que la CKBB ne se conserve pas à température ambiante.

A + 4°C, l'activité CK totale est stable au cours des 10 jours qui suivent le prélèvement, la CKMM pendant 2 semaines, la CKMB pendant 5 jours et la CK BB pendant 48 heures.

Conservé à - 20°C, l'activité CK totale est stable pendant au moins 10 jours et la CKMM pendant un mois. Les dosages de la CKMB et de la CKBB sont rapidement erronés lorsque le prélèvement est congelé.

	Température ambiante	+4°C	-20°C
CK totale	24 h	10 jours	> 10 jours
CK MM	48 h	15 jours	28 jours
CK MB	24 h	5 jours	à éviter
CK BB	0,5 h	2 jours	à éviter

Tableau III : Stabilité in vitro de l'activité CK totale et des isoenzymes en fonction de la température de conservation

(la stabilité est définie par une perte d'activité inférieure à 10% de l'activité initiale)

(d'après Nealon & Henderson, 1977b ; Szaz & Gruber, 1982 ; SFBC, 1982)

La stabilité dépend aussi des techniques utilisées. La CKMB est plus stable lorsqu'elle est dosée par technique immunométrique que par les autres méthodes, ce qui semble signifier que des changements conformationnels affectent plus l'activité enzymatique que l'immunoréactivité (Buttery et al, 1992).

En ce qui concerne les isoformes, la CKMB2 est stable 6 h à 25°C ou à 4°C et un mois à -20°C (Laurino et al, 1996). La stabilité est meilleure en présence d'EDTA qui agit en complexant le calcium nécessaire à l'action des protéases, en particulier de la N-carboxypeptidase (Davies et al, 1992).

L'hyperbilirubinémie n'a pas d'influence sur le dosage de la CK totale et de ses isoformes (Glick et al, 1986).

L'hyperlipémie peut modifier les résultats sur certains appareils de dosage. La clarification est à proscrire : par exemple, le Liposol® augmente l'activité CK de 10% (Lacher & Elsea, 1986).

7. Valeurs de référence et variations physiologiques

Les valeurs de référence de l'activité créatine kinase dans le sérum dépendent de la technique utilisée et des conditions de mesure en particulier de la température.

L'activité CK totale est un paramètre biochimique qui varie selon l'âge et le sexe en relation avec la masse musculaire : la différence homme/femme devient significative à partir de la puberté.

Des valeurs de référence ont été établies par plusieurs sociétés savantes nationales (DGKC, 1977 ; IFCC, 1986 ; SFBC, 1982 ; SSCC, 1981) : elles sont indiquées dans le tableau IV.

SFBC 30°C			IFCC 30°C			SSCC 37°C			DGKC 25°C		
Age	Sexe	IR 95 (UI/L)									
0-1 mois	-	36-144									
1- 4 ans	-	18-126									
4-9 ans	-	18-108	≤ 10 ans	-	18-126						
10-14 ans	F	18-108									
15-45 ans	F	18-78	10-45 ans	F	18-90	Adulte	F	30-200	15-82 ans	F	10 - 60
> 45ans	F	18-90									
10-20ans	M	36-198	10-60 ans	M	36-216	Adulte	M	40-250	15-82 ans	M	10 - 70
> 20ans	M	18-216									

IR 95 : intervalle de référence 95%

Tableau IV : Valeurs de référence de l'activité CK totale dans le sérum en fonction de l'âge, du sexe et de la température du milieu réactionnel (DGKC, 1977 ; IFCC, 1986 ; SFBC, 1982 ; SSCC, 1981)

7.1. Chez l'enfant

Chez les enfants, les valeurs sont assez dispersées. Dans les conditions de mesure recommandées par la Société Française de Biologie Clinique à 30°C, l'activité CK totale est inférieure à 145 UI/L jusqu'à 1 mois et inférieure à 120 UI/L jusqu'à 10 ans (SFBC, 1982). Des valeurs similaires (18-126 UI/L) sont retrouvées par l'IFCC (même méthode à 30°C) chez les enfants jusqu'à 10 ans (IFCC, 1986).

Plus récemment en 2011, Clifford a établi des valeurs de référence pédiatriques sur une large cohorte d'enfants de 6 mois à 17 ans (Clifford et al, 2011) où il met en évidence une différence significative selon le sexe dans tous les groupes d'âge sauf dans la tranche d'âge 6-8 ans. Cependant, la différence fille /garçon est vraiment marquée à partir de 9 ans ; on note une augmentation des valeurs chez le garçon entre 9 et 17 ans en raison de l'accroissement de la masse musculaire alors qu'elles restent stables chez la fille durant cette période (tableau V).

Classe d'âge	N	Garçons			N	Filles			p
		Moyenne	Médiane	IR		Moyenne	Médiane	IR	
<i>créatine kinase (U/L)</i>									
5 mois - 2ans	150	138	127	50 - 272	122	119	110	38 - 260	0,002
3 - 5 ans	149	117	102	59 - 296	150	99	93	42 - 227	0,005
6 - 8 ans	149	117	102	54 - 275	149	112	106	50 - 231	NS
9 - 11 ans	150	135	122	55 - 324	148	113	102	52 - 256	< 0,001
12 - 14 ans	148	154	131	63 - 407	149	104	93	45 - 257	< 0,001
15 - 17 ans	149	213	159	68 - 914	144	118	94	45 - 458	< 0,001

IR : intervalle de référence 95%

Tableau V : Valeurs de référence de la CK chez l'enfant (d'après Clifford et al, 2011)

7.2. Chez l'adulte

Chez l'adulte, dans les conditions de mesure SFBC à 30°C, la concentration catalytique totale de la créatine kinase dans le sérum du sujet sain au repos strict est inférieure à 80UI/L chez la femme non ménopausée et inférieure à 220 UI/L chez l'homme. Des valeurs similaires sont obtenues selon la méthode de référence IFCC (30°C). La différence de l'ordre du double entre homme et femme s'explique par la masse musculaire plus importante chez l'homme.

Les valeurs de référence données à 37°C par la Société Scandinave de Chimie Clinique sont pour la même méthode de : 40 à 250 UI/L chez l'homme et de 30 à 200 UI/L chez la femme.

A 25°C, les limites indiquées par la Société Allemande de Chimie Clinique vont de 10 à 70 UI/L chez l'homme et 10 à 60 UI/L chez la femme.

Il n'y a pas de différence dans les proportions d'isoenzymes en fonction du sexe et de l'âge (*Bugugnani, 2002*).

Le **statut hormonal** a également une influence sur l'activité CK.

Chez les filles en période pré-pubertaire, on peut considérer comme normales des valeurs jusqu'à 110 UI/L, soit une augmentation de l'ordre de 15% (*Bunday et al, 1979*) à 30% (*SFBC, 1982*) par rapport aux filles réglées.

On note également chez la femme après la ménopause, une légère augmentation des valeurs de l'ordre de 15% par rapport aux femmes en période d'activité génitale (*SFBC, 1982*).

Le **poids et la taille** n'ont pas d'influence sur les valeurs sériques (*Black et al, 1986*). La surcharge pondérale et la réduction de poids ne modifient pas l'activité CK (*Larsen & Rossner, 1983*).

Ni **l'alimentation** ni la **pression artérielle** ne sont des facteurs d'influence (*Black et al, 1986*).

Des études américaines ont pu montrer une différence des valeurs sériques de CK selon **l'origine géographique** de l'individu (*Black et al, 1986 ; Passos et al, 1989*) :

- la population africaine présente des taux de CK totale 50% plus élevés que la population caucasienne
- les hommes hispaniques présentent des taux de CK 30% plus élevés par rapport à leurs homologues caucasiens, 10% pour les femmes.

L'exercice physique et les traumatismes musculaires sont des facteurs bien connus responsables d'une augmentation de l'activité CK sérique. Elle est liée à une libération de l'isoenzyme CKMM dans le sérum, immédiate, qui devient maximale à la 6^{ème} heure avec un retour à la normale en trois jours (*SFBC, 1982*). L'importance de l'élévation (jusqu'à + 50%) dépend de l'intensité de l'effort et de l'entraînement du sujet. Des valeurs supérieures à la normale se rencontrent chez les sujets sportifs en ambulatoire.

En ce qui concerne la **prise de médicaments**, les contraceptifs oraux (*Simpson et al, 1974*) n'ont pas d'influence sur les valeurs de CK. Par contre, il a été montré une élévation de l'activité CK chez les patients sous neuroleptiques (*Pearlman et al, 1988*).

L'intoxication alcoolique est une cause relativement fréquente d'élévation des CK par un mécanisme de rhabdomyolyse. Après un épisode aigu d'ivresse, l'élévation des CK existe dans 40 à 80% des cas et est habituellement asymptomatique. Une élévation isolée des CK sans signe clinique est retrouvée chez 18% des alcooliques chroniques et est considérée comme le témoin d'une myopathie alcoolique chronique (*Laraki, 2006*).

7.3. Chez la femme enceinte

Durant la grossesse, la valeur de l'activité CK totale est inférieure de 20 à 50% par rapport à une femme non enceinte du même âge (*Kate et al, 1983*). Il est observé une diminution de l'activité CK totale sérique au cours du 2^{ème} trimestre de la grossesse (valeur minimale) suivie d'une augmentation au 3^{ème} trimestre (*Emery et al, 1965 ; Chemnitz et al, 1979*). L'isoenzyme CK BB est indétectable durant toute la grossesse (*Chemnitz et al, 1979*).

L'activité CK totale dans le sang maternel augmente considérablement après la délivrance (*Konttinen et al, 1963 ; Franza et al, 1964 ; Emery et al, 1965 ; Mc Neely et al, 1977 ; Chemnitz et al, 1979 ; Liras et al, 1988*), les valeurs mesurées étant supérieures en cas d'accouchement par voie basse par rapport à une césarienne. Dans une étude réalisée par Mc Neely, les valeurs de CK peuvent atteindre jusqu'à 6 fois la limite supérieure de la normale après accouchement par voie vaginale sans complication ; 90% de cette augmentation est attribuable à l'isoenzyme CK MM libérée par les muscles squelettiques très sollicités durant le travail avec un retour aux valeurs normales en 6 semaines (*Mc Neely et al, 1977*). Une autre étude menée par Chemnitz a montré que l'activité CK totale augmente durant le travail, atteint un maximum 6-12h après la délivrance puis diminue rapidement avec retour aux valeurs normales en seulement 48 heures (*Chemnitz et al, 1979*).

Par ailleurs, plusieurs équipes ont mis en évidence une augmentation de la fraction CK MB (*Mc Neely et al, 1977 ; Bayer et al, 1977 ; Chemnitz et al, 1979*) et de la fraction CKBB en post délivrance (*Mc Neely et al, 1977 ; Liras et al, 1988*), avec des valeurs plus élevées en cas d'accouchement par voie basse versus césarienne (*Chemnitz et al, 1979 ; Liras et al, 1988*). Il faut savoir que l'utérus et le placenta contiennent quasi-exclusivement l'isoenzyme CK BB (*Jockers-Wretou & Pfeiderer, 1975 ; Chemnitz et al, 1979 ; Kanemitsu & Okigaki, 1988*). L'activité CK du myomètre mesurée chez une femme enceinte est plus élevée que chez une femme non gravide (*Konttinen et al, 1963 ; Emery et al, 1965*), avec des valeurs qui sont environ le double (*Chemnitz et al, 1979*).

L'activité CK placentaire, bien plus faible que celle du myomètre (*Chemnitz et al, 1979*) augmente au cours de la grossesse et de façon plus marquée en cas de pré-éclampsie en

raison des infarctus placentaires et des lésions tissulaires ischémiques qui en résultent (*Sammour et al, 1974*).

La présence de CK BB dans le sang maternel en post partum immédiat peut donc s'expliquer par la libération de cette isoenzyme à partir du placenta mais surtout à partir du myomètre beaucoup plus riche en CK BB : la libération proviendrait des contractions utérines lors d'un accouchement par voie vaginale et de l'incision chirurgicale du myomètre lors d'une césarienne (*Liras et al, 1988*).

Les valeurs de CK totale et de CK MB dans le sang maternel sont très dépendantes des conditions de l'accouchement. Chemnitz a montré que l'augmentation observée en post partum immédiat est directement corrélée :

- au mode de délivrance : les valeurs de CK sont plus élevées en cas d'accouchement par voie basse versus césarienne,
- à la durée du travail,
- à la parité de la mère : les taux sont plus élevés chez les primipares que chez les multipares car en général la durée du travail est plus longue
- au poids de naissance de l'enfant : les taux observés sont plus bas pour des poids de naissance inférieurs à 2500g.

L'activité CK totale augmente significativement dans le sang maternel en cas de prééclampsie modérée ou sévère (*Sammour et al, 1974*).

Les taux de CK et des isoenzymes en post partum sont donc le reflet à la fois de l'activité des muscles squelettiques (effort musculaire lors du travail et relative hypoxie musculaire) et du myomètre (effet des contractions utérines). L'importance de l'élévation dépend de l'intensité du travail musculaire fourni par la parturiente.

7.4. Chez le fœtus

7.4.1. Activité CK totale

Quelques équipes ont étudié les variations de l'activité créatine kinase totale dans le sang foetal en fonction de l'âge gestationnel par prélèvement de sang de cordon in utéro. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les activités enzymatiques foetales et maternelles (*Forestier et al, 1987 ; Nava et al, 1996*), ce qui implique que les valeurs mesurées chez le fœtus ne sont pas liées à la présence d'un composant d'origine maternelle mais sont bien le reflet direct et réel du métabolisme foetal. L'activité CK totale chez le fœtus est supérieure à l'activité mesurée en parallèle dans le sang maternel

(Nava et al, 1996) et il existe une corrélation positive avec l'âge gestationnel (Gozzo et al, 1998) comme le montre la figure 9. Les valeurs observées in utéro sont stables entre 20 et 26 semaines de gestation (62 UI/L +/-6UI/L) (Forestier et al, 1987) mais augmentent significativement après 28 semaines (Nava et al, 1996 ; Gozzo et al, 1998) en raison de l'accroissement de la masse musculaire du fœtus en fin de grossesse.

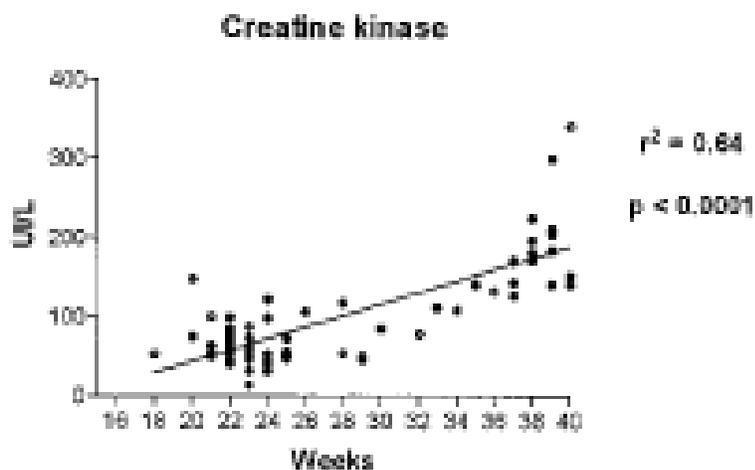


Figure 9 : Variations de l'activité CK totale chez le fœtus en fonction de l'âge gestationnel (prélèvement de sang de cordon in utéro de 72 fœtus sains entre 18 et 40 semaines de gestation) (d'après Gozzo, 1998)

L'activité CK totale mesurée dans le sang de cordon immédiatement après la délivrance chez des nouveaux nés à terme en bonne santé (accouchement sans complication) est physiologiquement élevée et toujours supérieure aux valeurs usuelles mesurées chez un adulte sain, quelle que soit la technique utilisée (Bodensteiner & Zellweger, 1971 ; Sabater & Villalba, 1972 ; Sammour et al, 1974 ; Gilboa & Swanson, 1976 ; Freer et al, 1979 ; Kristensen et al, 1979 ; Sutton et al, 1981 ; Massey & Barta, 1982 ; Perkins et al, 1993). Les valeurs observées chez le nouveau né sont environ le double de celles mesurées dans le sang maternel prélevé en parallèle après l'accouchement (Sammour et al, 1974 ; Kristensen et al, 1979) ; elles sont 3 à 4 fois plus élevées que celles de l'adulte sain (Freer et al, 1979 ; Sutton et al, 1981 ; Massey et al, 1982 ; Perkins et al, 1993), parfois même jusqu'à 10 fois supérieures (Gilboa & Swanson, 1976).

Il n'y a pas de différence significative selon le sexe de l'enfant à la naissance (Gomez et al, 1984 ; Perkins et al, 1993) ni selon le site de prélèvement au cordon (artère versus veine ombilicale) (Liras et al, 1988 ; Amato et al, 1992 ; Perkins et al, 1993).

L'activité CK totale chez le nouveau né continue d'augmenter en post partum immédiat pour atteindre un maximum à 24 h de vie (*Cao et al, 1968 ; Bodensteiner & Zellweger, 1971 ; Gilboa & Swanson, 1976 ; Jouppila et al, 1978 ; Sutton et al, 1981*) puis diminue rapidement au cours de la première semaine (*Gilboa & Swanson, 1976 ; Fishbach et al, 1992*). Les valeurs de CK totale adultes sont atteintes dans un délai plus ou moins long entre la 6^{ème} et la 10^{ème} semaine de vie (*Gilboa & Swanson, 1976*). Néanmoins, pour Bodensteiner et Gomez, les valeurs de CK totale sont très dispersées et restent supérieures aux valeurs adultes durant toute la 1^{ère} année de vie (*Bodensteiner, 1971 ; Gomez et al, 1984*).

Des différences ont été mises en évidence selon que l'activité CK est mesurée sur du sang de cordon, sur du sang veineux ou sur du sang capillaire mais les résultats sont discordants. Ainsi l'activité CK dans le sang de cordon est supérieure à celle mesurée dans le sang capillaire à la délivrance pour Amato (285+/-137UI/L versus 179+/-69 UI/L) mais inférieure à celle mesurée dans le sang capillaire et le sang veineux à la délivrance pour Gilboa (119+/-71 UI/L dans le sang de cordon versus 263+/-154UI/L dans le sang capillaire et 247 UI/L +/-199 UI/L dans le sang veineux).

Les activités CK mesurées à la délivrance sont très variables car dépendantes des conditions d'accouchement. Rudolph a montré que l'activité CK totale mesurée à J1 est plus élevée en cas d'accouchement par le siège, d'accouchement déclenché par perfusion d'ocytocine et en cas de travail prolongé (*Rudolph & Gross, 1986*). De plus, la plupart des auteurs observent une activité CK plus élevée en cas d'accouchement par voie basse par rapport à une césarienne (*Bodensteiner & Zellweger, 1971 ; Jouppila et al, 1978 ; Jedeikin et al, 1982 ; Rudolph & Gross, 1986*). Cette augmentation est attribuée au traumatisme musculaire subi par le nouveau né lors du passage par la filière génitale. Néanmoins, 4 études ne mettent pas en évidence de différence selon le mode de délivrance (*Gilboa & Swanson, 1976 ; Liras et al, 1988 ; Abe et al, 1992 ; Perkins et al, 1993*).

	N	Age gestationnel	Site de prélèvement	Mode de délivrance	Température de mesure enzymatique	Activité CK totale (UI/L)	Valeurs de référence CK totale adulte (UI/L)
Gilboa et al. (1976)	48	terme	cordon	voie basse (n=38) césarienne (n=10)	30°C	100 (+/-52,5) 10-312 158 (+/-79) 70-310	0-75
Jouppila et al. (1978)	24	terme	cordon	voie basse (n=16) césarienne (n=8)	37°C	184 (moyenne) Pas de différence VB/CS	non précisé
Freer et al. (1979)	81	34-42 SA	cordon	voie basse (n=64) césarienne (n=17)	30°C	28-475 (quel que soit le mode de délivrance)	4-100
Kristensen et al. (1979)	-	terme	cordon	voie basse	37°C	200 (moyenne) (valeur maximale : 567)	non précisé
Sutton et al. (1981)	26	terme	cordon	voie basse	37°C	moyenne : 156,8 extrêmes : 80 - 288	23-99
Jedeikin et al. (1982)	45	terme	cordon	voie basse (n=34) césarienne (n=11) sans distinction	30°C	176 (72) 204 (72) 70-380	130
Liras et al. (1988)	52	terme	cordon	voie basse (n=39) césarienne (n=13)	non précisé	<u>artère</u> : 233,97 (+/-17,79) <u>veine</u> : 230,10 (+/-16.59) <u>artère</u> : 209,84 (+/-49.53) <u>veine</u> : 207,00 (+/-43.87)	non précisé
Abe et al. (1992)	-	terme	cordon	voie basse et césarienne	non précisé	209 (+/-99)	non précisé
Amato et al. (1992)	20	38-42 SA	cordon	voie basse	non précisé	<u>artère</u> : 285 (+/-137) <u>veine</u> : 265 (+/-133)	non précisé
Perkins et al. (1993)	397	37-41 SA	cordon	voie basse (n=310) césarienne (n=87)	non précisé	<u>artère</u> : 71 - 475 <u>veine</u> : 82 - 528	10-180

VB : voie basse

CS : césarienne

Tableau VI : Activité CK totale dans le sang de cordon à la naissance

Il a été montré que l'activité CK mesurée dans **le liquide amniotique** augmente en cas de mort foetale in utéro. La creatine kinase serait d'origine foetale, issue de la décomposition des tissus foetaux et s'accumulerait dans le liquide amniotique. La valeur de la CK pourrait ainsi refléter le temps écoulé depuis la mort foetale (*Kerenyi & Sarkozi, 1974*).

7.4.2. Isoenzymes CK

Le tableau VII indique le profil de répartition des isoenzymes de la créatine kinase dans le sang de cordon de nouveaux nés à terme sans complications.

	CK MM (%)	CK MB (%)	CK BB (%)
Jouppila et al. (1978)	92.9	1.4	5.5
Sutton et al (1981)	80	2	18
Jedeikin et al (1982)	90	< 5	5 – 10
Massey et al. (1982)	70-90	6.5-7	7.5-11
Abe et al. (1992)	86.7 (+/-6.2)	5.1 (+/-2.6)	8.1 (+/-5.4)
Amato et al (1992)	90	0	4
Fonseca et al. (1995)	48-55	37-43	< 5

Tableau VII : Répartition des isoenzymes CK dans le sang de cordon à la délivrance de nouveaux nés à terme en bonne santé (% de l'activité CK totale)

La CK MM est prédominante puisqu'elle représente 80 à 90% de l'activité CK totale (*Jouppila et al, 1978 ; Sutton et al, 1981 ; Jedeikin et al, 1982 ; Massey et al, 1982 ; Abe et al, 1992 ; Amato et al, 1992*) : elle a pour origine le muscle squelettique et son augmentation à la délivrance, avec des valeurs plus élevées en cas d'accouchement par voie basse versus césarienne, est le reflet du traumatisme musculaire de la naissance. Seul Fonseca observe une proportion moindre de CKMM aux environs de 50% (*Fonseca et al, 1995*).

L'isoenzyme CK MB est détectée de façon régulière dans le sang de cordon à la délivrance sauf dans une étude réalisée par Amato qui ne met en évidence cette isoenzyme que dans le sang capillaire prélevé aussi à la délivrance (*Amato et al, 1992*). En 1995, Panteghini a établi des valeurs de références de CK MB mesurées par dosage pondéral dans le sang de cordon de 46 enfants à la naissance (Tableau VIII).

La CK MB augmente en valeur absolue avec l'âge gestationnel mais reste stable en proportion relative, aux alentours de 5% de l'activité CK totale (Panteghini et al, 1995).

Age gestationnel (SA)	26 à 28	29 à 31	32 à 35	A terme
Effectif	8	9	13	14
CKMB (µg/L)	6 +/-4	8,1+/-6,6	12,5 +/-9,6	14,1+/-6,5
CKMB (% d'activité)	4,7 +/-2,5	5,2 +/- 3,1	5 +/-2,3	4,2 +/-1,5

Tableau VIII : Valeurs de référence de la CKMB en néonatalogie (dosage pondéral)
(d'après Panteghini et al, 1995)

La proportion de CK MB mesurée dans le sang de cordon est légèrement supérieure à celle observée dans le sérum d'un adulte sain ; elle est de surcroît plus élevée en cas d'accouchement par voie basse que par césarienne (Jedeikin et al, 1982). D'après une étude réalisée par Almeida et al, la valeur absolue de CKMB mesurée dans le sang de nouveaux nés à terme sains, décroît de presque moitié après 24 heures de vie. (81,5 à 52,0 UI/L) (Almeida et al, 2011).

L'origine de la CK MB n'est pas clairement définie. Jedeikin avance l'hypothèse d'une nécrose myocardique minime qui se produirait à la naissance lors de la transition de la circulation foetale à la circulation générale, entraînant une libération de CK MB à partir des cellules myocardiques lésées (Jedeikin et al, 1982). Cependant, il est plus vraisemblable que l'augmentation de la fraction CK MB après la délivrance provienne du muscle squelettique du nouveau né que du myocarde (Schmidt et al, 1979). En effet, la composition en isoenzymes CK du muscle squelettique foetal et néonatal diffère de celle d'un adulte par sa grande richesse en isoenzyme CK MB (Cf paragraphe C.3). De ce fait, de par son manque de spécificité, la mesure de la CKMB n'est pas reconnue comme un indicateur fiable d'une lésion myocardique durant la période néonatale (Schmidt et al, 1979 ; Almeida et al, 2011).

La plupart des auteurs détectent la présence de **l'isoenzyme CK BB** dans le sang de cordon prélevé à la délivrance chez des nouveaux nés à terme en bonne santé en l'absence de toute situation d'asphyxie périnatale (Gilboa & Swanson, 1976 ; Bayer et al, 1977 ; Cuestas et al, 1980 ; Sutton et al, 1981 ; Jedeikin et al, 1982 ; Massey et al, 1982 ; Urdal et al, 1982). La

proportion relative est variable selon les études (Tableau VII). Seuls Chopin et Becker ne retrouvent pas de CKBB chez les nouveaux nés sains mais seulement chez les nouveaux nés avec souffrance cérébrale (*Becker & Menzel, 1978 ; Chopin et al, 1980*).

La valeur de CK BB dans le sang de cordon est plus élevée que dans le sang maternel (environ le double d'après Cuestas), elle augmente immédiatement après la délivrance atteignant un maximum après 5 à 10 heures de vie puis diminue très rapidement, devenant indétectable au delà de 24 heures de vie (*Cuestas et al, 1980 ; Sutton et al, 1981 ; Jedeikin et al, 1982 ; Walsh et al, 1982 ; Amato et al, 1992*). Chopin insiste d'ailleurs sur l'importance de respecter scrupuleusement les conditions de prélèvement qui doit être le plus précoce possible par rapport à la naissance (avec le risque de faux négatif en cas de prélèvement trop tardif) et les conditions de conservation en raison de l'extrême labilité de cette isoenzyme (*Chopin et al, 1980*). Si sa présence est encore décelée au bout de 8 jours à -20°C , elle disparaît en 48 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ et en 3 heures à 37°C .

La CKBB a donc une cinétique beaucoup plus rapide que les autres isoenzymes MM et MB qui augmentent après la naissance, atteignent un plateau en 12 à 48 heures puis diminuent.

Il n'y a pas de différence de concentration CK BB selon le sexe de l'enfant (*Jung et al, 1979 ; Steirteghem et al, 1979*).

Jedeikin et Ezitis ne mettent pas en évidence de différence significative selon le mode de délivrance que ce soit dans le sang de cordon à la délivrance ou à 24 h (*Jedeikin et al, 1982 ; Ezitis et al, 1987*). Par contre, dans l'étude de Liras, la valeur de CK BB mesurée dans le sang de cordon à la délivrance est plus élevée en cas d'accouchement par voie basse que par césarienne (*Liras et al, 1988*).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la présence de CK BB dans le sang de cordon. Au moins une partie est d'origine maternelle par libération à partir du placenta et du myomètre. L'essentiel est d'origine foetale, en particulier cérébrale : l'immaturation physiologique de la barrière hémato-encéphalique chez le nouveau né explique le passage dans la circulation sanguine de la CK BB, en l'absence de toute souffrance cérébrale néonatale.

D'autres tissus foetaux peuvent contribuer à la présence de CK BB dans le sang de cordon, tels que le tractus gastro-intestinal et le muscle squelettique en raison de son profil d'isoenzymes particulier à cet âge. Enfin, Kumpel met en garde contre une élévation artéfactuelle de CK BB dans le sang de cordon secondaire à des lésions de la paroi des vaisseaux ombilicaux induites par la technique de prélèvement car il a été montré que les parois de l'artère et de la veine ombilicale contiennent une forte activité enzymatique CKBB (*Kumpel et al, 1983*). L'augmentation de la CK BB dans le sang de cordon doit donc être interprétée avec prudence.

8. Variations pathologiques de la CK

(Nanji, 1983 ; Doré, 1994 ; Bugugnani, 2002 ; Laraki, 2006)

8.1. Chez l'adulte

L'élévation du taux de créatine kinase traduit une souffrance cellulaire avec lésion de la membrane cytoplasmique qui libère l'enzyme dans la circulation. L'intérêt du dosage des CPK réside essentiellement dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde et des pathologies musculaires.

Syndromes Coronariens Aigus

Une ischémie aigüe avec nécrose du myocarde provoque une élévation de la CK, essentiellement constituée des isoenzymes MM et MB, ces dernières étant plus spécifiques de la nécrose myocardique. La concentration de CK totale commence à s'élever entre 3 et 6 h après la douleur, le pic se situe entre 22 et 26h, et le retour à la normale se fait en 72h environ. La concentration peut être multipliée par 10 ou 20, corrélée à la masse de tissu nécrosé *(Grande et al, 1982)*.

Lors d'un infarctus sans onde Q et dans l'angor instable, la concentration de CK totale peut rester normale, surtout si la concentration basale du patient est basse en raison d'une masse musculaire faible *(Rosalski, 1998)*.

Les dosages de CK MB et des isoformes de la CK sont utilisés en raison de leur meilleure spécificité cardiaque, pour le diagnostic d'un infarctus du myocarde ou le suivi de la reperfusion. Un taux de CK MB supérieur à 24 UI/L avec un rapport CKMB /CK totale supérieur à 6% est en faveur d'un IDM. La concentration de CK MB augmente dans les 3 à 6 heures qui suivent le début d'un IDM, parallèlement à celle de la CK totale avec un pic vers 20 heures et un retour à la normale en 72 heures environ. Cette cinétique est raccourcie en cas de thrombolyse réussie *(Grande et al, 1991)*. L'activité CK MB est plus sensible que la concentration de CK totale ; une concentration massique de CK MB supérieure à 2 µg/L permet de repérer un syndrome coronarien aigu avec ou sans onde Q *(Bugugnani & Dehlinger, 1990)*.

Après une chirurgie cardiaque, la CKMB est naturellement déversée dans la circulation, ce qui rend difficile le diagnostic d'IDM dans les 48h post-opératoires.

D'autres causes cardiaques d'élévation des CK MB sont rapportées : myocardite, tachycardie supraventriculaire prolongée, cardioversion.

Cependant, la spécificité cardiaque de la CK MB, nettement meilleure que celle de la CK totale, n'est pas parfaite, la CK MB pouvant aussi être augmentée dans des pathologies musculaires.

Une meilleure spécificité semble être apportée par le dosage des isoformes des isoenzymes, particulièrement les rapports MM3/MM1 et MB2/MB1 qui s'élèvent 1 à 2 heures après la douleur, donc plus précocément que la CKMB (Jaffé et al, 1986 ; Yang et al, 1993). Le rapport MB2/MB1 est habituellement inférieur à 1 dans le sérum d'un sujet sain. Dans l'IDM, l'élévation maximale de ce rapport précède de 6 heures le pic sérique de la mesure pondérale de CK MB (Lavoine et al, 1997). Un rapport supérieur à 1,5 semble avoir une bonne sensibilité diagnostique dans les 6 premières heures de l'IDM (Laurino et al, 1996). Le rapport diminue ensuite progressivement pour atteindre 1 vers la douzième heure et 0,1 vers la 32^{ème} heure (Puelo et al, 1994) et le retour à la normale se fait rapidement en 48 heures. Cependant, on observe aussi des résultats faussement positifs en cas de traumatismes des muscles squelettiques ou de myopathies (Wu, 1992).

Pathologies musculaires

L'activité CK totale augmente dans de nombreuses conditions associées à un traumatisme du muscle squelettique, avec prédominance de l'isoenzyme CK MM.

Une augmentation transitoire est observée en cas d'injections intramusculaires, de biopsie musculaire, d'actes chirurgicaux, d'exercice physique soutenu.

L'activité CK est bien sûr augmentée en cas de rhabdomyolyse qu'elle soit d'origine traumatique (écrasement musculaire, compression vasculaire, brûlure, immobilité prolongée, convulsions), toxique (alcool, amphétamines, cocaïne, ecstasy..), métabolique ((hypokaliémie, hypocalcémie, hypophosphorémie), infectieuse (bactérienne ou virale) ou médicamenteuse (hyperthermie maligne per-anesthésique, syndrome malin des neuroleptiques, hypolipémiants).

Dans les dystrophies musculaires, on observe d'importantes élévations du taux de CK sérique. Dans la myopathie de Duchenne, les taux usuels sont multipliés par 10 à 100 surtout au stade précoce de la maladie, avec une nette prédominance de la fraction CK MM. L'activité CK diminue ensuite progressivement avec la diminution de la masse musculaire. Par ailleurs les femmes hétérozygotes porteuses de la maladie présentent également une hyperactivité sérique (d'une valeur comprise entre 3 et 6 fois le taux de base) dans 50 à 80% des cas (à la différence des autres enzymes musculaires : LDH,

aldolase dont l'activité sérique est normale) (Doré, 1994). Le dépistage d'un foetus porteur de la myopathie de Duchenne par dosage de l'activité CK dans le sang foetal est actuellement dépassé en performance par la recherche génétique.

Les myopathies mitochondriales entraînent une élévation habituellement modérée des CPK.

Par ailleurs, on observe une augmentation des CPK dans les polymyosites, les dermatomyosites et les myosites à inclusion. Le taux habituellement de l'ordre de 10 fois la normale, peut parfois dépasser 100 fois la limite supérieure. Il est en général bien corrélé à l'activité de la maladie.

A noter que dans les dystrophies musculaires (Sommer & Dubowitz, 1976 ; Takahashi et al, 1977) et les myopathies inflammatoires ainsi que chez les marathoniens (Siegel, 1983 ; Apple, 1984), on peut observer une augmentation de la proportion de l'isoenzyme CK MB qui provient des fibres musculaires squelettiques immatures ou régénératives (réexpression dans le muscle du gène codant la sous-unité B).

Autres pathologies

La concentration de CK BB s'élève au cours d'affections du système nerveux central avec rupture de la barrière hémato-méningée (méningites, traumatismes crâniens) ou de lésions cérébrales d'origine hypoxique.

Plusieurs publications rapportent une élévation de la CK BB au cours de certaines pathologies cancéreuses : neuroblastome, cancer du poumon à petites cellules, cancer de la prostate, de la vessie, adénocarcinomes (sein, estomac, intestin), cancer du colon métastatique.

Il a été aussi mis en évidence une augmentation de la CK BB au cours de l'insuffisance rénale (Weseley et al, 1977).

8.2. Chez le foetus

8.2.1. Activité CK, isoenzymes : retard de croissance et souffrance foetale

Il existe une corrélation positive entre l'activité CK totale mesurée dans le sang de cordon à la délivrance et le poids de naissance (Chemnitz et al, 1979 ; Abe et al, 1992) ; Chemnitz a ainsi montré que les nouveaux nés à terme ayant un poids inférieur à 2500 g

avaient un taux de CK totale significativement plus bas que les nouveaux nés de plus de 3000 g.

Chez les enfants prématurés et ceux souffrant de retard de croissance intra utérin, il a aussi été mis en évidence un taux plus faible de CK totale et de CK MM (Chemnitz et al, 1979 ; Abe et al, 1992) associé à une proportion plus élevée de CK BB (Chemnitz et al, 1979) dans le sang de cordon ombilical à la délivrance par rapport à un enfant de maturité normale. Les valeurs de CK et CK MM sont à relier à la masse musculaire plus faible de ces enfants.

Le taux de CK totale et de CKMM dans le sang de cordon à la naissance est corrélé au score d'Apgar (Tableau IX). Plus le score d'Apgar est bas, plus les taux de CK totale et de CK MM sont faibles (Abe et al, 1992). Chemnitz a de plus montré une augmentation de la proportion de CK BB chez ces enfants à haut risque avec faible score d'Apgar (inférieur à 7) (Chemnitz et al, 1979).

Score d'Apgar	0-3	4 - 6	7 - 10
CK (UI/L)	104 +/-63	172 +/-74	208 +/-104
CKMM (UI/L)	92 +/-55	145 +/-73	183 +/-92

Tableau IX: Corrélation entre le score d'Apgar et l'activité CK totale et CK MM dans le sang de cordon à la naissance (d'après Abe, 1992)

L'activité CK totale et les isoenzymes en particulier la CKBB apparaissent donc comme de bons indicateurs du degré de maturité de l'enfant (Chemnitz et al, 1979 ; Abe et al, 1992).

Sammour a montré que l'activité CK totale dans le sang de cordon à la délivrance (accouchement par voie basse) augmente significativement en cas de pré-éclampsie modérée ou sévère (Sammour et al, 1974).

8.2.2. Isoenzyme CKMB et atteinte cardiaque

L'intérêt de l'isoenzyme CK MB comme indicateur de lésions cardiaques chez le nouveau né est diversement apprécié selon les auteurs. En effet, Nelson et al. ont décrit une augmentation de la CK MB chez 10 enfants souffrant d'insuffisance tricuspide avec des valeurs significativement différentes de celles des enfants sains (Nelson et al, 1978). A l'inverse, dans l'étude de Sutton incluant 10 nouveaux nés à terme avec cardiopathie, seuls 3 d'entre eux (souffrant respectivement d'une persistance de la circulation foetale, d'une atrésie de l'artère pulmonaire et d'une trisomie 18 avec anomalies cardiaques complexes et insuffisance ventriculaire gauche) ont présenté une augmentation significative de l'activité CK totale (respectivement 1 220 UI/L ; 720 UI/L et 3 000 UI/L) due à une augmentation de l'isoenzyme CK MM (représentant 98% ; 92% et 100% de l'activité CK totale) contrastant avec des valeurs de CK MB (respectivement 2% ; 4% et 0%) et CK BB identiques à celles des nouveaux nés en bonne santé (Sutton et al, 1981). Sutton suggère donc de ne pas interpréter les taux de CK et CKMB isolément chez les nouveaux nés dans le cas de pathologies cardiaques néonatales.

Schmidt et Almeida considèrent d'ailleurs que la mesure de la CK MB n'est pas un indicateur fiable de lésions myocardiques durant la période néonatale en raison de son origine à la fois cardiaque et musculaire à cet âge (Schmidt, 1979 ; Almeida, 2011).

8.2.3. Isoenzyme CKBB et souffrance cérébrale

L'isoenzyme CK BB apparaît dans la littérature comme un bon marqueur de lésions cérébrales chez les nouveaux nés.

Shields a ainsi montré une augmentation de la fraction CK BB chez les prématurés souffrant d'hémorragie périventriculaire, ce qui peut s'expliquer par la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Shields et al, 1982).

D'autre part, plusieurs équipes ont mis en évidence chez des nouveaux nés à terme, une augmentation significative de la CK BB dans le sang de cordon à la délivrance en cas de souffrance foetale et néonatale hypoxique, conduisant à une souffrance cérébrale sévère avec nécrose cellulaire et libération de l'isoenzyme (Becker & Menzel, 1978 ; Lavaud et al, 1979 ; Chopin et al, 1980 ; Cuestas et al, 1980 ; Niklinski et al, 1987 ; Fonseca et al, 1995). Cuestas a montré qu'une activité CK BB supérieure à 35 UI/L était associée à un taux de mortalité élevé (83%) (Cuestas et al, 1980).

Des corrélations entre l'activité CK BB mesurée à la naissance et l'existence de séquelles neurologiques secondaires à l'hypoxie néonatale ont été rapportées (Lavaud et al,

1979, Walsh et al, 1982 ; Fonseca et al, 1995). Walsh a montré que l'activité CK BB était un facteur prédictif du devenir neurologique à 7 mois chez 77% des 22 enfants nés à terme sévèrement hypoxiques. Par contre pour Ruth et al., l'activité CK BB mesurée en moyenne 10 h après la délivrance ne peut être utilisée comme facteur pronostique à long terme : l'augmentation de CK BB est prédictive du risque de décès néonatal mais pas des séquelles neurologiques chez les survivants (Ruth, 1989).

Chopin souligne que la souffrance cérébrale doit être suffisamment grave pour entraîner une destruction cellulaire : ainsi il ne note pas d'augmentation de la CK BB sérique chez les nouveaux nés souffrant d'hypoxie cérébrale au cours de détresses respiratoires isolées, ni en cas de survenue de convulsions isolées et rapidement contrôlées, ni en cas d'existence d'une irritation cérébrale au cours d'une méningite (Chopin et al, 1980).

Une augmentation de la CK BB a aussi été mise en évidence dans le sang de cordon de nouveaux nés avec souffrance foetale chronique liée à une insuffisance placentaire (Niklinski et al, 1987).

Par contre, il n'a pas été observé d'augmentation des isoenzymes dont la CK BB dans le sérum de nouveau nés souffrant d'entérocolite nécrosante, de pathologies pulmonaires ni rénales (Cuestas et al, 1980).

9. Fréquence et signification clinique des macroCK de type 1 et 2

9.1. Chez l'adulte

MacroCK de type 1

La prévalence de la macroCK de type 1 dans la population adulte est faible et varie selon les études de 0,23% à 4,3% (Ljundjahl et al, 1978 ; Urdal & Landaas, 1979 ; Sax & Moore, 1979 ; Yuu et al, 1980 ; Bohner et al, 1982 ; Wu & Bowers, 1982 ; Stein et al, 1982 ; Tozawa, 1989, Sturk & Sanders, 1990 ; Laureys et al, 1991, Lee et al, 1994 ; Fahie-Wilson et al, 2007). Elle dépend de la méthode de détection et des caractéristiques de la population étudiée (âge, sexe, pathologies) (Tableau X). Ainsi, elle est plus fréquemment mise en évidence chez la femme et sa prévalence augmente avec l'âge (Tozawa, 1989) ; elle est plus fréquemment retrouvée après 50 ans et en particulier après 70 ans (Bohner et al, 1982 ; Remaley & Wilding, 1989 ; Sturk & Sanders, 1990 ; Laureys et al, 1991 ; Lee et al, 1994)

Etude	Année	Effectif	Caractéristiques de la population	Fréquence macroCK type1 (%)	Fréquence macroCK type 2 (%)
<i>Ljungdahl et al.</i>	1978	800	patients hospitalisés	1	0
<i>James et Harrison</i>	1979	538	patients hospitalisés (soins intensifs)	/	2,6
<i>Sax et Moore</i>	1979	6100	patients hospitalisés	1	/
<i>Urdal et Landaas</i>	1979	310	patients hospitalisés	1,6	/
<i>Yuu et al.</i>	1980	356	patients hospitalisés	0,8	0
<i>Bayer et al.</i>	1982	1191	patients hospitalisés	1,09	1,34
<i>Bohner et al.</i>	1982	1253	patients hospitalisés (service de médecine interne)	1,2	1,7
<i>Stein et al.</i>	1982	2018	patients hospitalisés	1,9	/
<i>Wu et Bowers</i>	1982	5000	patients hospitalisés	0,9	0,5
<i>Whelan et Malkus</i>	1983	78	volontaires sains	3,8	0
<i>Stein et al.</i>	1985	2018	patients hospitalisés (service de médecine interne)	/	3,7
<i>Delanghe et al.</i>	1986	3000	patients hospitalisés	4,3	/
<i>Tozawa et al.</i>	1989	42 068	population non sélectionnée	0,18 à 0,61	
		10 020	donneurs de sang	0,03 à 0,23	
<i>Laureys et al.</i>	1991	8080	patients ambulatoires et hospitalisés	0,61	/
<i>Lee et al.</i>	1994	8322	patients ambulatoires (73%) et hospitalisés (27%)	0,43	1,2
<i>Fahie Wilson et al.</i>	2007	368	patients hospitalisés avec activité CK totale sérique augmentée	2	/

Tableau X : Prévalence des macroCK de type 1 et 2 dans la population adulte

La présence de macroCK de type 1 ne semble pas corrélée à une pathologie particulière. Néanmoins des associations avec certaines infections respiratoires (*Sax & Moore, 1979* ; *Wu & Bowers, 1982* ; *Wu et al, 1983*), avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (*Sax & Moore, 1979* ; *Wu & Bowers, 1982* ; *Stein et al, 1982* ; *Tozawa, 1989*), avec des maladies autoimmunes (*Stein et al, 1982* ; *Tozawa, 1989* ; *Laureys et al, 1991* ; *Lee et al, 1994*) en particulier pour les complexes CK -IgG ou certaines pathologies cardiovasculaires (*Massey & Goe, 1984* ; *Delanghe et al, 1986* ; *Tozawa, 1989* ; *Laureys et al, 1991* ; *Lee et al, 1994*) ont été décrites.

Dans l'étude de Delanghe incluant 556 patients souffrant d'ischémie myocardique, une macro CK de type 1 a été détectée chez 13,8% d'entre eux ; il s'agissait d'un complexe

CK BB-IgG, l'isoenzyme CK BB provenant au moins en partie des parois vasculaires d'après les auteurs (*Delanghe et al, 1986*).

Dans une autre étude (*Massey & Goe, 1984*), le complexe CK BB-IgG a été détecté transitoirement dans le sérum de trois patients après arrêt cardiaque ou respiratoire, associé à la disparition de la CK BB initialement présente, ce qui corrobore l'hypothèse de Prabahkaran à savoir que la liaison d'une immunoglobuline à la CK BB constitue une voie de catabolisme intravasculaire de l'isoenzyme (*Prabahkaran et al, 1979*).

D'autre part la présence de macroCK 1 a aussi été rapportée chez des patients atteints de myosites quelle qu'en soit l'étiologie (autoimmune, toxique, métabolique) (*Lee et al, 1994 ; Hoshino et al, 1995 ; Hsia et al, 2008*). Dans l'étude de Lee, une myosite était diagnostiquée chez plus de 50% des patients avec macroCK de type 1 (*1994*). Dans l'étude de Hsia, parmi les 16 patients chez lesquels une détection persistante de macroCK1 a été mise en évidence, 14 étaient atteints d'une myopathie (5 myopathies de Duchenne, 3 dystrophies musculaires, 3 polymyosites, 1 dermatomyosite, une myosite associée à une intoxication aux métaux, une myopathie sans précision étiologique) : les auteurs avancent l'hypothèse que la créatine kinase deviendrait antigénique après destruction cellulaire et libération dans le milieu environnant. La présence de macroCK de type 1 serait ainsi la conséquence de lésions musculaires et éventuellement un marqueur de myopathies (*Hsiao et al, 2008*).

D'après l'étude de Lee, la mise en évidence de macro CK1 dans le sérum ne semble pas être un élément de mauvais pronostic (*Lee et al, 1994*).

Enfin la présence de macro CK de type 1 a même été décrite chez des sujets en bonne santé (*Whelan & Malkus, 1983*).

MacroCK de type 2

La prévalence de la macroCK de type 2 chez les patients hospitalisés est faible et varie selon les études (tableau X) : elle est estimée entre 0,5 et 2,6% dans l'étude de Sturk (*Sturk & Sanders, 1990*) et à 3,7% dans l'étude rétrospective de Stein (*Stein et al, 1985c*). Dans une étude incluant 8322 patients dont trois quarts de patients ambulatoires, Lee trouve une prévalence de 1.2% (*Lee et al, 1994*).

La macro CK de type 2 est majoritairement retrouvée chez les patients souffrant de pathologies sévères sans influence de l'âge ni du sexe (*Stein et al, 1985c ; Sturk & Sanders, 1990 ; Lee et al, 1994*) contrairement à ce qui est décrit pour la macroCK de type 1.

Paradoxalement, malgré son poids moléculaire élevé responsable d'une diminution de la clairance, la présence de macroCK de type 2 n'entraîne pas, dans la majorité des cas, d'augmentation de l'activité CK totale (*Kanemitsu et al, 1984 ; Stein et al, 1985c ; Lee et al, 1994*) ; tout au plus, il est mis en évidence dans les cas restants une élévation modérée. Par exemple, dans l'étude de Lee, 72% des patients avec macro CK de type 2 présentent une activité CK totale inférieure à 100 UI/L alors que celle –ci est supérieure à 500 UI/L chez 64% des patients avec présence de macroCK de type 1 (*Lee et al, 1994*).

La macro CK de type 2 est un polymère de CK mitochondriale qui serait libéré dans le sang après rupture de la membrane mitochondriale lors d'un remaniement cellulaire important entraînant de multiples destructions tissulaires. Chez l'adulte, cette macroCK se rencontre chez les patients atteints de cancers métastasés ou non (sein, côlon, poumon, estomac, prostate, foie) (*Heinz et al, 1980 ; Miyaki et al, 1980 ; Liu et al, 1980 ; Wu & Bowers, 1982 ; Stein et al, 1985c ; Rogalsky, 1985 ; Okano et al, 1987 ; Mercer & Talamo, 1985 ; Lee, 1994*). Cependant, elle n'est pas obligatoirement synonyme d'un décès imminent (*Stein et al, 1985c ; Lee et al, 1994*). La CK mitochondriale provient probablement directement du tissu néoplasique primitif ou métastatique. Cette supposition est fondée sur les résultats de plusieurs observations qui ont montré que la CK mitochondriale avait les mêmes caractéristiques électrophorétiques et physico-chimiques dans le sang et dans la tumeur ou dans les métastases (lors de cancers du sein ou de la prostate) (*Okano et al, 1987*). En général, la découverte d'une macroCK de type mitochondrial dans un contexte néoplasique est de mauvais pronostic (*Bark, 1980 ; Grobbel et al, 1982*). Cela suggère soit que la tumeur primitive est mal contrôlée soit qu'il existe une dissémination métastatique (*Okan et alo, 1987 ; Nakagawa, 1982 ; Bonnet et al, 2001*). Certains auteurs ont d'ailleurs proposé d'utiliser cette macroCK comme un marqueur tumoral spécifique (*Liu et al, 1980 ; Kanemitsu et al, 1984*), en particulier pour le cancer colorectal (*Galasso et al, 1983 ; Mercer & Talamo, 1985*).

On peut également observer la présence de macroCK de type 2 chez des patients atteints de cirrhoses hépatiques décompensées : cette étiologie représente 16% des patients dans l'étude de Stein (*Stein et al, 1985c*). La macroCK est probablement relarguée dans la circulation à partir des hépatocytes (riches en CK mitochondriale) au cours du processus de nécrose et de régénération cellulaire (*Kanemitsu et al, 1982a*).

La présence de macroCK de type 2 a été détectée dans le sérum de patients atteints d'infarctus du myocarde (*James & Harrison, 1979 ; Stein et al, 1985c*) : la CK mitochondriale serait libérée suite à une nécrose myocardique importante (*Somer, 1974*) et serait chez l'adulte un facteur de mauvais pronostic (*James & Harrison, 1979*). James et Harrison ont

mis en évidence une macroCK de type 2 chez 14 malades sur 538 étudiées dans l'unité de soins intensifs de cardiologie de leur hôpital ; parmi ces 14 patients, 10 sont décédés durant leur séjour.

Certaines études ont montré des fluctuations de l'activité macro CK de type 2 mesurée dans le sérum en fonction de l'évolution de la pathologie sous-jacente : ainsi des cas ont été rapportés de disparition de la macro CK en cas d'amélioration de la maladie associée (*Stein et al, 1985c*). La présence de macro CK de type 2 est donc chez l'adulte un indice de gravité mais pas obligatoirement un signe de décès imminent (*Stein et al, 1985c ; Lee et al, 1994*).

De façon plus anecdotique, une publication rapporte la présence de macro CK de type 2 au cours d'un syndrome de Reye (*Rock et al, 1975*) et une autre chez des patients ayant bénéficié d'un traitement par théophylline (*Delahunty, 1983*).

9.2. Chez l'enfant

Très peu d'études ont été réalisées concernant la présence de macro CK chez les enfants. La signification clinique est différente chez les enfants et les adultes.

MacroCK de type 1

La présence de macroCK de type 1 est associée à une souffrance néonatale hypoxique sévère (*Ludvigsen et al, 1986 ; Kanemitsu, 1986a*). Ludvigsen rapporte les cas de 7 nouveaux-nés souffrant d'hypoxie sévère comme en témoigne le faible score d'Apgar (inférieur à 3 à 1 minute et inférieur à 5 à 5 minutes) pour lesquels une macroCK de type 1 a été détectée ; 3 sont décédés rapidement après la naissance. L'activité CK totale moyenne était de 773UI/L et la macro CK représentait de 5,3 à 38,6% de l'activité totale.

Kanemitsu a mis en évidence la présence de complexe CK BB-IgG dans le sérum de 5 des 200 nouveaux nés étudiés avec asphyxie. La liaison d'une IgG avec la CK BB serait une voie de dégradation intravasculaire de cette isoenzyme dont l'augmentation significative dans le sang de nouveaux nés hypoxiques avec lésions cérébrales a été rapportée dans plusieurs publications.

Les résultats obtenus par Ludvigsen et Kanemitsu confortent cette hypothèse déjà avancée par Prabhakaran. En effet, Ludvigsen met en évidence la présence de macro CK de type 1 chez 4 des 7 nouveaux nés entre le 3^{ème} et le 20^{ème} jour après l'évènement hypoxique ce qui laisse penser que l'apparition de la macro CK est un phénomène tardif potentiellement associé au catabolisme de la CK BB. De la même façon, dans l'étude de Kanemitsu, les

complexes CK BB IgG n'apparaissent que pour des activités élevées de CK BB supérieures à 200 UI/L dans les 48 heures après la délivrance.

D'autre part, Bayer a mis en évidence la présence de macro CK de type 1 (complexe CK -IgG) chez 3 membres d'une même famille, la mère et deux de ses trois enfants âgés respectivement de 20 jours et de 2 mois au moment de la découverte, sans notion d'hypoxie néonatale. La décroissance régulière de la macro CK dans le sérum des 2 enfants ainsi que l'absence de détection chez le père et l'autre soeur (âgée de 5 ans) sont en faveur du passage transplacentaire des IgG maternelles qui seraient impliquées dans la formation du complexe CK -IgG chez le fœtus (*Bayer, 1982b*).

MacroCK de type 2

Dans son étude pédiatrique, Wu a mis en évidence une macro CK de type 2 chez 4 des 5 enfants qui présentaient une atteinte du muscle cardiaque (myocardite, insuffisance cardiaque congestive, cardiomyopathie) mais pas chez les 16 nouveaux nés et enfants souffrant de cardiopathies congénitales ou d'atteintes des gros vaisseaux (coarctation de l'aorte, sténose pulmonaire, transposition des gros vaisseaux, tétralogie de Fallot) (*Wu et al, 1983*).

Rizotti rapporte aussi le cas de deux enfants âgés de 2 mois souffrant pour l'un d'une myocardite virale et pour l'autre d'une cardiomyopathie avec hypertrophie ventriculaire droite chez lesquels il détecte une macroCK de type 2 (*Rizotti et al, 1985*). Ces constatations suggèrent que les polymères de CK mitochondriale pourraient être un marqueur de lésions myocardiques chez les enfants. Cependant, leur détection ne serait pas un facteur d'aussi mauvais pronostic que chez l'adulte et l'atteinte cardiaque pourrait être réversible en particulier en cas de décroissance de la CK atypique (*Wu et al, 1983 ; Rizotti et al, 1985*).

Enfin, comme pour la macro CK de type 1, la détection de macroCK de type 2 a été observée dans des cas de souffrance néonatale hypoxique ou d'accouchement traumatique (*Kuint et al, 1993*) : une macro CK de type 2 représentant 15 à 25% de l'activité CK totale a ainsi été mise en évidence chez 7 nouveaux nés, avec disparition de celle-ci dans les 48-72 heures. Une observation similaire a été rapportée chez des rats hypoxiques (*Hayashi & Tanaka, 1985*). La présence de cette macro CK ne semble pas être corrélée à des séquelles neurologiques à long terme (*Kuint et al, 1993*).

PRESENTATION DE L'ETUDE

A. MATERIEL ET METHODES

1. Population

Notre étude porte sur une cohorte de 116 fœtus. Les femmes enceintes avaient été adressées à la Maternité Régionale Universitaire de Nancy entre le 01 /01/ 2008 et le 31/12/2011 pour avis sur l'évolution de la grossesse en cours et le pronostic foetal devant la suspicion ou la constatation avérée de pathologies foetales d'une gravité particulière (RPM précoces, RCIU sévères, malformations, anomalies chromosomiques, allo-immunisations, infections materno-foetales, ...).

L'ensemble des dossiers a été étudié par le Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN). Les CPDPN ont été institués par la Loi de Bioéthique de 1994.

Un seul fœtus souffrant d'une allo-immunisation foetomaternelle sévère a bénéficié d'une exsanguinotransfusion avec issue favorable.

Dans tous les autres cas une interruption médicale de grossesse (IMG) au motif foetal a été décidée en accord avec les parents, selon l'article L 2213-1 du Code de la Santé Publique autorisant l'IMG lorsqu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic.

Les pathologies foetales ont été classées en 11 groupes définis par l'Agence de la BioMédecine (tableau XI).

Code	Descriptif
1	pathologies infectieuses
2	anomalies du tube digestif
3	anomalies de l'appareil urinaire
4	anomalies du SNC
5	anomalies de l'appareil cardiovasculaire
6	alloimmunisation foetomaternelle
7	polymalformations
8	RCIU
9	anomalies de l'appareil pulmonaire
10	anomalies chromosomiques
11	autres

Tableau XI : Classification des pathologies foetales selon les codes définis par l'Agence de la Biomédecine

2. Prélèvements

Le prélèvement de sang foetal est réalisé juste avant l'embolisation par prélèvement à l'aiguille directement en intracardiaque après repérage échographique. Plusieurs millilitres de sang (3 à 6 mL) sont prélevés dans une seringue sèche et répartis dans différents tubes de prélèvements (tubes secs sans anticoagulant, tubes avec héparinate de lithium, tubes avec EDTA) en fonction des analyses biologiques souhaitées. Le foeticide est ensuite effectué par injection intracardiaque d'un anesthésique central (Alfentanyl Rapifen®) permettant d'obtenir une sédation du foetus suivie d'une injection de Xylocaïne 2% provoquant l'arrêt cardiaque. L'expulsion par voie basse du foetus mort-né est déclenchée par l'administration chez la mère de Myféquine® et de Cytotec®.

Dans le cas de l'allo-immunisation, le sang foetal a été obtenu par cordocentèse au niveau de la veine ombilicale.

Pour l'étude biochimique d'un prélèvement foetal, deux microtubes secs d'une contenance de 1 mL de sang sont rapidement acheminés à température ambiante au laboratoire de Biochimie Polyvalente et d'Urgences de l'hôpital Central du CHU de Nancy.

Dès réception, les prélèvements sont centrifugés à 3500 tours par minute pendant 10 minutes à température ambiante.

L'aspect du sérum est noté. En cas de prélèvements hémolysés, les analyses sont tout de même réalisées en raison du caractère précieux du prélèvement de sang foetal et de l'impossibilité de demander un nouveau prélèvement. L'hémolyse est signalée sur le compte rendu et prise en compte dans l'interprétation des résultats par le biologiste.

L'absence de contamination par le sang maternel et par le liquide amniotique est assurée par le mode de prélèvement du sang foetal en intracardiaque et au niveau d'une anse libre du cordon pour le seul prélèvement réalisé au niveau de la veine ombilicale.

Le sérum est décanté puis réparti en plusieurs aliquots :

- un aliquot est destiné dès réception des prélèvements à la mesure de différents paramètres biochimiques par les analyseurs Olympus AU640 en particulier l'activité CK totale et l'activité CKMB.
- une fraction du sérum est immédiatement congelée à -20°C et conservée à -20°C jusqu'à la réalisation différée de l'électrophorèse. Cette dernière doit être réalisée au maximum dans les 2 semaines suivant la congélation, conformément aux recommandations du fournisseur Helena Biosciences®.

3. Méthodes de dosage

3.1. Activité créatine kinase totale

Elle est mesurée avec la trousse Olympus CK-NAC (référence OSR6179) par l'analyseur Olympus AU640, BECKMAN COULTER, Brea, USA.

La méthode de dosage est conforme aux recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC), utilisant de la N-acétyl-cystéine (NAC) comme activateur.

Les caractéristiques du dosage sont:

- échantillon : sérum/plasma
- prise d'essai : 3µL
- volume mort : 50µL
- température du milieu réactionnel : 37°C
- mesure de la variation d'absorbance à 340 nm
- limite de détection : 3 UI/L
- zone de linéarité : 10 à 2000 UI/L
- valeurs de référence chez l'adulte sain : < 171 UI/L (homme) et < 145 UI/L (femme)

Le réactif contient un mélange d'AMP et de diadénosine pentaphosphate (DAPP) permettant une inhibition partielle de l'adénylate kinase érythrocytaire libérée lors d'une hémolyse. Le fabricant ne décrit pas d'interférence pour les échantillons ictériques et lipémiques.

3.2. Activité CKMB

Elle est évaluée avec la trousse Olympus CK-MB (référence OSR61155) sur l'analyseur Olympus AU640, BECKMAN COULTER, Brea, USA.

La réaction enzymatique et le mode de dosage sont identiques à la mesure de l'activité CK totale. Seule une étape supplémentaire d'immunoinhibition de la sous-unité M au moyen d'un anticorps monoclonal anti-M précède la mesure de l'activité CK résiduelle. L'activité liée à la fraction BB étant supposée négligeable, l'activité CK résiduelle qui est dosée, est liée à la fraction B de la CK MB et multipliée par 2 pour obtenir le résultat final (Cf Figure 7).

Les caractéristiques du dosage sont:

- échantillon : sérum/plasma
 - prise d'essai : 6 µL
 - volume mort : 50 µL
 - température du milieu réactionnel : 37°C
 - mesure de la variation d'absorbance à 340 nm
 - limite de détection : 5 UI/L
 - zone de linéarité : 10 à 2000 UI/L.
 - valeurs de référence chez l'adulte sain : < 24 UI/L
- (un ratio CK MB /CK totale > 25% fait suspecter la présence d'une macro-CK)

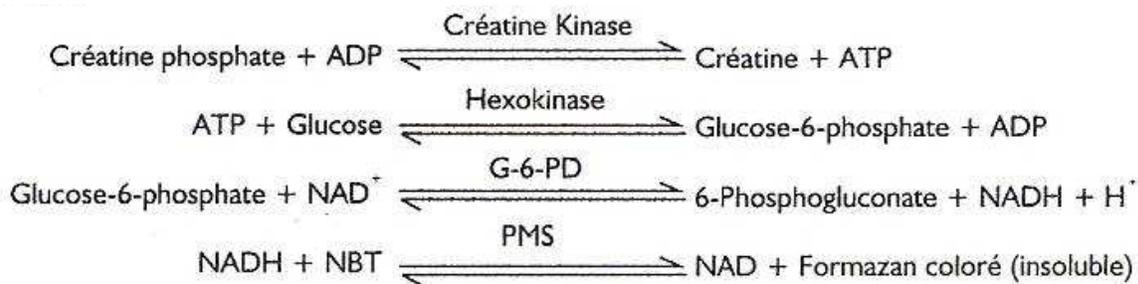
Le réactif contient également un mélange d'AMP et de diadénosine pentaphosphate permettant une inhibition partielle de l'adénylate kinase érythrocytaire. Le fabricant ne décrit pas d'interférence pour les échantillons ictériques et lipémiques.

3.3. *Electrophorèse des isoenzymes CK*

Cette électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose en utilisant le kit SAS-I Isoenzyme CK Vis-12 (référence 201200) commercialisée par la société Helena Biosciences Europe.

Principe

Après activation par du 2-mercapto-éthanol, les isoenzymes CK de l'échantillon sont séparées suivant leur mobilité électrophorétique sur un gel d'agarose en milieu alcalin (tampon barbital) et sont ensuite incubées avec un réactif (révélateur) qui les met en évidence conformément à la série de réactions suivantes :



G-6-PD : Glucose-6-phosphate deshydrogénase

NBT : Nitrobleu de tétrazolium

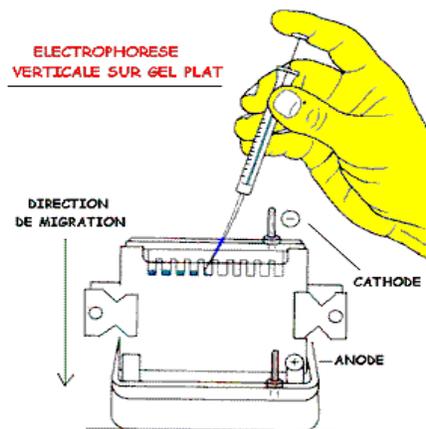
PMS : Phénazine méthosulfate

Dans cette technique, la révélation du NADH+H formé est colorimétrique, basée sur une réaction d'oxydoréduction entre le NADH et le nitrobleu de tétrazolium (NBT) qui est transformé en formazan coloré.

Mode opératoire

Les échantillons sériques sont analysés selon les indications du fournisseur.

Le mode opératoire est résumé dans la figure 10.



- 1) Mélange de 100 μ L de sérum avec 8 μ L d'activateur (2-mercapto-éthanol) pendant 10 min (activation des isoenzymes CK de l'échantillon)
- 2) Distribution manuelle de 30 μ L d'échantillon activé dans chaque puits de la barrette positionnée sur le porte-échantillon
- 3) Dépôt automatisé des échantillons sur le gel d'agarose imbibé d'une solution conductrice (dépôt à la cathode)
- 4) Migration 15 minutes à 100 volts
- 5) Révélation à l'obscurité pendant 35 minutes à 45°C
- 6) Décoloration du gel dans une solution d'acide acétique à 10% pendant 10 minutes puis rinçage à l'eau distillée pendant 30 secondes
- 7) Séchage du gel à l'étuve à 45-50°C pendant 1 heure.
- 8) Lecture du gel par un densitomètre à 590 nm

Figure 10 : Mode opératoire de l'électrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose Helena Biosciences® (technique semi-automatisée)

Un gel comporte 12 pistes de migration. Pour tenir compte de la variabilité analytique, chaque échantillon de patient est analysé comme les contrôles internes par un triple dépôt (chacun nécessitant 30µL de sérum).

Chaque piste de migration est ensuite intégrée par densitométrie à 590 nm et le logiciel Platinum® fourni par Helena Biosciences® permet la visualisation du profil de migration électrophorétique.

La lecture du gel doit être faite dans l'heure suivant la fin du processus.

Les gels sont ensuite conservés à l'abri de la lumière.

Profil électrophorétique

L'échantillon est déposé à la cathode ; à pH alcalin, toutes les protéines ont une charge électrique globale négative et migrent vers l'anode. L'ordre de migration des isoenzymes (de la cathode à l'anode) est schématisé à la figure 11. Le poids moléculaire exprimé en kDa est indiqué entre parenthèses. La mobilité électrophorétique des isoenzymes dépend de leur composition en acides aminés qui détermine la charge électrique globale et non du poids moléculaire.

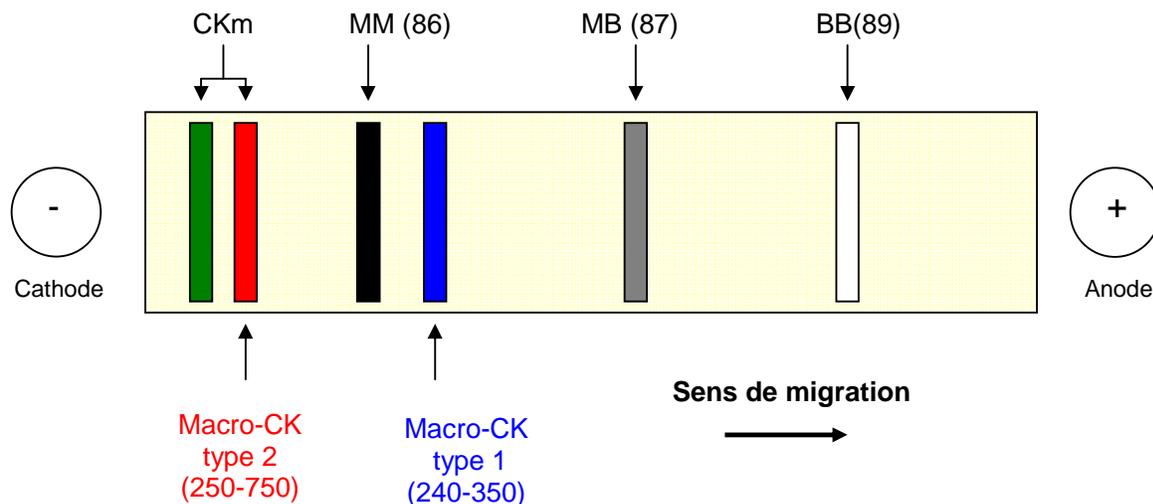


Figure 11 : Migration électrophorétique des isoenzymes CK et des macroCK sur gel d'agarose. (poids moléculaire en kDa)

La CK-BB migre le plus rapidement (zone anodique) et la CK-MM le plus lentement (zone cathodique). La CK-MB migre entre la CK-MM et la CK-BB.

Les bandes atypiques migrant entre la CK-MM et la CK-MB sont attribuées à une macro-CK de type 1. La macro-CK mitochondriale de type 2 migre en position cathodique dans la zone CK-MM.

L'albumine peut laisser une bande visible entre les zones MB et BB sur certains sérums. Il est recommandé de ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, d'autant plus que le réactif ne contient pas d'inhibiteur de l'adénylate kinase érythrocytaire.

La lecture du gel est effectuée par un scanner et un logiciel fourni par Helena (Platinum®). Dans un premier temps, les différentes fractions du profil électrophorétique sont individualisées en positionnant les seuils de séparation entre les pics.

La mobilité respective des pics correspondants aux isoenzymes est ensuite comparée à celle des pics de CKMM, CK MB et CKBB contenus dans le contrôle de qualité.

Enfin, le pourcentage relatif de chaque isoenzyme est évalué par rapport à l'activité CK totale qui est mesurée en parallèle sur l'échantillon. Si le profil comporte un pic correspondant à l'albumine, la surface de celui-ci est soustraite de la surface totale des pics et les pourcentages relatifs des autres fractions correspondant aux isoenzymes CK sont recalculés (% fraction x = surface du pic x / surface totale corrigée).

D'après les indications du fournisseur, la méthode est sensible à partir de 4 UI/L par bande et offre une réponse linéaire pour l'activité CK jusqu'à 1300 UI/L par bande. Les performances en terme de reproductibilité intra et inter-essais annoncées par le fabricant sont indiquées dans le tableau XII :

	Reproductibilité intra-essais (n=8)		Reproductibilité inter-essais (n=4)	
	moyenne (%)	CV (%)	moyenne (%)	CV (%)
CK-MM	68,3	2,9	69,5	6,6
CK-MB	10,3	6,3	10,8	16,4
CK-BB	21,4	7,3	19,7	17,8

Tableau XII : Reproductibilité du dosage des isoenzymes CK par électrophorèse sur gel d'agarose Hélène Biosciences ® (d'après données du fabricant).

Influence de l'hémolyse

En biologie, 3 caractéristiques générales d'un prélèvement de sérum ou de plasma, susceptibles de perturber ou modifier soit la réaction utilisée pour le dosage soit la mesure finale, sont prises en considération : le caractère ictérique, lipémique et hémolysé.

Le fabricant de réactifs ne décrit pas d'interférence pour les échantillons ictériques et lipémiques.

Par contre il est recommandé de ne pas utiliser d'échantillon hémolysé. Cependant il n'est pas toujours aisé de détecter la présence d'hémolyse dans des échantillons de faible volume contenus dans des petits tubes coniques d'une part et de ne pas effectuer l'électrophorèse compte tenu du caractère précieux des prélèvements de sang foetal d'autre part.

Afin de déterminer l'influence potentielle de l'hémolyse, une série d'électrophorèses des isoenzymes CK a été réalisée avec du

- sérum adulte présentant divers degrés d'hémolyse dont l'intensité est estimée visuellement et quantifiée qualitativement par : +, ++, +++
- sang foetal, lors de la réception pour le même foetus L... de 2 échantillons de sérum, l'un hémolysé et l'autre non.

Contrôles de qualité

Un contrôle de qualité est déposé sur chaque gel : il s'agit du contrôle Isoenzyme CK/LDH (référence 5134) commercialisé par Helena Biosciences Europe. Il est préparé à partir d'extraits de tissus murins et de sérum humain additionné de stabilisants. Lyophilisé, il doit être reconstitué avec 2 mL d'eau distillée. Après réhydratation, il est réparti en fractions de 150 µL conservées à - 20°C.

Ce contrôle est destiné à vérifier le déroulement de toutes les phases de l'analyse et le fonctionnement de l'appareil. Il sert de témoin pour l'identification des pics.

Le laboratoire utilise aussi un contrôle interne d'origine humaine qui est un échantillon d'un sérum de patient adulte, repartit en fractions congelées et conservées à -80°C contenant une macro CK de type 1 préalablement caractérisée.

4. Analyse statistique

Le traitement informatique et statistique des données est réalisé avec le logiciel Excel®.

Les variables qualitatives sont exprimées en effectif (n).

Du fait de l'absence de distribution gaussienne pour les variables quantitatives (âge maternel, âge gestationnel, activité CK totale, activité CKMB, pourcentages relatifs des isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB), les résultats sont présentés sous forme de médiane accompagnée des valeurs minimale et maximale de la distribution.

Pour l'analyse comparative, des tests non paramétriques ont été utilisés :

- le test de Mann Whitney pour les paramètres caractérisant les groupes de foetus définis en fonction du sexe, de l'âge de la grossesse au moment de la ponction (2^{ème} trimestre versus 3^{ème} trimestre), de l'absence ou la présence de RCIU, du profil électrophorétique avec et sans macroCK
- le test de Krüskall Wallis pour les paramètres biologiques entre les différents groupes de pathologies
- le test de Wilcoxon pour les pourcentages de CKMB obtenus par technique d'immunoinhibition et par électrophorèse.

Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

La comparaison des méthodes utilisées pour la détermination du pourcentage de CKMB a été réalisée selon la représentation de Bland et Altman.

L'association entre deux variables quantitatives a été étudiée par le test de corrélation linéaire.

B. RESULTATS

1. Analyse des profils électrophorétiques

Le contrôle de qualité (CQ) interne fourni par Hélène Biosciences® (extraits de tissus murins additionnés de sérum humain) est inclus dans chaque série d'électrophorèse.

1.1. Profils électrophorétiques de sérum de sujets adultes

1.1.1. Profil normal de sérum adulte / CQ Hélène

La figure 12.a montre un profil électrophorétique normal d'un sérum adulte mettant en évidence les 3 isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB. On observe un léger décalage vers la gauche (cathode) des pics du profil humain par rapport aux fractions correspondantes du contrôle d'origine animale (figure 12.b).

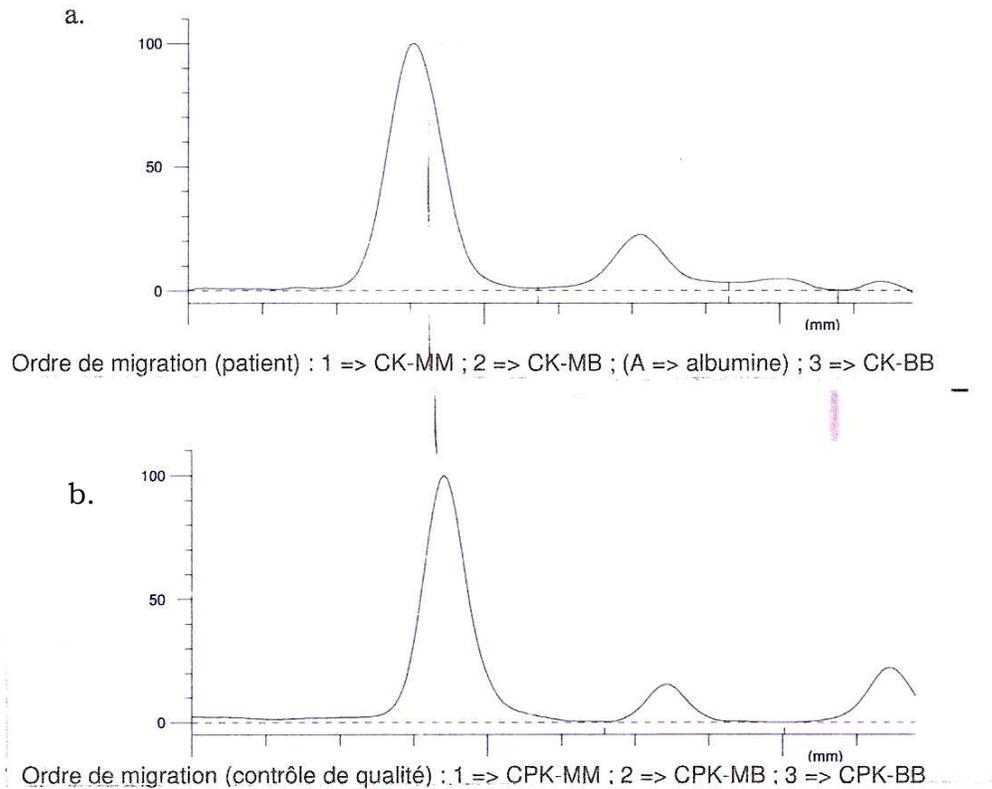


Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose (Hélène Biosciences®) des isoenzymes CK d'un sérum adulte normal (a. patient ; b. contrôle de qualité)

1.1.2. Profil de sérum adulte hémolysé

Les différents profils « hémolysés » sont présentés à la figure 13. Un artéfact n'est visible que pour le prélèvement fortement hémolysé +++ : l'hémolyse apparaît sous la forme d'un épaulement à droite du pic correspondant à l'isoenzyme CKMM, débutant à mi-hauteur de la partie descendante de ce pic. Le pic CKMM du sujet reste légèrement décalé à gauche par rapport au pic CKMM du contrôle.

Ainsi dans la technique sur gel d'agarose Helena Biosciences®, l'adénylate kinase érythrocytaire libérée lors de l'hémolyse migre en position anodique par rapport à la CKMM.

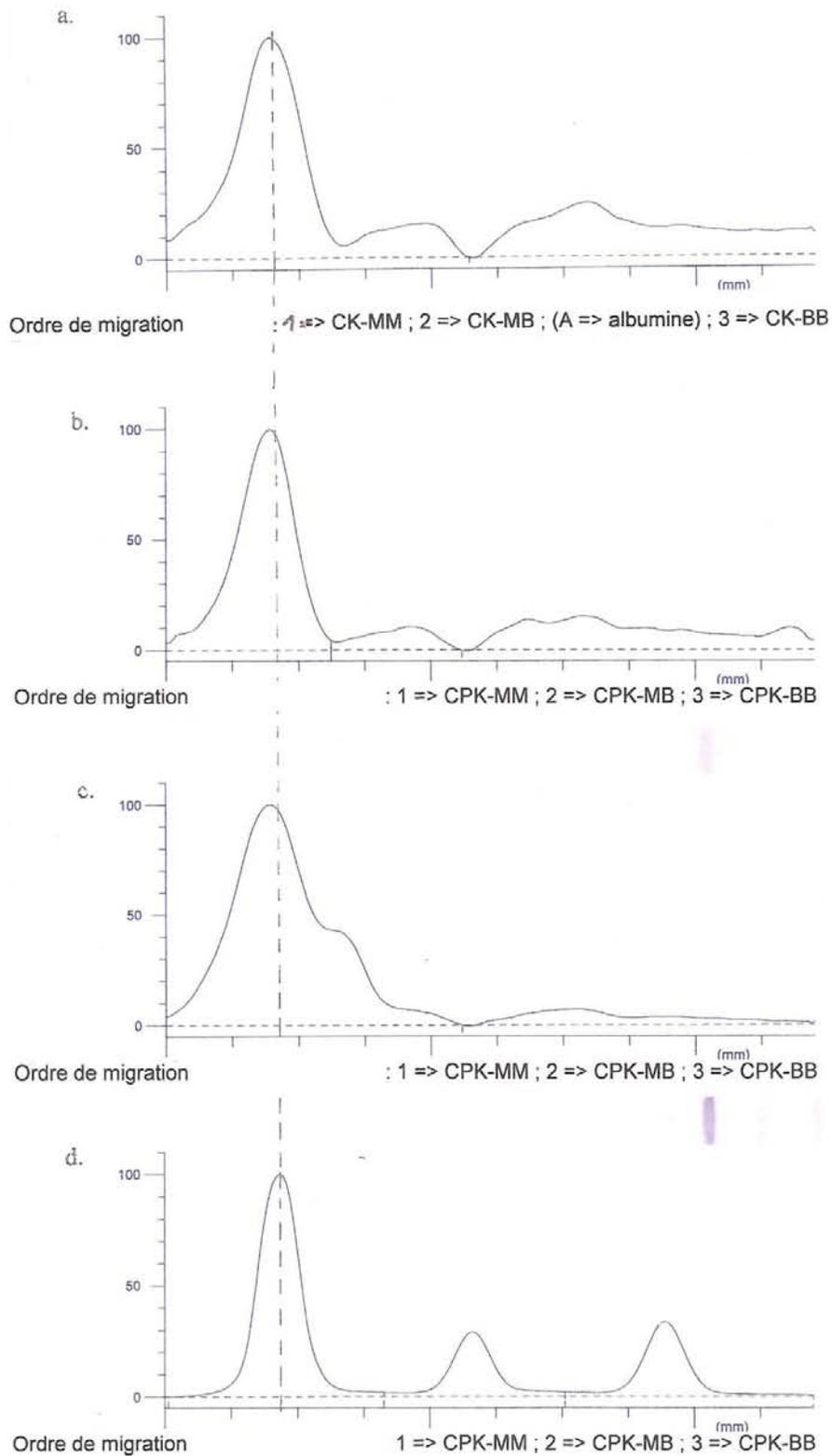


Figure 13 : Interférence de l'hémolyse sur l'électrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose (Hélène Biosciences®) (sérum adulte)

- a. hémolyse +
- b. hémolyse ++
- c. hémolyse +++
- d. contrôle de qualité

1.1.3. Profil de sérum adulte avec macroCK

La présence de macroCK de type 1 est visualisée sur un profil type par un pic supplémentaire situé entre les fractions CKMM et CKMB (Figure 14).

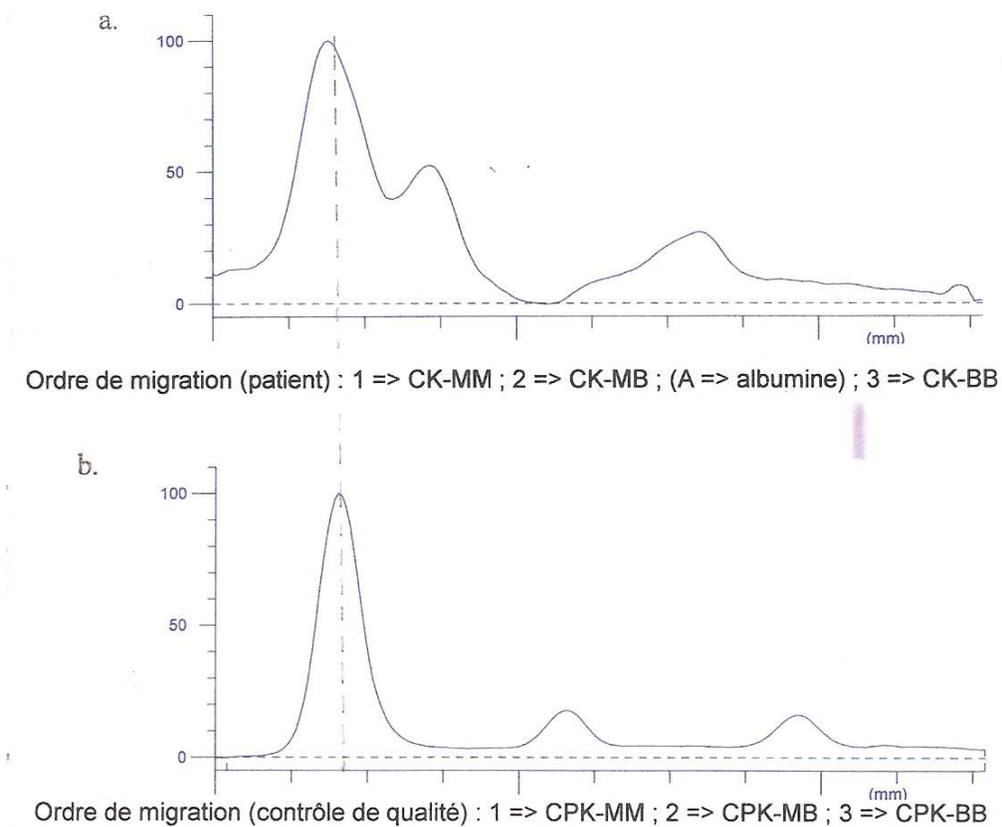


Figure 14 : Electrophorèse sur gel d'agarose (Hélène Biosciences ®) d'un sérum adulte avec présence d'une macroCK de type 1 (a. patient ; b. CQ)

1.2. Profils électrophorétiques de sérums foetaux

1.2.1. Profil normal de sérum foetal / CQ Helena

Comme sur le profil électrophorétique de sérum adulte, on observe toujours un léger décalage vers la gauche des pics correspondant aux isoenzymes MM, MB et BB du sérum foetal humain par rapport au témoin commercialisé (figure 15). Les profils électrophorétiques de sérums foetaux présentent constamment une bande supplémentaire située entre les fractions CK MB et CKBB, d'intensité variable, correspondant à l'albumine.

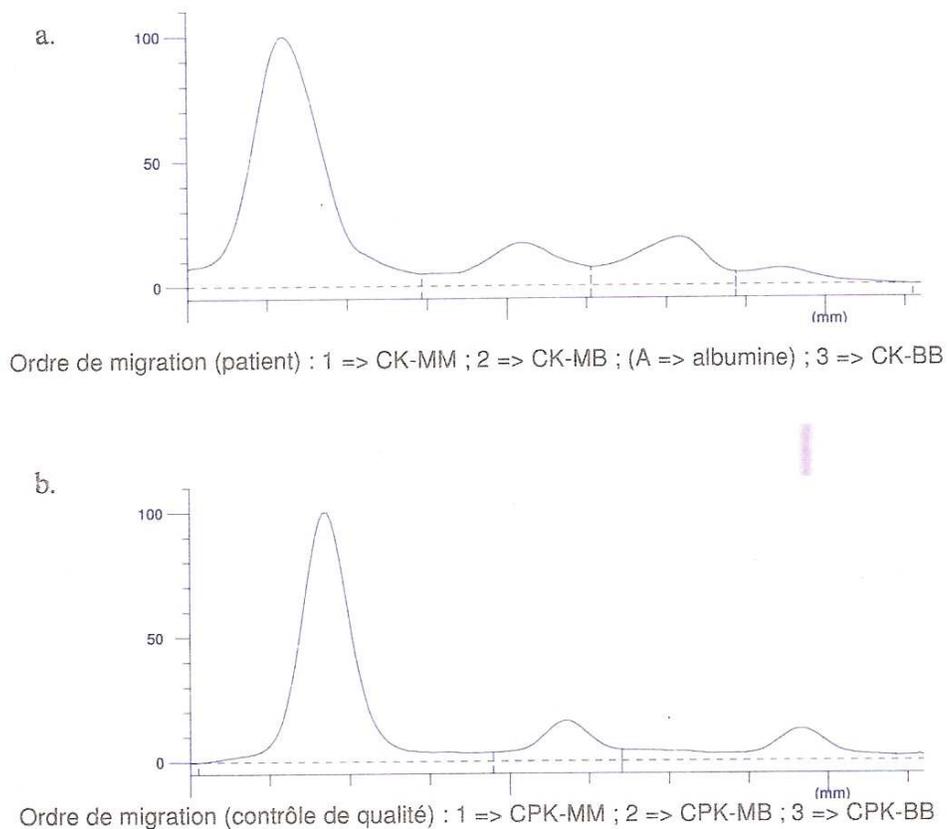


Figure 15 : Electrophorèse des isoenzymes CK sur gel d'agarose (sérum foetal)

- a. profil normal (avec présence d'albumine)
- b. contrôle de qualité

1.2.2. Profil de sérum foetal avec hémolyse

Sur les 2 profils présentés à la figure 16, on constate que, comme pour le sérum adulte, l'adénylate kinase érythrocytaire migre en position anodique par rapport au pic de CKMM formant un épaulement à droite de celui-ci, suivi d'un deuxième pic moins marqué. L'épaulement dû à l'hémolyse est situé exactement à la même distance de migration que le pic CKMM du contrôle alors que le pic CKMM du foetus est décalé plus à gauche. La figure 17 montre que le profil « hémolysé » dans le sang adulte diffère de celui observé chez le foetus : en effet, l'épaulement correspondant à l'hémolyse est décalé à droite par rapport au pic CKMM du contrôle chez l'adulte alors qu'il est parfaitement aligné avec celui-ci chez le foetus.

1.2.3. Profil ininterprétable de sérum foetal

Trois exemples de profils ininterprétables sont représentés à la figure 18. Leur point commun est la présence d'albumine en grande quantité, migrant entre les pics CKMB et CKBB, ce qui entraîne une mauvaise séparation des fractions adjacentes. Il existe également d'autres pics dont la signification est inconnue.

1.2.4. Profil de sérum foetal avec macroCK

La présence de macroCK est détectée chez 20 foetus. Il s'agit d'une macro CK de type 1 caractérisée par une migration intermédiaire entre les pics de CKMM et de CKMB. Les pourcentages de macroCK observés sont variables (2- 47%) comme le montrent les figures :

- 19 : macroCK à 8%
- 20 : macroCK à 12%
- 21 : macroCK à 18%
- 22 : macroCK à 22%.

La figure 23 illustre un profil avec macro CK à 22% et un profil hémolysé chez 2 foetus. L'hémolyse apparaît sous la forme d'un épaulement à droite débutant aux deux tiers de la pente descendante du pic de CKMM du patient et parfaitement aligné avec le pic CKMM du contrôle. Par contre, la macroCK est visible sous forme d'un « vrai » pic séparé du pic CKMM du patient et décalé à droite par rapport au pic CKMM du contrôle. Cet aspect se retrouve quel que soit le pourcentage de macroCK.

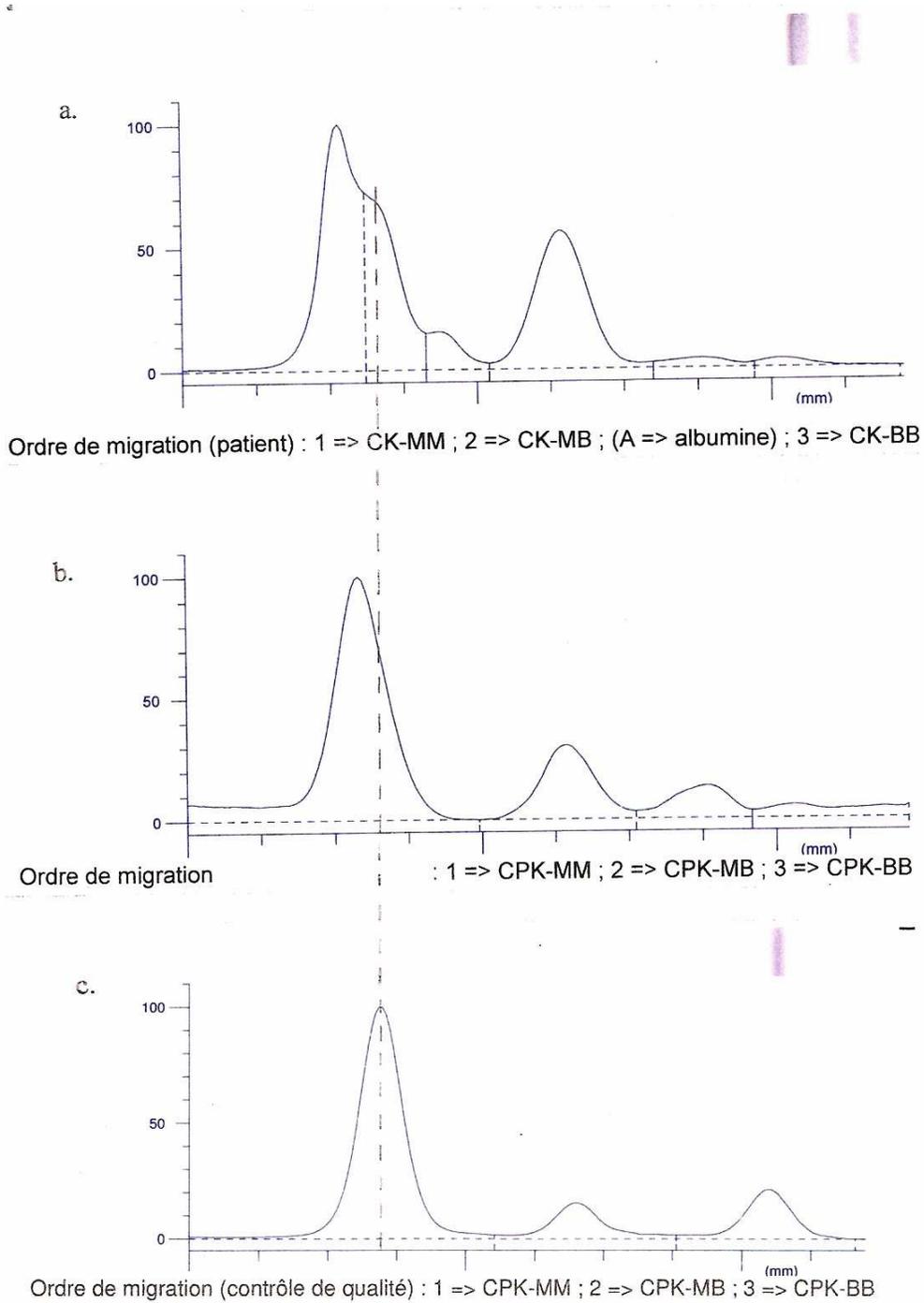


Figure 16 : Electrophorèse des isoenzymes CK du foetus L.

a. sérum hémolysé

b. sérum non hémolysé

c. contrôle de qualité

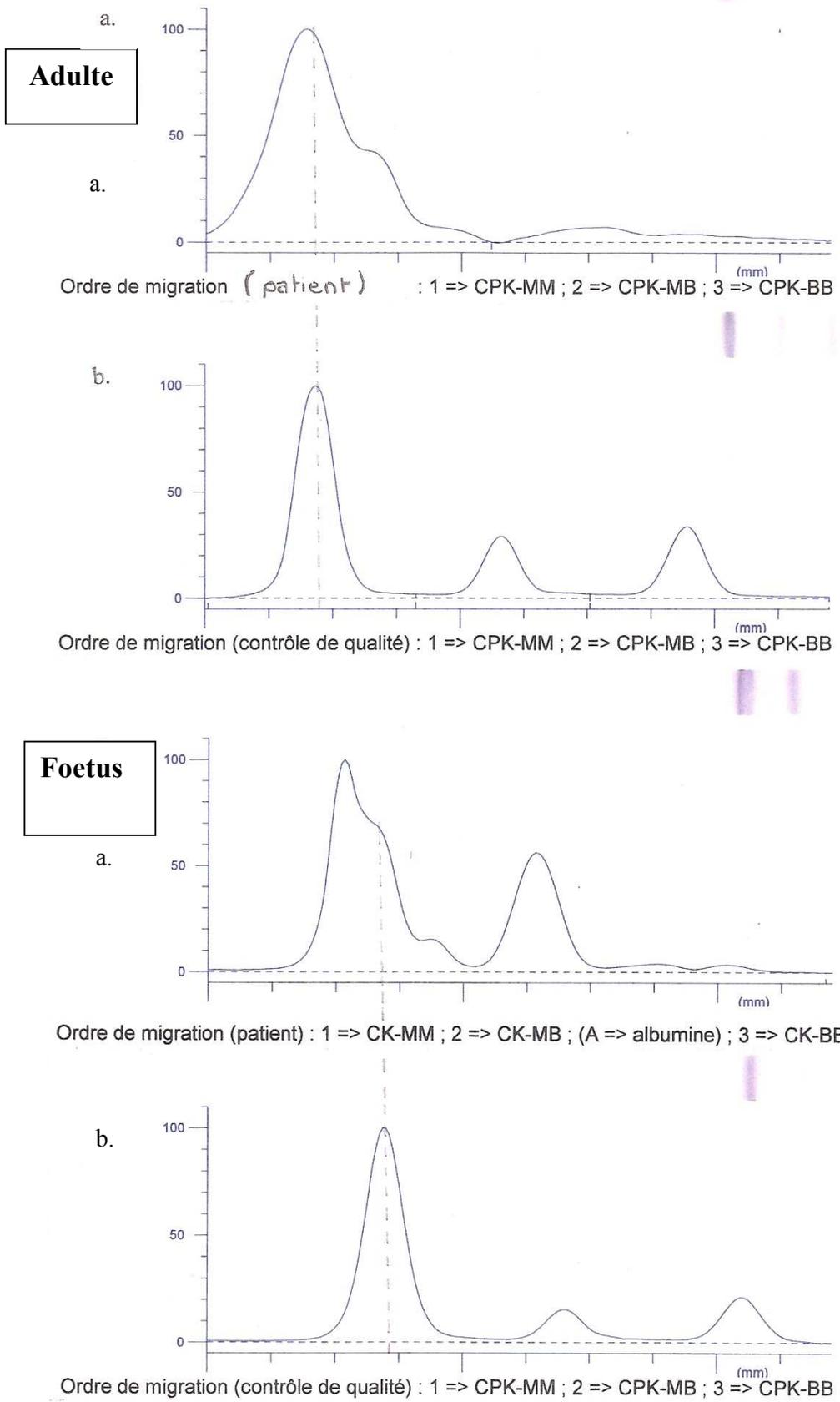


Figure 17 : Comparaison des profils « hémolysés »
 - chez l'adulte (a. patient ; b. contrôle)
 - chez le foetus (a. patient ; b. contrôle)

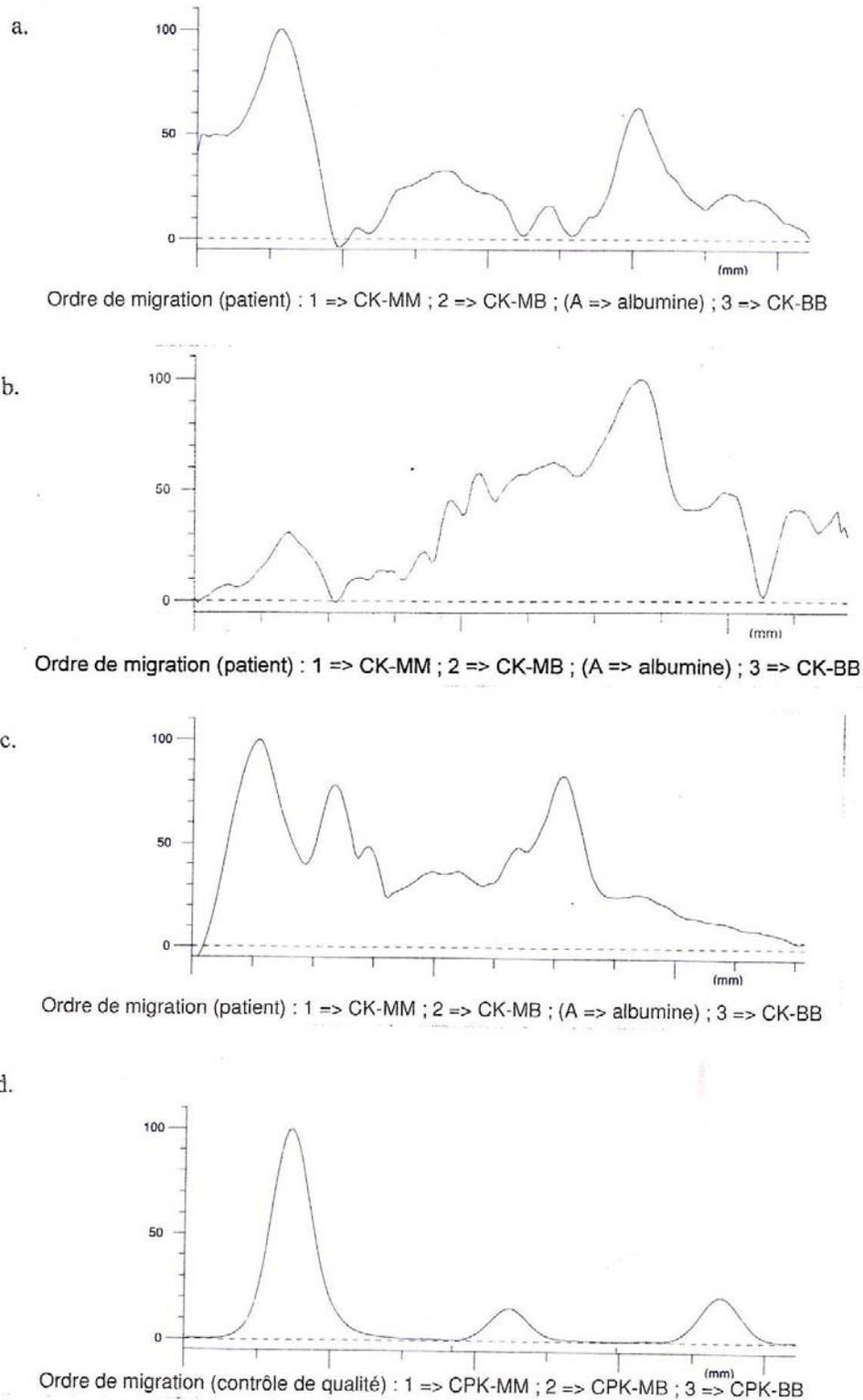


Figure 18 : Exemples de profils électrophorétiques ininterprétables (sérum foetal)

- a. foetus n° 9 (CK: 49 UI/L)
- b. foetus n°14 (CK: 28 UI/L)
- c. foetus n°16 (CK: 77 UI/L)
- d. contrôle de qualité

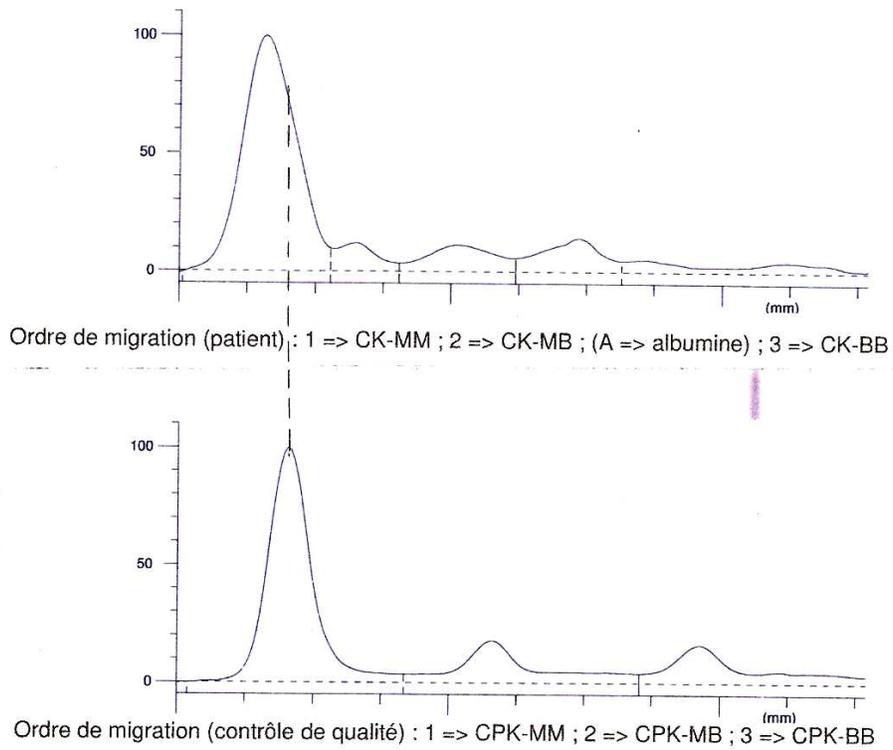


Figure 19 : Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°7 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 8%

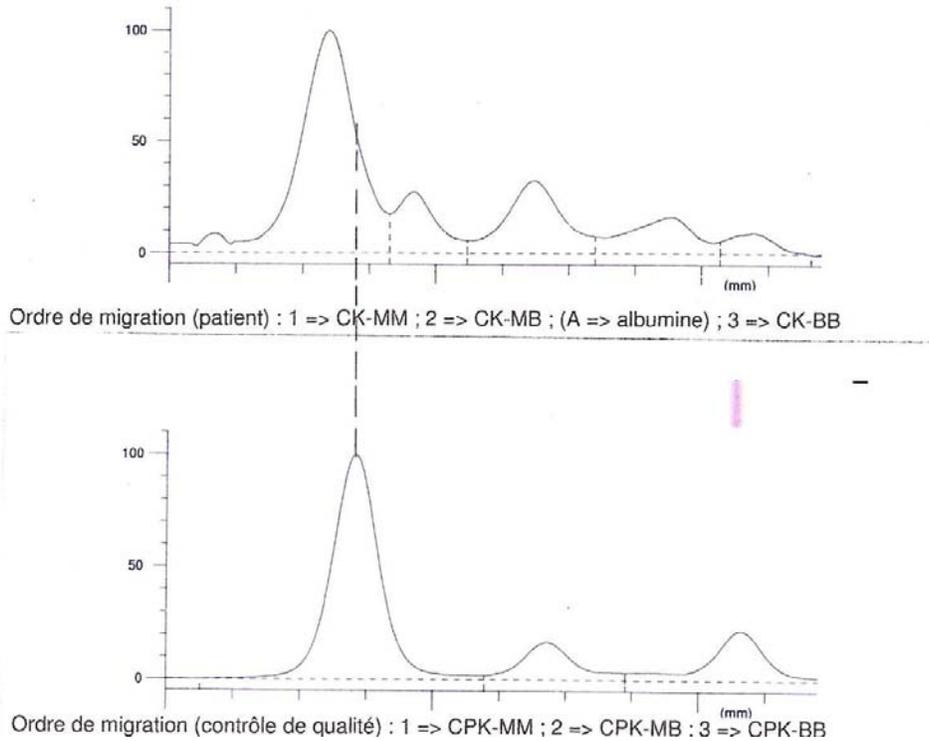
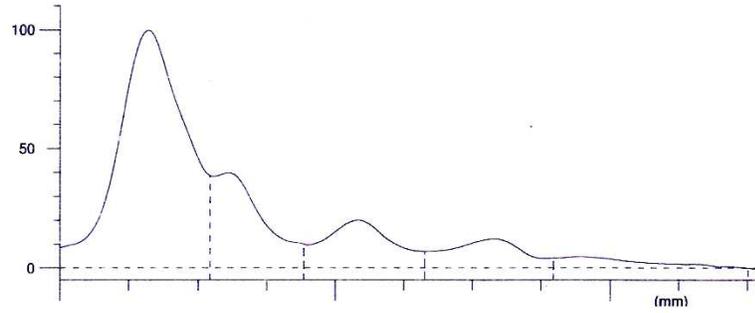
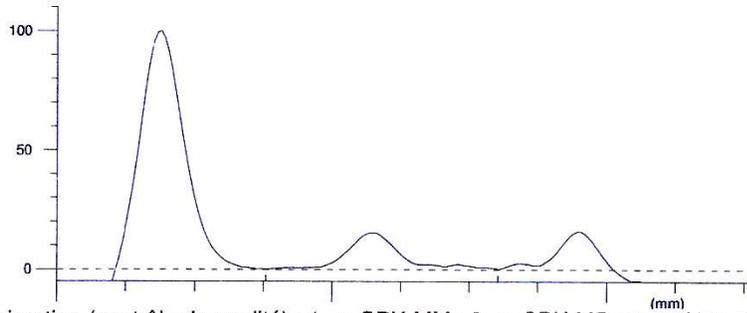


Figure 20 : Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°8 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 12%

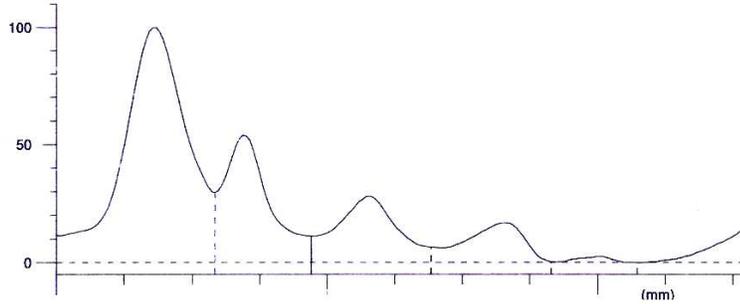


Ordre de migration (patient) : 1 => CK-MM ; 2 => CK-MB ; (A => albumine) ; 3 => CK-BB

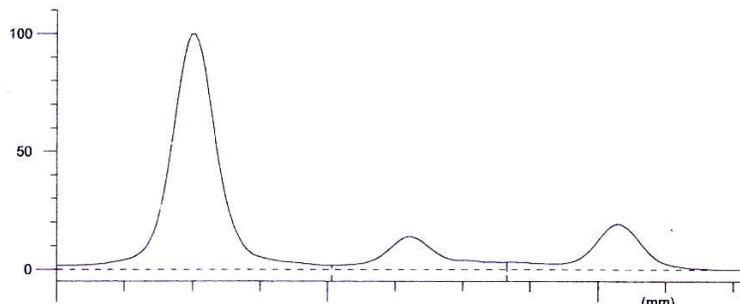


Ordre de migration (contrôle de qualité) : 1 => CPK-MM ; 2 => CPK-MB ; 3 => CPK-BB

Figure 21 : Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°5 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 18%



Ordre de migration (patient) : 1 => CK-MM ; 2 => CK-MB ; (A => albumine) ; 3 => CK-BB



Ordre de migration (contrôle de qualité) : 1 => CPK-MM ; 2 => CPK-MB ; 3 => CPK-BB

Figure 22 : Electrophorèse des isoenzymes CK du fœtus n°15 mettant en évidence une macroCK de type 1 à 22%

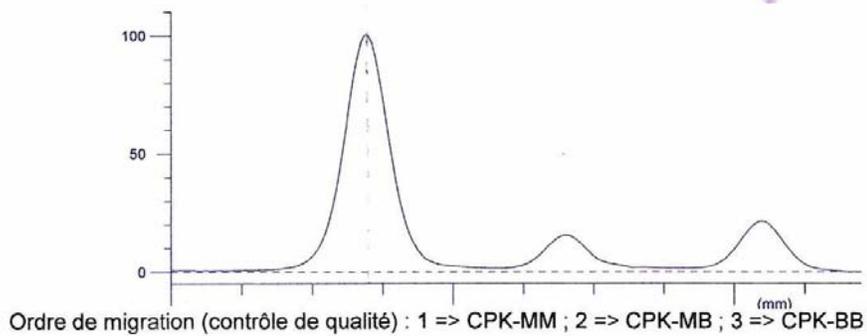
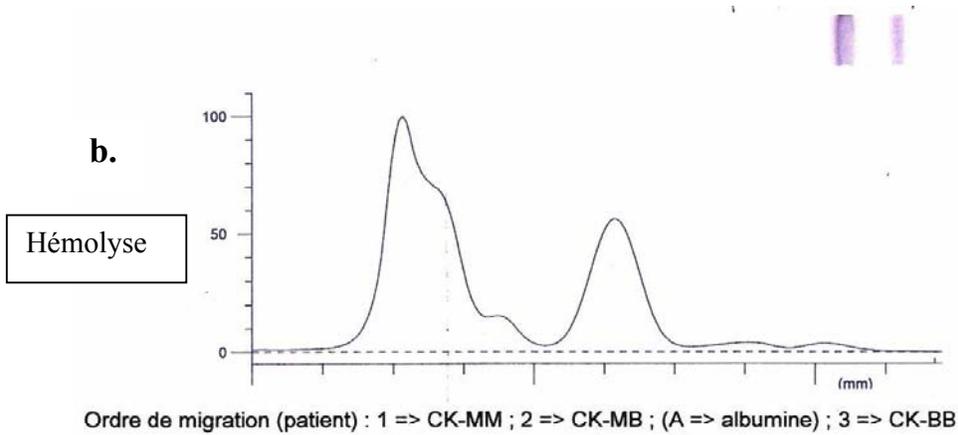
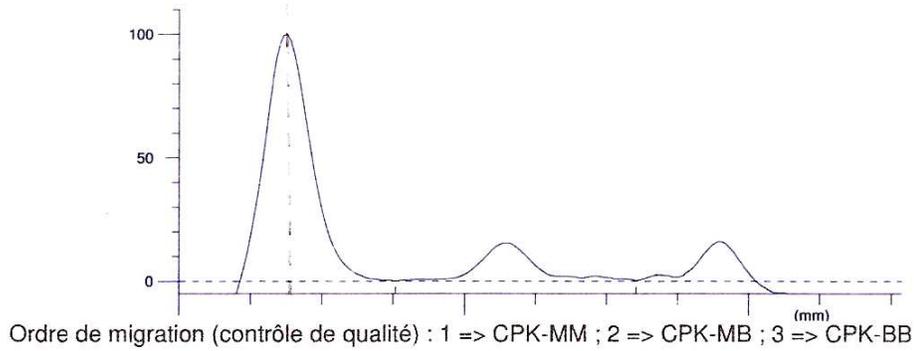
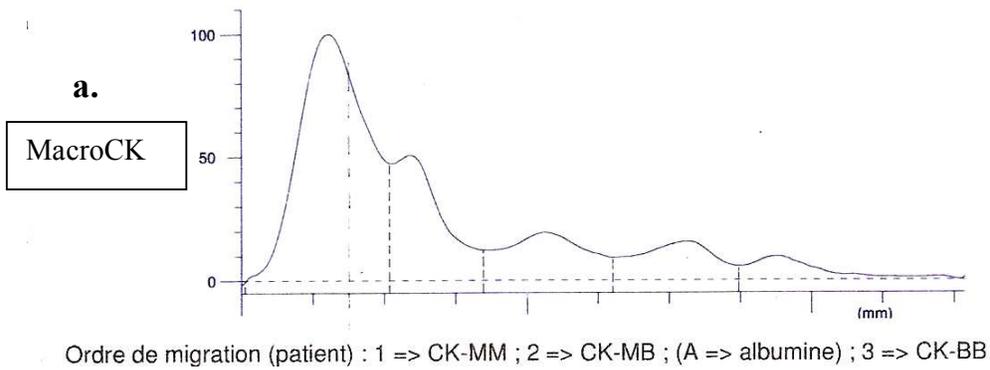


Figure 23 : Comparaison d'un profil de sérum foetal avec macroCK de type 1 à 22% (a) et d'un profil de sérum foetal hémolysé (b)

En résumé : L'analyse rétrospective des profils obtenus pour les échantillons de sérum fœtaux a permis de les classer selon 4 types :

- ***Profil avec hémolyse***
- ***Profil ininterprétable***
- ***Profil sans macroCK***
- ***Profil avec macroCK type 1***

2. Description de la population d'étude (n=116)

Durant la période d'étude, 1457 dossiers ont été présentés au CPDPN dont 707 ont abouti à une décision d'IMG.

135 échantillons de sang foetal ont été reçus au laboratoire de biochimie correspondant à 135 foetus.

Sur l'ensemble des prélèvements, 19 ont été exclus :

- 9 échantillons pour lesquels ni le dosage de l'activité CK totale ni l'électrophorèse n'ont été réalisés en raison soit d'une absence de prescription médicale soit d'une quantité insuffisante de sérum

- 10 échantillons pour lesquels seule l'électrophorèse n'a pas été réalisée en raison d'une quantité insuffisante de sérum.

L'étude concerne donc 116 échantillons dont la répartition annuelle est présentée dans le tableau XIII.

	2008	2009	2010	2011	Total
Dossiers présentés au CPDPN	390	365	347	355	1457
Autorisations d'IMG	200	161	180	166	707
Prélèvements reçus au laboratoire	51	41	26	17	135
Prélèvements analysés (dosage et électrophorèse CK)	38	38	25	15	116

Tableau XIII : Activité du CPDPN et répartition annuelle des prélèvements de sang foetal reçus au laboratoire de Biochimie entre le 01/01/2008 et le 31/12/2011.

Dans la cohorte de notre étude on observe que :

- Les femmes enceintes ont un âge médian de 30 ans (extrêmes 17 à 47 ans)

- < 20 ans : n = 4
- 20-30 ans : n = 52
- 30-40 ans : n = 50
- > 40 ans : n = 10

- les foetus (n= 116) : 59 sont de sexe masculin et 57 de sexe féminin. L'âge gestationnel varie de 18,5 SA à 39 SA avec une médiane à 27,8 SA.

- Les ponctions de sang foetal ont été réalisées au cours du 2^{ème} trimestre (n=67) et du 3^{ème} trimestre de grossesse (n=49).

A noter l'existence de 3 grossesses gémellaires.

En ce qui concerne le type de prélèvements, 115 ponctions ont été réalisées en intracardiaque et 1 ponction a été effectuée par cordocentèse au cours d'une exsanguinotransfusion.

La répartition des pathologies diagnostiquées chez les foetus selon les codes « pathologies » de l'Agence de la Biomédecine est présentée dans la figure 24.

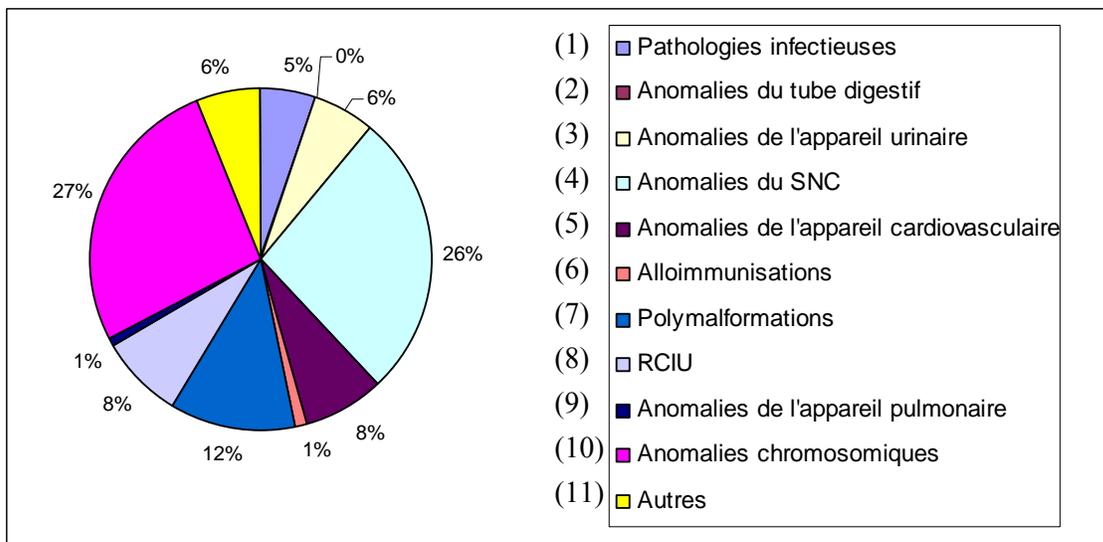


Figure 24 : Répartition des foetus (n=116) selon les codes « pathologies » définis par l'Agence de la Biomédecine

Les pathologies les plus fréquemment observées sont

- les anomalies chromosomiques (27%)
- les anomalies du système nerveux central (26%).

Il n'existe qu'un cas d'alloimmunisation foetomaternelle et qu'un cas de pathologie pulmonaire.

Notre cohorte ne comporte aucun cas de pathologie du tube digestif.

Cependant les groupes ainsi constitués ne sont pas homogènes, chacun regroupant des pathologies diverses en particulier le groupe 11 (Cf annexe 1).

Les caractéristiques de foetus sont présentées dans le tableau XIV.

Code Pathologie	Effectif	Age maternel (ans)	Age gestationnel (SA)	sexe foetal	
		médiane [valeurs extrêmes]	médiane [valeurs extrêmes]	M	F
1	6	31,5 [29,0 ; 36,0]	26,5 [24,0 ; 31,0]	4	2
2	0	/	/	/	/
3	7	29 [25,0 ; 34,0]	28 [21,0 ; 33,0]	6	1
4	31	31 [17,0 ; 40,0]	30 [23,0 ; 37,5]	16	15
5	9	28 [19,0 ; 35,0]	28 [24,0 ; 36,0]	6	3
6	1	26	31	1	0
7	14	28,5 [20,0 ; 39,0]	32,2 [21,0 ; 39,0]	6	8
8	9	28 [17,0 ; 35,0]	25,5 [24,0 ; 29,0]	5	4
9	1	25	28	1	0
10	31	36 [25,0 ; 47,0]	25 [20,0 ; 35,0]	11	20
11	7	28 [26,0 ; 35,0]	25 [18,5 ; 31,0]	3	4

Tableau XIV: Caractéristiques des foetus (n=116) répartis selon les codes « pathologies »

On remarque que **l'âge maternel** médian (36 ans) est plus élevé dans le groupe des foetus atteints de pathologies chromosomiques ce qui est classiquement observé dans la littérature.

L'âge gestationnel médian le plus faible (25SA) est observé dans le groupe des anomalies chromosomiques et le plus élevé (32,2 SA) dans le groupe des polymalformations.

Il y a globalement autant de foetus masculins que féminins dans les différents groupes à l'exception du groupe des pathologies de l'appareil urinaire où il y a 6 foetus de sexe masculin atteints pour un seul foetus de sexe féminin et du groupe des anomalies chromosomiques où il y a deux fois plus de foetus féminins que masculins (Figure 25).

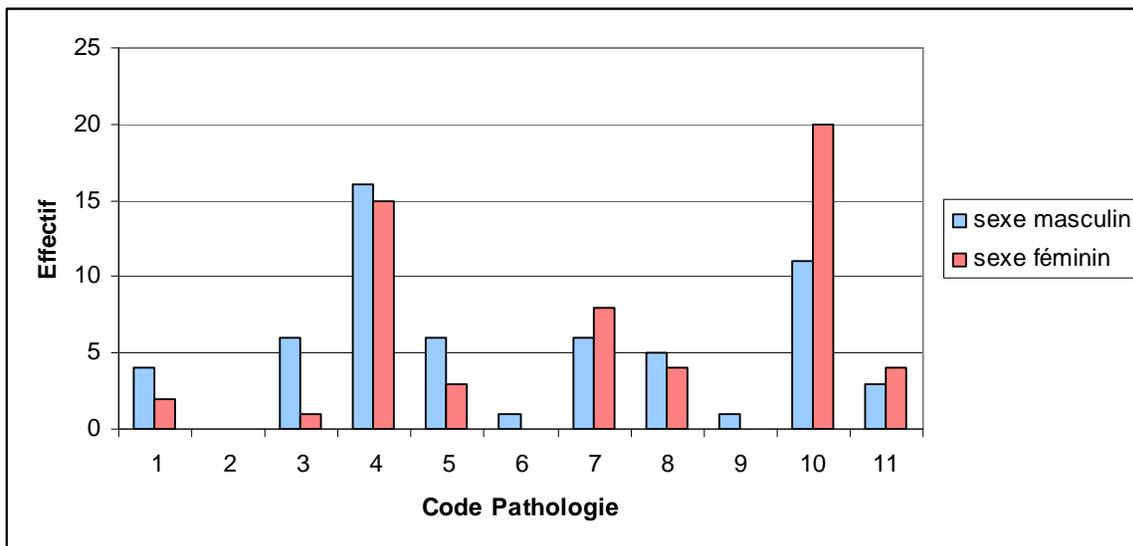


Figure 25 : Répartition des foetus selon le sexe et le code pathologie (n=116)

Parmi les 116 électrophorèses réalisées,

- 12 présentent un profil avec un aspect similaire à celui du foetus L. .

Considérés comme potentiellement suspects d'hémolyse ils ont été exclus de l'étude.

- 18 révèlent des profils ininterprétables et concernent des foetus dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau XV.

No	Age gestationnel (SA)	Sexe	Activité CK totale (UI/L)	Activité CKMB (UI/L)	Diagnostic	Code pathologie
1	26	M	22	10	Infection à CMV avec microcéphalie et RCIU	1
2	22	M	79	3	Uropathie obstructive bilatérale	3
3	30	M	130	16	Myéломéningocèle lombosacrée avec ventriculomégalie	4
4	32	F	172	14	Agénésie du corps calleux	4
5	37,5	M	194	15	Agénésie du corps calleux	4
6	28	M	91	14	Hypoplasie du ventricule gauche	5
7	24	F	136	18	Myocardiopathie dilatée avec akinésie du ventricule gauche (anasarque)	5
8	27,5	M	45	18	Omphalocèle et tétralogie de Fallot avec RCIU	7
9	33	F	49	9	Polymalformations	7
10	37	F	57	7	Polymalformations (cardiopathie complexe, hydramnios aigü)	7
11	32	F	132	18	Polymalformations (cardiopathie, uropathie, oligoamnios)	7
12	27	F	50	8	RCIU d'origine vasculoplacentaire	8
13	25	M	102	16	RCIU sévère secondaire à RPM	8
14	26	F	28	11	Triploïdie 69 XXX	10
15	24,5	F	71	22	Trisomie 21	10
16	27,5	M	77	30	Trisomie 5	10
17	35	M	213	17	Trisomie 21	10
18	18,5	M	72	6	Mort foetale in utéro	11

Tableau XV : Caractéristiques épidémiologiques, biologiques et pathologiques des foetus présentant un profil électrophorétique ininterprétable des CK.

Cette population de foetus est composée de 10 foetus masculins et 8 foetus féminins, d'âge gestationnel variant de 18,5 à 37,5 SA avec une médiane à 27,5 SA.

On ne retrouve pas de lien évident entre le caractère ininterprétable du profil et la pathologie décrite.

L'activité CK totale mesurée dans les 18 cas est faible, la moitié ayant une activité inférieure à 100 UI/L.

Le tableau XVI montre cependant que, pour des activités identiques de CK totale, il existe des profils ininterprétables et interprétables, bien qu'il n'y ait qu'un profil interprétable parmi les 5 ayant une activité CK totale inférieure à 50 UI/L.

Activité CK totale (UI/L)	Profils ininterprétables (n=18)	Profils interprétables (n=84)
[0-50[4	1
[50-100[7	26
[100-150[4	10
[150-200[2	19
[200-250[1	7
[250-300	0	7
[300-400[0	5
[400-500[0	2
[500-600[0	3
[600-700[0	2
> 700	0	2

Tableau XVI: Répartition des profils ininterprétables (n=18) et interprétables (n=84) en fonction de la valeur de CK totale.

Le point commun aux différents profils ininterprétables est la présence d'albumine en grande quantité migrant entre les pics CKMB et CKBB, ce qui entraîne une mauvaise séparation des fractions adjacentes. On voit également d'autres pics dont la signification nous est inconnue.

Par ailleurs, 2 dossiers montrent une incohérence entre le dosage de l'activité CK totale et l'activité CKMB mesurée par immunoinhibition. En effet, l'activité CKMB est supérieure à l'activité CK totale ce qui est en faveur de la présence d'une macroCK qui n'est cependant pas retrouvée à l'électrophorèse (Figure 26).

Les caractéristiques des foetus concernés sont résumées dans le tableau XVII.

n°	Age gestationnel (SA)	Sexe	Activité CK totale (UI/L)	Activité CKMB (UI/L)	Diagnostic	Code pathologie
1	25	F	15	24	myéломéningocèle	4
2	34	M	18	29	polymalformations (cerveau, foie, membres)	7

Tableau XVII: Caractéristiques des 2 foetus présentant un profil ininterprétable des isoenzymes CK

Il est important de souligner que ces 2 foetus présentent les valeurs d'activité CK totale les plus faibles parmi celles déterminées pour les 116 prélèvements reçus, respectivement 15 et 18 UI/L.

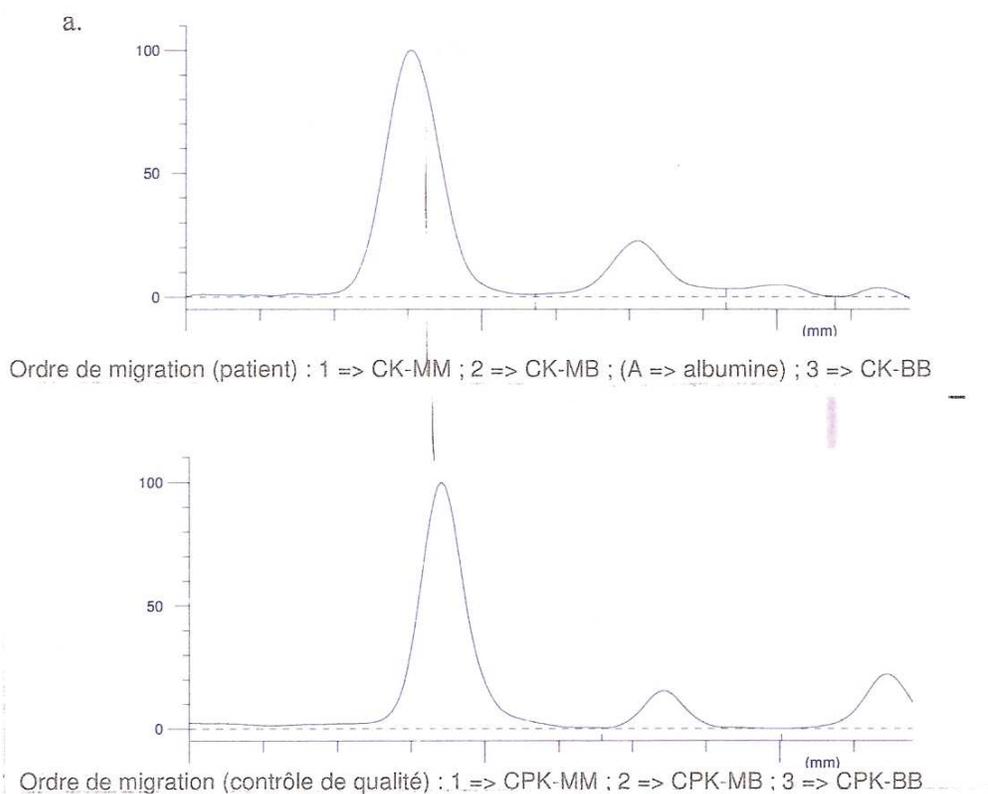


Figure 26 : Profil électrophorétique du foetus n°1 présentant une activité CKMB mesurée par immunoinhibition supérieure à l'activité CK totale (CK totale : 15 UI/L ; CKMB : 24 UI/L). L'électrophorèse ne met pas en évidence de macroCK.

En résumé :

Compte tenu de la diversité des profils obtenus, ont été exclus de l'étude les profils suspects d'hémolyse (n=12), ininterprétables (n=18) et les 2 dossiers incohérents.

La recherche de la présence d'une macroCK a donc été effectuée pour 84 échantillons de sang fœtaux.

3. Profils électrophorétiques interprétables (n=84)

3.1. Description de la population d'étude retenue

Les 84 échantillons de sang ayant un profil électrophorétique interprétable et non suspect d'hémolyse ont été prélevés :

- au cours de grossesses chez des femmes enceintes dont l'âge médian est de 30 ans avec des âges extrêmes allant de 17 à 47 ans :

< 20 ans :	n = 4
20-30 ans	n = 36
30-40 ans	n = 35
> 40 ans	n = 9

- chez 84 fœtus : 43 de sexe masculin et 41 de sexe féminin avec un âge gestationnel variant de 20 SA à 37 SA et une médiane à 27 SA.

- au cours du 2^{ème} trimestre (n=50) et du 3^{ème} trimestre de grossesse (n=34) dans 83 cas par ponction intracardiaque et dans 1 cas par cordocentèse au cours d'une exsanguinotransfusion.

A noter l'existence de 2 grossesses gémellaires.

L'analyse comparative montre que l'exclusion des 32 dossiers n'a pas modifié de façon significative les caractéristiques générales, observées dans la population initiale (tableau XVIII).

	Population initiale	Population après exclusion
	n = 116	n = 84
<u>Age maternel (ans)</u>		
<i>médiane</i>	30	30
<i>extrêmes</i>	17 – 47	17 – 47
<i>classes d'âge</i> [0-20[4	4
[20-30[52	36
[30-40[50	35
[40- 50[10	9
<u>Age gestationnel (SA)</u>		
<i>médiane</i>	27,8	27
<i>extrêmes</i>	18,5 – 39	20 – 37
<i>nombre PSF</i> 1 ^{er} trimestre	0	0
2 ^{ème} trimestre	67	50
3 ^{ème} trimestre	49	34
<u>Sexe</u>		
Masculin	59	43
Féminin	57	41
<u>Nombre de grossesses gémellaires</u>		
	3	2

Tableau XVIII: Analyse comparative des caractéristiques générales de la population initiale (n= 116) et de la population retenue (n=84).

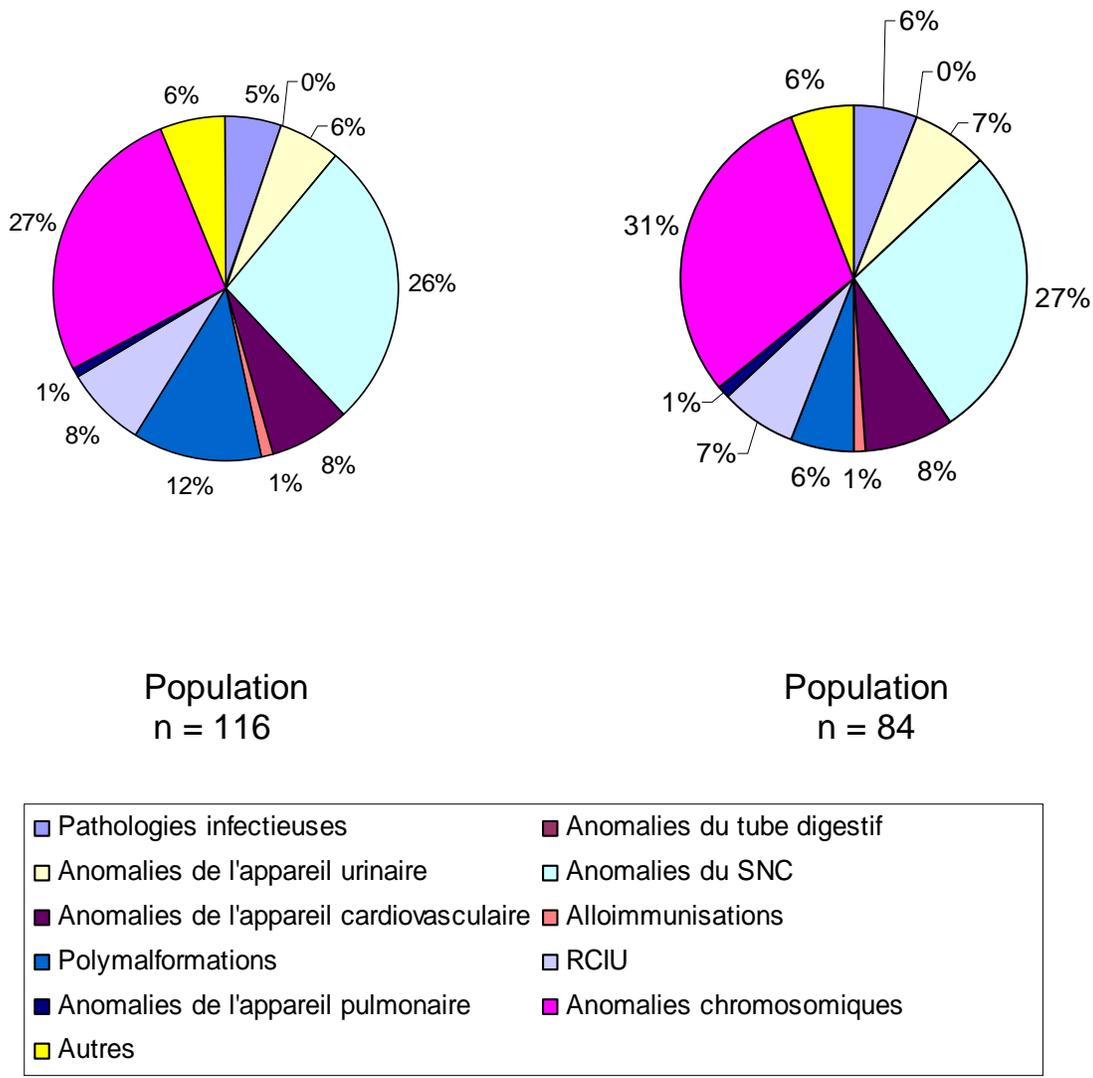


Figure 27 : Répartition des pathologies des foetus de la population initiale (n=116) et de la population d'étude retenue après exclusion (n=84)

Les pathologies les plus fréquemment observées sont comme dans la cohorte initiale :

- les anomalies chromosomiques (31%) et
- les anomalies du système nerveux central (27%).

Le descriptif complet des pathologies diagnostiquées chez ces 84 foetus est présenté en annexe 2.

On constate que la diminution des effectifs n'a pas modifié les caractéristiques générales des foetus répartis par code pathologie comme le montre le tableau XIX.

Code pathologie	Population initiale			Population après exclusion		
	n = 116			n = 84		
	Age maternel (ans) médiane [extrêmes]	Age gestationnel (SA) médiane [extrêmes]	Sexe M / F	Age maternel (ans) médiane [extrêmes]	Age gestationnel (SA) médiane [extrêmes]	Sexe M / F
1		n = 6			n = 5	
	31,5 [29-36]	26,5 [24,0-31,0]	4 2	32 [28-36]	27 [23,0-30,0]	3 2
2		n = 0			n = 0	
	- -	- -	- -	- -	- -	- -
3		n = 7			n = 6	
	29 [25-34]	28 [21,0-33,0]	6 1	28 [25-34]	28,5 [21,0-33,0]	5 1
4		n = 31			n = 23	
	31 [17-40]	30 [23-37,5]	16 15	29 [17-40]	28 [23,0-37,0]	12 11
5		n = 9			n = 7	
	28 [19-35]	28 [24,0-36,0]	6 3	27 [19-35]	29 [24,0-36,0]	5 2
6		n = 1			n = 1	
	26 -	31 -	1 0	26 -	31 -	1 0
7		n = 14			n = 5	
	28,5 [20-39]	32,2 [21,0-39,0]	6 8	26 [20-32]	32 [20,0-34,0]	2 3
8		n = 9			n = 6	
	28 [17-35]	25,5 [24,0-29,0]	5 4	29 [17-35]	26,5 [24,0-29,0]	3 3
9		n = 1			n = 1	
	25 -	28 -	1 0	25 -	28 -	1 0
10		n = 31			n = 25	
	36 [25-47]	25 [20,0-35,9]	11 20	36 [27-47]	25 [20,0-34,0]	9 16
11		n = 7			n = 5	
	28 [26-35]	25 [18,5-31,0]	3 4	31 [27-35]	26 [25,0-31,0]	2 3

Tableau XIX : Analyse comparative des caractéristiques générales (âge maternel, âge gestationnel, sexe) des foetus répartis par code pathologie dans les deux populations d'étude n= 116 et n=84.

On dénombre plus de foetus masculins dans les groupes 3 et 5 et à l'inverse plus de foetus féminins dans le groupe 10 (Figure 28).

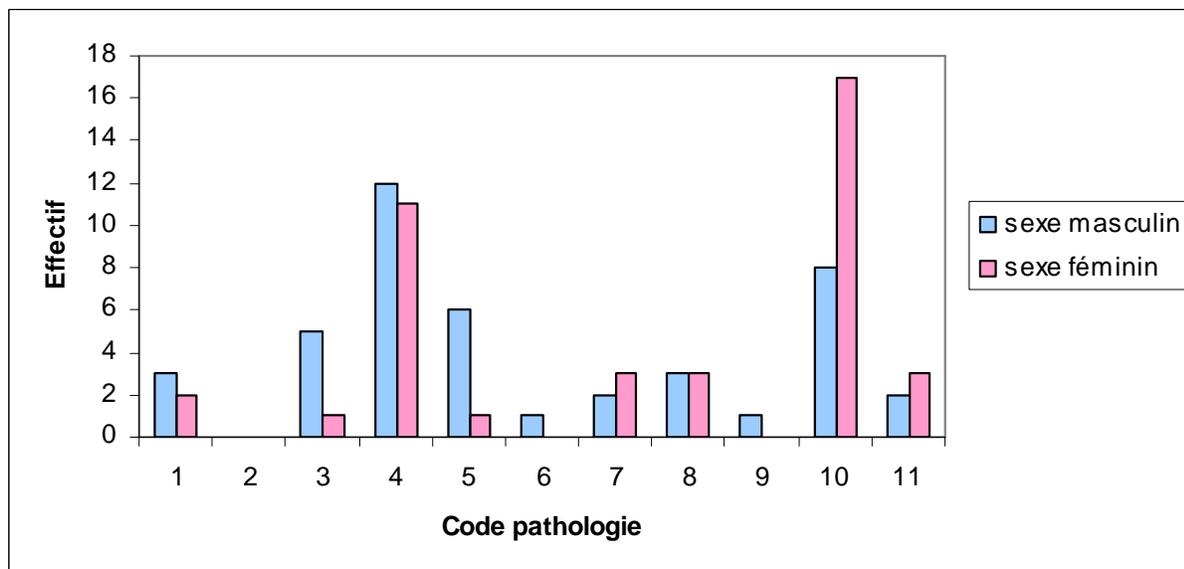


Figure 28 : Répartition des foetus selon le sexe et le code pathologie dans la population d'étude retenue (n=84)

3.2. Activités CK totale et CKMB & isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB

Indépendamment de la présence ou de l'absence de macroCK, nous avons cherché à déterminer s'il existe une influence du sexe foetal, de l'âge gestationnel, de la notion de RCIU et du type de pathologie sur les paramètres biologiques mesurés.

3.2.1. Influence du Sexe foetal

Le sexe du foetus n'a pas d'influence significative quel que soit le paramètre considéré (tableau XX).

Paramètres	Sexe Masculin	Sexe Féminin	Degré de signification (p)
	n = 43 (51%)	n = 41 (49%)	
Age gestationnel (SA)			
médiane	27	27	NS
[valeurs extrêmes]	[20,0 ; 37,0]	[20,0 ; 36,0]	
CK totale (UI/L)			
médiane	174	156	NS
[valeurs extrêmes]	[40 ; 1067]	[50,0 ; 653,0]	
CKMB (UI/L)			
<i>dosage par immunoinhibition</i>			
médiane	20	25	NS
[valeurs extrêmes]	[9,0 ; 186,0]	[9,0 ; 167,0]	
Pourcentage CK MM (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	71	74	NS
[valeurs extrêmes]	[42 ; 100]	[33 ; 100]	
Pourcentage CK MB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	18	16	NS
[valeurs extrêmes]	[0 ; 48]	[0 ; 38]	
Pourcentage CK BB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	6	5	NS
[valeurs extrêmes]	[0 ; 27]	[0 ; 21]	

Tableau XX : Comparaison des paramètres biologiques selon le sexe du fœtus (test de Mann Whitney).

3.2.2. Influence de l'âge gestationnel

L'activité CK totale s'échelonne de 40 à 1067 UI/L avec une médiane à 165,5 UI/L et ne semble pas varier en fonction de l'âge gestationnel (Figure 29). Le test de Mann Whitney ne montre pas de différence significative entre les fœtus selon la date de réalisation de la ponction, 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre (tableau XXI).

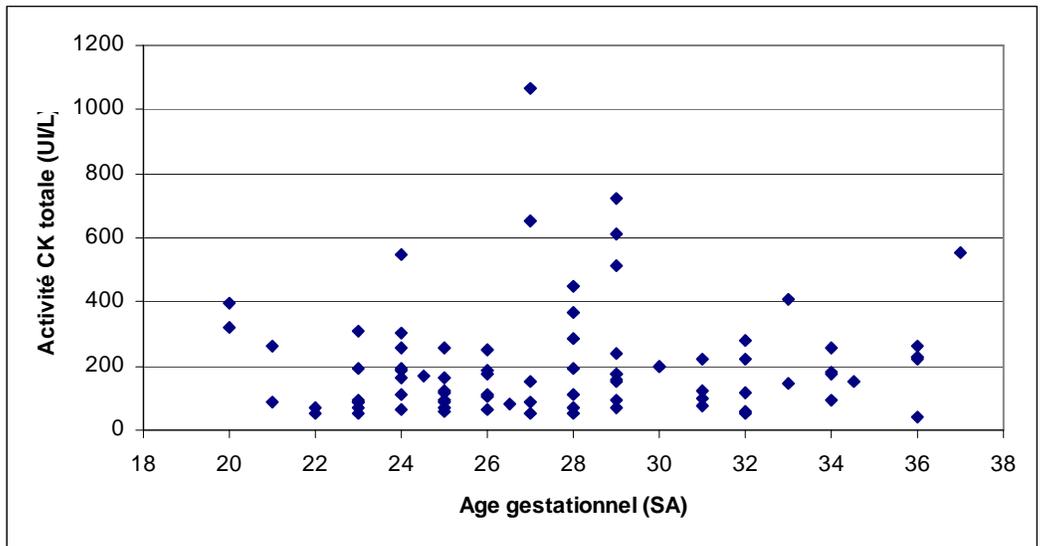


Figure 29 : Variation de l'activité CK totale en fonction de l'âge gestationnel

L'activité CK MB mesurée par immuno-inhibition varie de 9 à 186 UI/L avec une valeur médiane à 23 UI/L et n'est pas corrélée à l'âge gestationnel (Figure 30).

Le test de Mann Whitney ne montre pas de différence significative entre les foetus selon la date de réalisation de la ponction, 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre (tableau XXI).

L'activité CKMB en valeur absolue suit la même distribution que l'activité CK totale.



Figure 30 : Variation de l'activité CKMB en fonction de l'âge gestationnel.

	2 ^{ème} trimestre	3 ^{ème} trimestre	Degré de signification p
Effectif	50 (60%)	34 (40%)	
Sexe			
Masculin	26 (52%)	17 (50%)	NS
Féminin	24 (48%)	17 (50%)	NS
Activité CK totale (UI/L)			
Médiane	119,5	176,5	NS
valeurs extrêmes	[50-1067]	[40-722]	
Activité CKMB (UI/L) <i>(immunoinhibition)</i>			
Médiane	20	24	NS
valeurs extrêmes	[0-186]	[9-147]	

Tableau XXI : Analyse comparative des activités CK totale et CKMB en fonction du terme de la grossesse au moment de la ponction de sang foetal (2^{ème} versus 3^{ème} trimestre).
(Test de Mann Whitney)

L'analyse de la répartition des isoenzymes de CK en fonction de l'âge gestationnel comme le montrent les 3 graphiques ci-dessous (figures 31, 32, 33) ne permet pas d'établir une corrélation entre une isoenzyme donnée et l'âge de la grossesse. Il n'y a pas de différence significative entre les foetus selon la date de réalisation de la ponction, 2^{ème} versus 3^{ème} trimestre (tableau XXII).

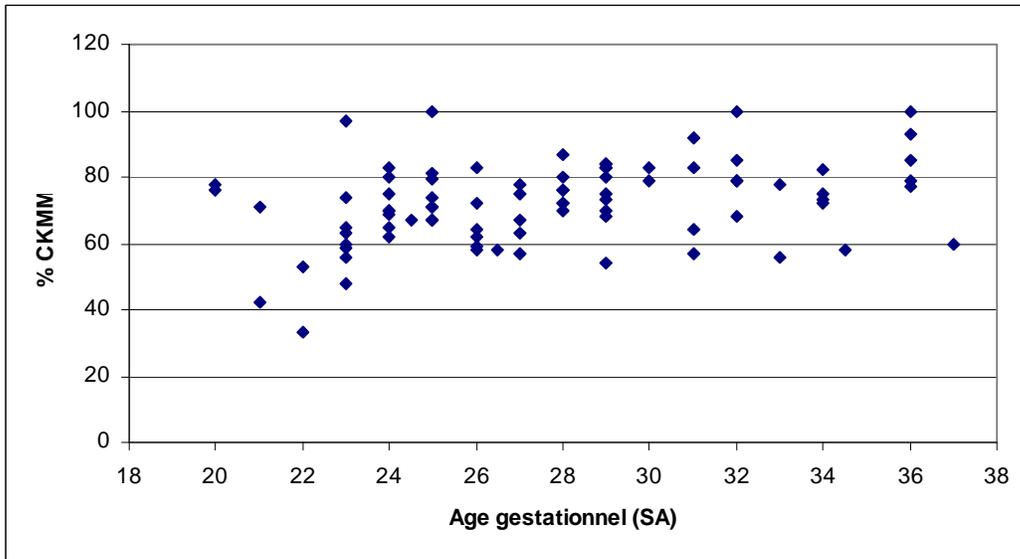


Figure 31 : Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMM (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel

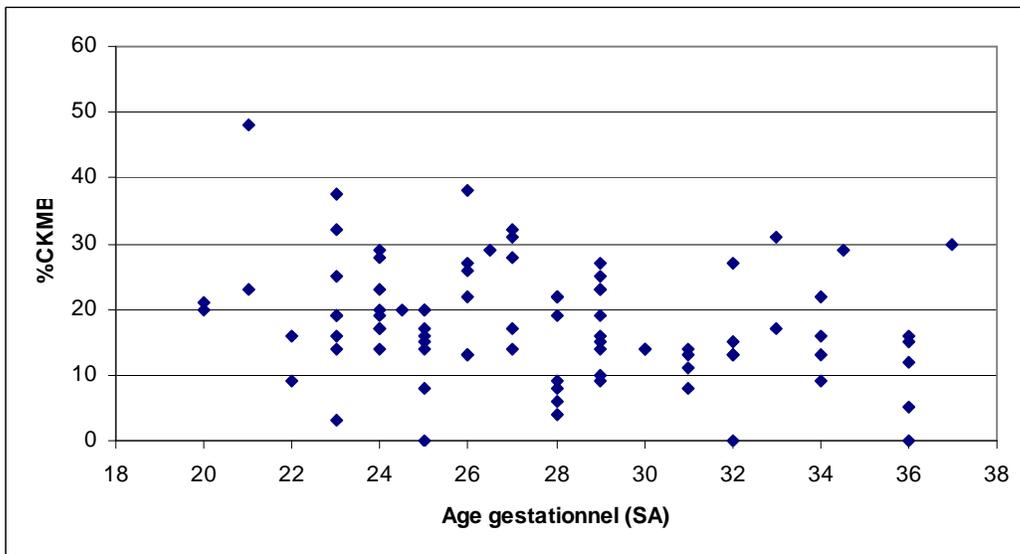


Figure 32 : Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMB (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel

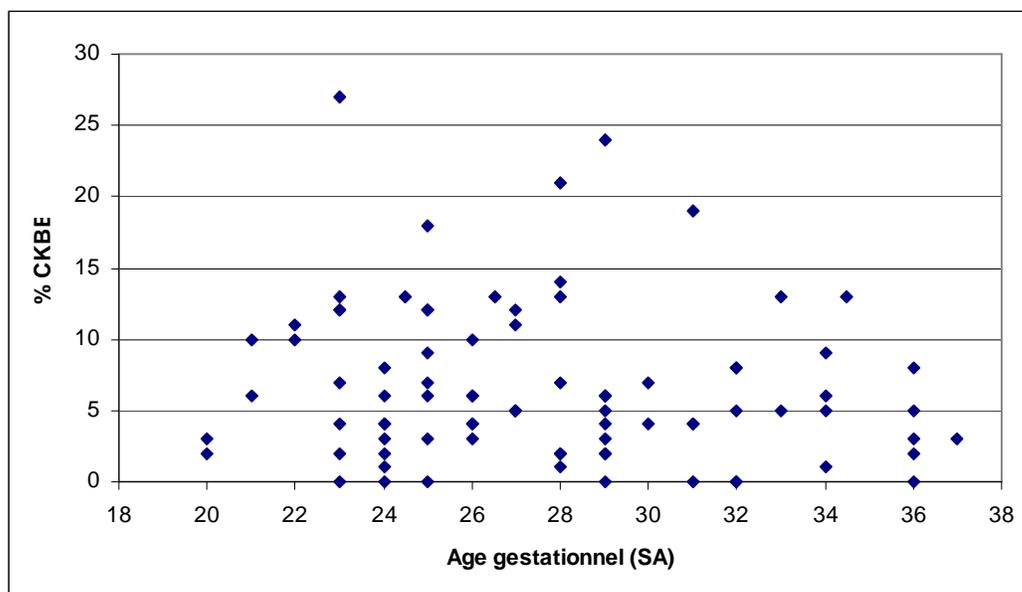


Figure 33 : Variation du pourcentage relatif de l'isoenzyme CKBB (électrophorèse) en fonction de l'âge gestationnel

Les valeurs médianes des isoenzymes de la CK exprimées en pourcentage de l'activité CK totale sont respectivement de 72,5% (valeurs extrêmes 33 -100%) pour la CKMM, de 17% (0-48%) pour la CKMB et 5% (0-27%) pour la CKBB.

	2 ^{ème} trimestre	3 ^{ème} trimestre	Degré de signification p
Effectif	50 (60%)	34 (40%)	
Pourcentage relatif CKMM (%)			
Médiane	70	79	NS
valeurs extrêmes	[33-100]	[54-100]	
Pourcentage relatif CKMB (%)			
Médiane	19	15	NS
valeurs extrêmes	[0-48]	[0-31]	
Pourcentage relatif CKBB (%)			
Médiane	6	5	NS
valeurs extrêmes	[0-27]	[0-24]	

Tableau XXII : Analyse comparative de la distribution des isoenzymes CK en fonction du terme de la grossesse au moment de la ponction de sang foetal (2^{ème} versus 3^{ème} trimestre). (Test de Mann Whitney)

3.2.3. Notion de RCIU

Comme il ne nous pas été possible de recueillir tous les poids des foetus expulsés, nous avons utilisé la notion de RCIU afin d'évaluer indirectement un lien éventuel entre l'activité CK totale et le poids foetal.

Parmi les 84 foetus, 18 présentent un RCIU (dont 12 associé à une anomalie chromosomique et/ou à un syndrome polymalformatif) : 11 ont un RCIU sévère et 7 un RCIU modéré.

Nous ne mettons en évidence aucune différence significative entre les groupes de foetus présentant ou non un RCIU pour l'ensemble des paramètres étudiés (tableau XXIII).

Paramètres	RCIU	Absence de RCIU	Degré de signification (p)
	n = 18 (21%)	n = 66 (79%)	
Age gestationnel (SA)			
médiane	28.5	27	NS
[valeurs extrêmes]	[24 ; 34]	[20,0 ; 37,0]	
Sexe foetal M/F			
	5 / 13	38/28	///
CK totale (UI/L)			
médiane	176,5	153.5	NS
[valeurs extrêmes]	[68 ; 301]	[40 ; 1067]	
CKMB (UI/L)			
<i>dosage par immunoinhibition</i>			
médiane	23.5	23	NS
[valeurs extrêmes]	[12 ; 89]	[9,0 ; 186,0]	
Pourcentage CK MM (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	72	73,5	NS
[valeurs extrêmes]	[57 ; 84]	[33 ; 100]	
Pourcentage CK MB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	13,5	19	NS
[valeurs extrêmes]	[4 ; 29]	[0 ; 48]	
Pourcentage CK BB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	6	5	NS
[valeurs extrêmes]	[1 ; 11]	[0 ; 27]	

Tableau XXIII : Comparaison des paramètres biologiques des foetus répartis en deux groupes selon la présence ou l'absence de RCIU (test de Mann Whitney).

3.2.4. Influence du type de pathologies

Les valeurs médianes de l'activité CK totale, CKMB et des pourcentages des isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB dans les différents groupes sont indiquées dans le tableau XXIV.

Code Pathologie	Effectif	Activité CK totale (UI/L)	Activité CKMB (UI/L)	Pourcentage CKMM (%)	Pourcentage CK MB (%)	Pourcentage CK BB (%)
		médiane [valeurs extrêmes]				
1	5	166 [69 – 1067]	30 [13 – 186]	70 [48 – 83]	19 [14 – 31]	5 [4-27]
2	0	//	//	//	//	//
3	6	175,5 [88 – 409]	25 [14 – 73]	77 [71 – 83]	18 [9 – 23]	6 [2-7]
4	23	187 [60 – 653]	24 [11 – 167]	72 [58 – 97]	19 [3 – 30]	5 [0-18]
5	7	110 [40 – 772]	19 [10 – 147]	73 [63 – 100]	23 [0 – 32]	3 [0-11]
6	1	122	9	92	8	0
7	5	116 [60 – 320]	13 [12 – 54]	76 [54 – 85]	16 [13-23]	8 [0-24]
8	6	191 [96 – 301]	21 [13 – 89]	76 [62 – 84]	15 [8 – 28]	5,5 [2-13]
9	1	52	13	87	6	7
10	25	109 [50 – 550]	19 [10 – 115]	70 [33 – 100]	17 [0 – 48]	8 [0-21]
11	5	165 [74 – 515]	47 [9 – 84]	75 [59 – 100]	13 [0-19]	6 [0-7]

Tableau XXIV : Paramètres biologiques des foetus répartis selon les codes « pathologies »

Globalement, les valeurs médianes de l'activité CK totale dans les différents groupes sont relativement faibles, comprises entre 100 et 200 UI/L. L'analyse statistique (test de

Kruskall Wallis) ne met pas en évidence de différence significative entre les groupes de pathologies pour aucun des paramètres biologiques.

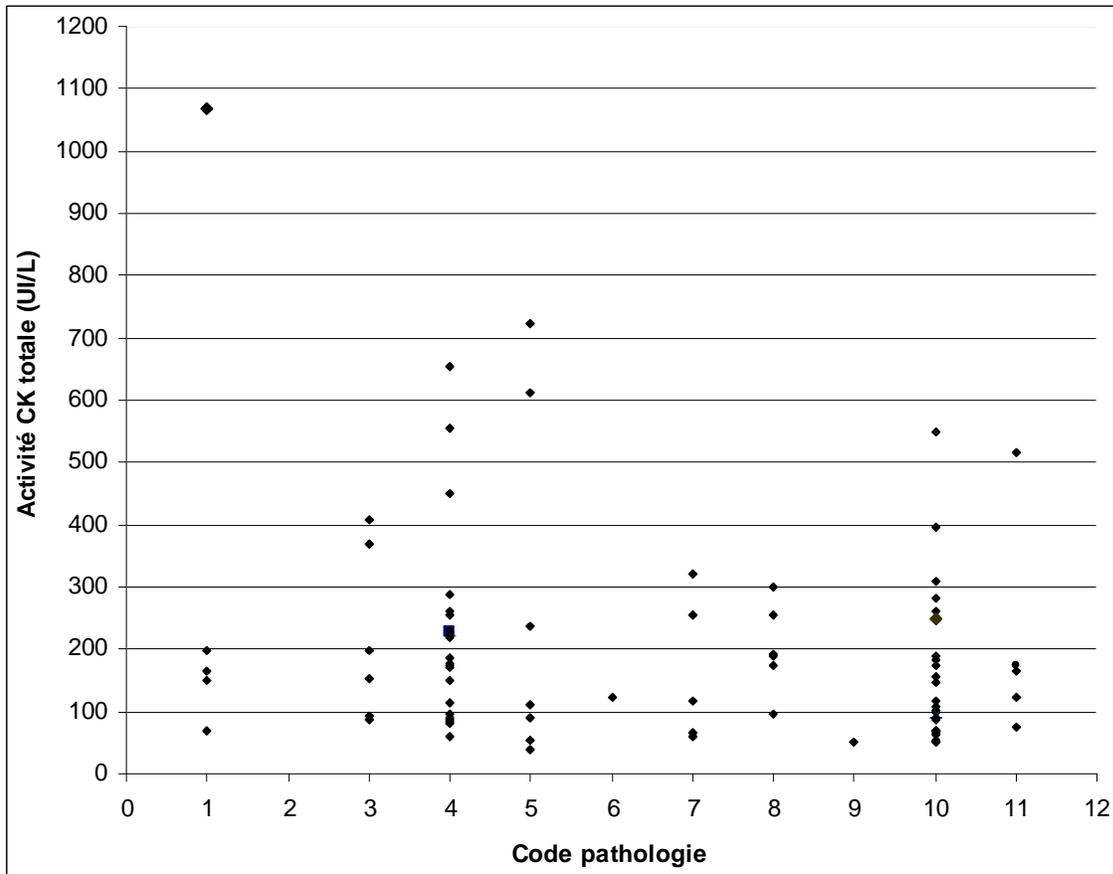


Figure 34 : Distribution des valeurs d'activité CK totale (UI/L) dans chaque groupe de pathologies.

Comme le montre la figure 34, la distribution de l'activité CK totale dans chaque groupe est relativement homogène, les 2/3 des foetus ayant une activité CK inférieure ou égale à 200 UI/L.

Un seul foetus présente une activité CK totale qui est anormalement élevée (1067 UI/L) par rapport à l'ensemble des valeurs mesurées. Il s'agit d'un foetus de 27 SA présentant un oligoamnios secondaire à une RPM précoce (23 SA) dans un contexte de chorioamniotite bactérienne. Or 2 autres foetus de notre cohorte atteints de la même pathologie (RPM à 21 et 22SA) ont quant à eux, une activité CK totale faible respectivement de 150 et 69 UI/L.

La distribution des isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB dans le sang foetal (médianes respectives 72,5% ; 17% ; 5%) ne semble pas varier en fonction du type de pathologies. On note cependant que deux foetus , l'un souffrant d'une alloimmunisation (groupe 6) , l'autre d'une malformation adénomatoïde kystique du poumon (groupe 9) ont une activité CKMM représentant respectivement 92% et 87% de l'activité CK totale donc plus élevé que la médiane. Mais il est impossible de conclure sur un seul cas.

Dans le groupe 5 des malformations cardiaques, l'activité CKMB en valeur absolue et en pourcentage relatif de l'activité CK totale n'est pas supérieure à celle observée dans les autres groupes.

De même dans le groupe 4 des pathologies du SNC, l'activité CKBB n'est pas supérieure à celle observée dans les autres groupes.

3.2.5. Pourcentages relatifs des isoenzymes et activité CK totale

En s'affranchissant du type de pathologies, on peut également se demander si la distribution relative des isoenzymes varie en fonction de l'activité CK totale.

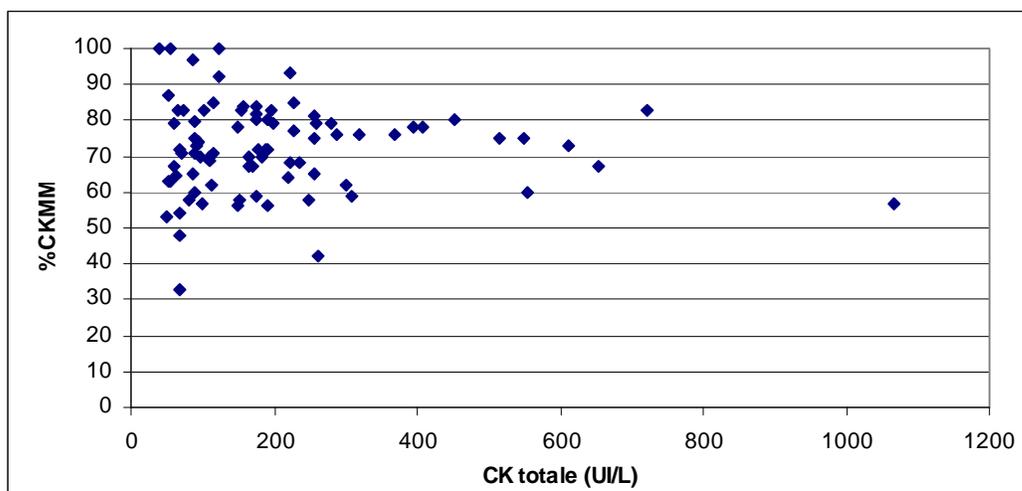


Figure 35 : Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMM en fonction de l'activité CK totale
médiane CKMM : 72,5 (33- 100%)

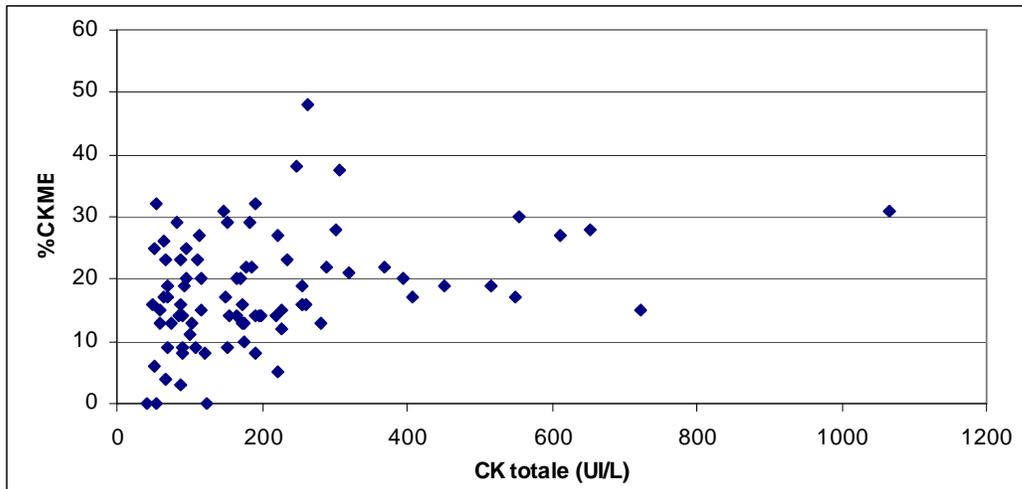


Figure 36 : Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMB en fonction de l'activité CK totale
 médiane CKMB : 17% (0-48%)

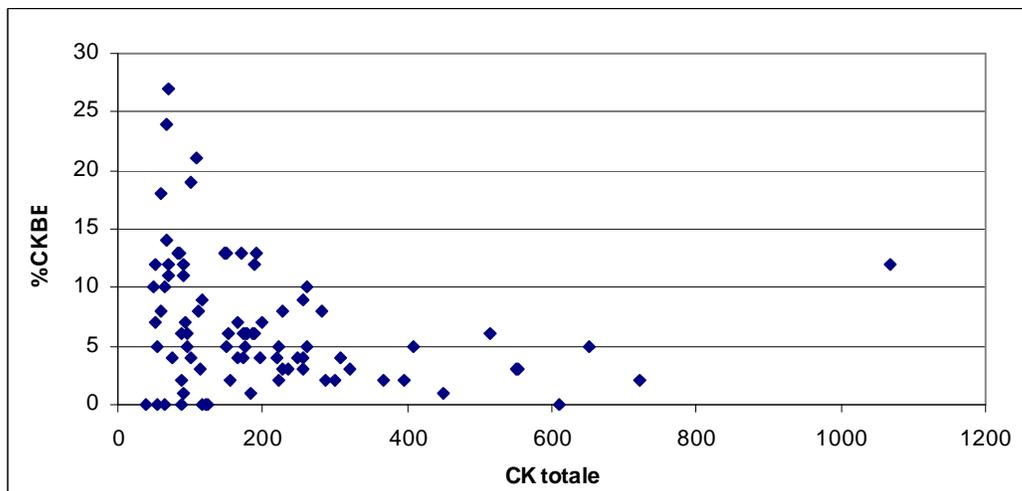


Figure 37 : Pourcentage relatif de l'isoenzyme CKBB en fonction de l'activité CK totale
 médiane CKBB : 5% (0-27%)

Ces 3 graphiques (figures 35, 36, 37) ne montrent pas de corrélation entre le pourcentage d'une isoenzyme donnée et l'activité CK totale et ce quelles que soient les pathologies.

3.3. Etude comparative des foetus avec et sans macroCK

La présence d'une macroCK a été détectée dans le sang foetal et mise en évidence sur 20 profils soit ¼ des profils électrophorétiques interprétables.

3.3.1 Influence de l'âge, du sexe et de la notion de RCIU

L'analyse statistique (tableau XXV) montre que :

- l'âge gestationnel est significativement plus faible chez les foetus avec macroCK
- la répartition selon le sexe foetal est identique dans les 2 groupes.
- la présence d'un RCIU est plus fréquente chez les foetus avec macroCK.

	Profil sans macroCK	Profil avec macroCK	Degré de signification (p)
	n = 64	n = 20	
Age maternel (ans)			
médiane	29	31,5	NS
[valeurs extrêmes]	[17,0 ; 47,0]	[17 ; 44]	
Age gestationnel (SA)			
médiane	28	25,5	p < 0,001
[valeurs extrêmes]	[20,0 ; 36,0]	[22,0 ; 37,0]	
Sexe foetal			
M	32	11	//
F	32	9	//
RCIU	10 (15%)	8 (40%)	p < 0,05*
CK totale (UI/L)			
médiane	172,5	159	NS
[valeurs extrêmes]	[40 ; 1067]	[50 ; 554]	
CKMB (UI/L)			
<i>dosage par immunoinhibition</i>			
médiane	21	27,5	NS
[valeurs extrêmes]	[0 ; 186]	[13 ; 115]	
Pourcentage CK MM (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	76	64,5	p < 0,001
[valeurs extrêmes]	[42 ; 100]	[33 ; 83]	
Pourcentage CK MB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	17	15	NS
[valeurs extrêmes]	[0 ; 48]	[4 ; 30]	
Pourcentage CK BB (%)			
<i>électrophorèse</i>			
médiane	5	5	NS
[valeurs extrêmes]	[0 ; 24]	[1 ; 27]	

Tableau XXV: Description et analyse comparative des foetus avec et sans macroCK
(test de Mann Whitney) * test du Chi-deux avec correction de Yates

3.3.2. Influence de la présence de macroCK sur l'activité CK totale et CKMB

L'activité CK totale de même que l'activité CKMB mesurée par immunoinhibition ne diffèrent pas significativement entre les 2 groupes (Cf tableau précédent XXV), les deux paramètres suivant la même distribution (figures 38 et 39).

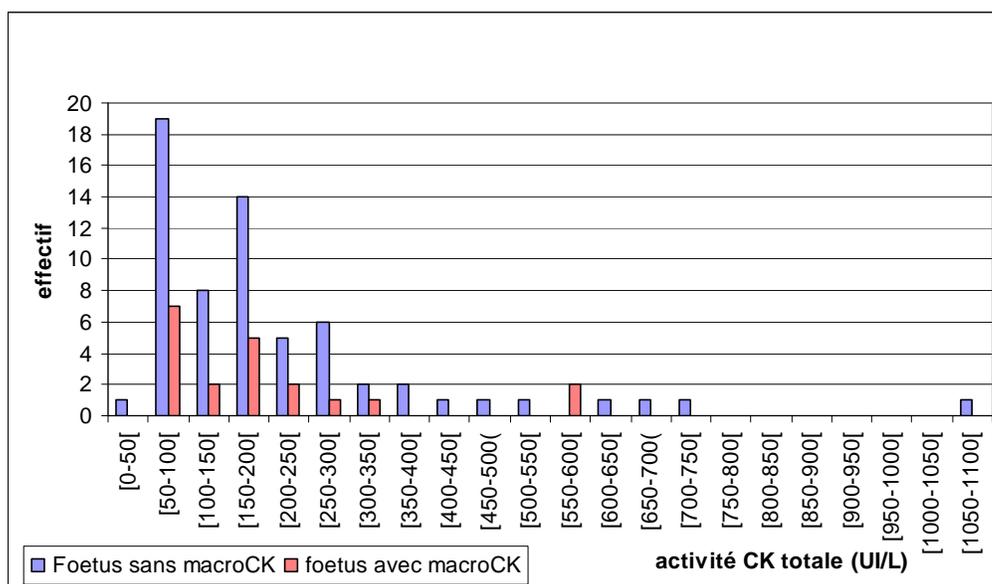


Figure 38 : Distribution des valeurs d'activité CK totale chez les foetus sans (n=64) et avec macroCK (n=20).

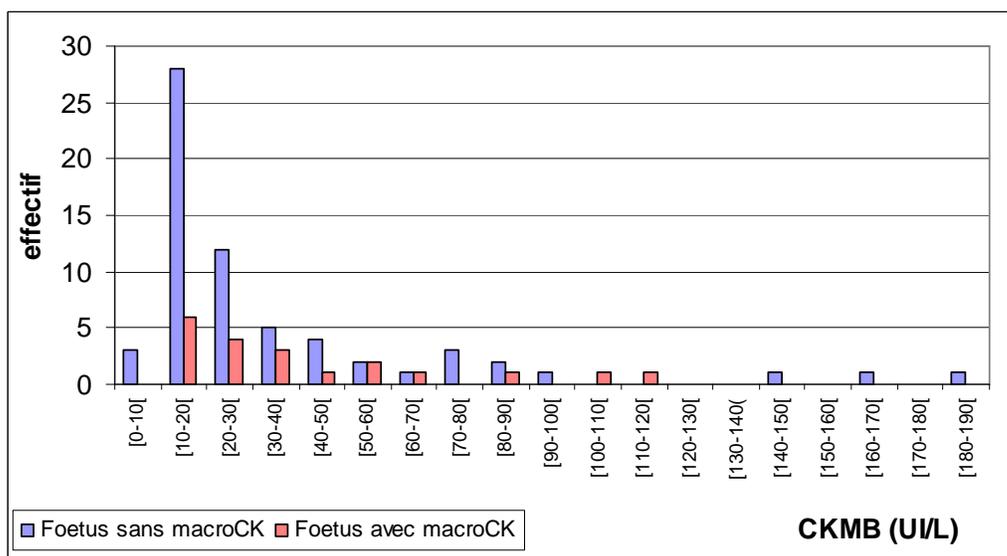


Figure 39 : Distribution des valeurs d'activité CKMB (dosage par immunoinhibition) chez les foetus sans (n=64) et avec macroCK (n=20)

3.3.3 Influence de la présence de macroCK sur la répartition des isoenzymes

En ce qui concerne la distribution des isoenzymes (tableau XXV), on observe une différence uniquement pour l'isoenzyme CKMM qui est plus faible chez les foetus avec macroCK (figures 40, 41, 42)

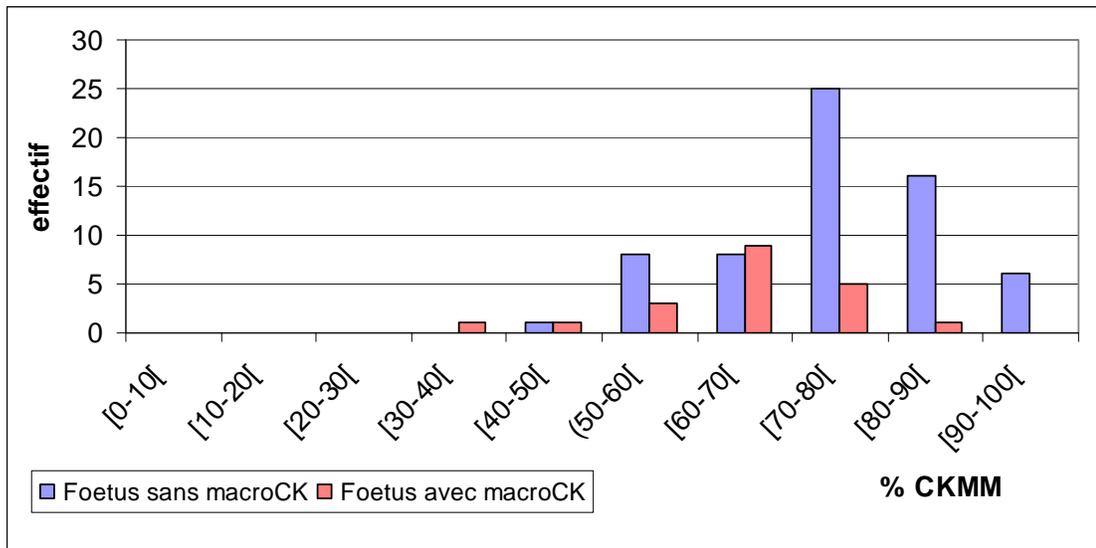


Figure 40 : Distribution du pourcentage relatif de CKMM chez les foetus avec (n=20) et sans macroCK (n=64)

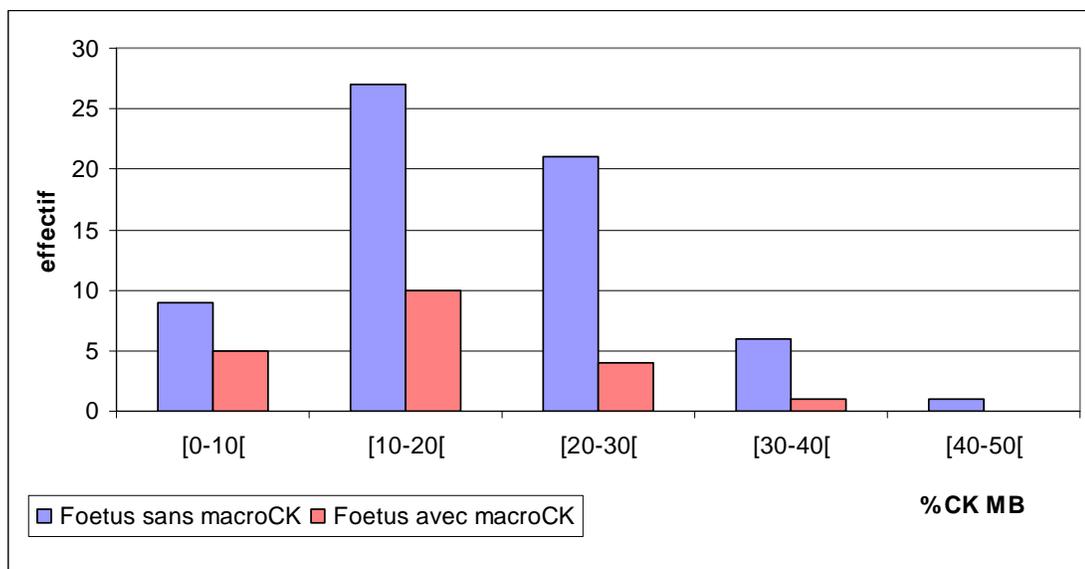


Figure 41 : Distribution du pourcentage relatif de CKMB chez les foetus avec (n=20) et sans macroCK (n=64)

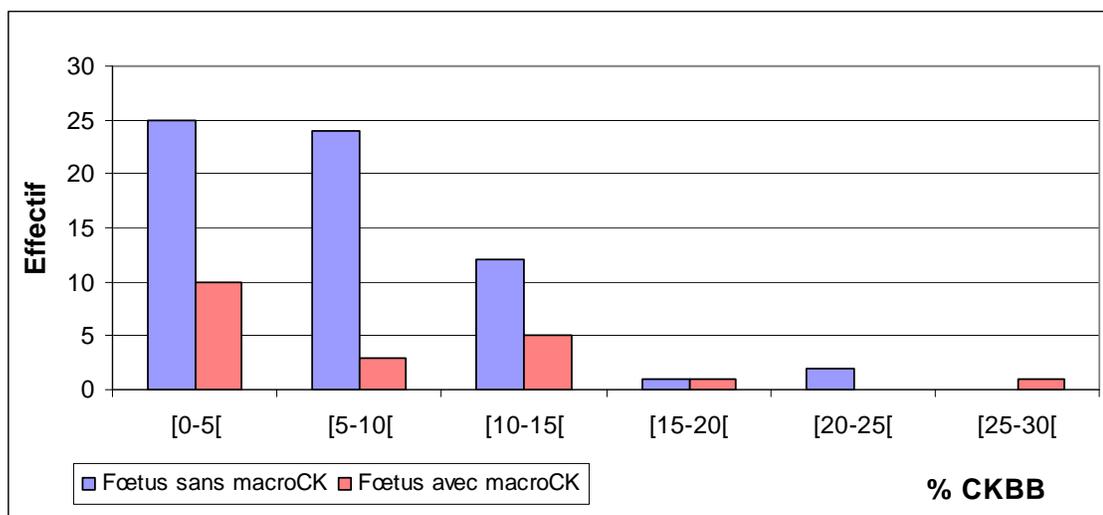


Figure 42 : Distribution du pourcentage relatif de CKBB chez les foetus avec macroCK (n=20) et sans macroCK (n=64)

3.3.4 Relation avec les pathologies fœtales

Afin de comparer des groupes plus homogènes de foetus, nous les avons regroupés selon le code pathologie de l'Agence de la Biomédecine en séparant ceux ayant ou non une macroCK. Le test statistique de Mann Whitney n'a été effectué que pour les groupes 4 et 10, les seuls ayant un effectif statistiquement suffisant.

Dans chacun de ces deux groupes, l'âge gestationnel ne diffère pas significativement. Comme dans la population générale, le pourcentage relatif de CKMM est significativement inférieur ($p < 0,05$) chez les foetus avec macroCK. Par contre, on observe un pourcentage relatif de CKMB inférieur chez les foetus avec macroCK uniquement dans le groupe 10 (annexes 3 et 4).

Les pathologies observées sont similaires dans les 2 groupes (figure 43) avec une prédominance des anomalies du SNC et des anomalies chromosomiques. Par contre aucun foetus atteint de polymalformations (groupe 7) ne présente de macroCK.

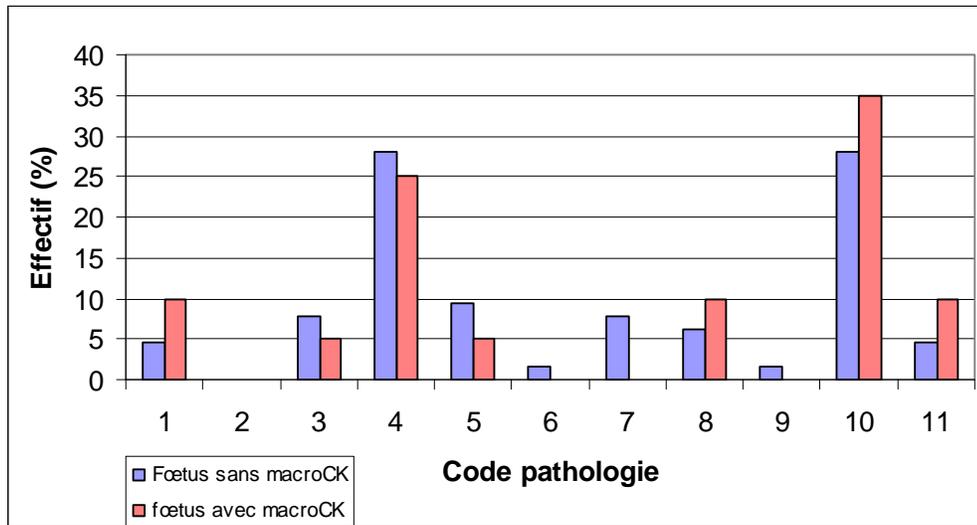


Figure 43 : Répartition des pathologies observées (%) chez les foetus avec et sans macroCK

L'absence de foetus appartenant au groupe 7 dont l'âge gestationnel médian est le plus élevé (32 SA) minore l'âge gestationnel des foetus avec macroCK.

Le descriptif complet des pathologies diagnostiquées figure dans le tableau XXVI.

Code	Groupe de pathologies (effectif total)	Profil sans macroCK n=64		Profil avec macroCK n=20	
		effectif	diagnostic (nombre de cas)	effectif	diagnostic (nombre de cas)
1	pathologies infectieuses (5)	3	- infections maternofoetales bactériennes précoces avec anamnios sans RCIU (2) - infection à <i>Toxoplasma gondii</i> avec lésions cérébrales (1)	2	- infection maternofoetale bactérienne précoce avec anamnios sans RCIU (1) - infection à CMV avec anamnios et RCIU sévère (1)
2	anomalies du tube digestif (0)	0	///	0	///
3	anomalies de l'appareil urinaire (6)	5	- polykystose rénale (3) - dysplasie rénale multikystique bilatérale (1) - uropathie obstructive bilatérale (1)	1	- polykystose rénale (1)
4	anomalies du SNC (23)	18	- myéloméningocèle (7) - ventriculomégalie (1) - agénésie/dysplasie du corps calleux (4) - agénésie/hypoplasie cérébelleuse (3) - agénésie septale avec arthrogrype sévère (1) - encéphalomalacie (1) - kyste arachnoïdien frontal (1)	5	- myéloméningocèle (1) - ventriculomégalie (2) - agénésie du corps calleux (1) - lésions cérébrales ischémohémorragiques (1)
5	anomalies de l'appareil cardiovasculaire (7)	6	- hypoplasies du coeur gauche (3) - cardiopathie complexe (1) - cardiopathie cyanogène (VDDI) (1) - rhabdomyome du ventricule droit (1)	1	- cardiopathie cyanogène (APSO) et hypoplasie artère pulmonaire (1)
6	alloimmunisation (1)	1	AIFM RH1 (1)	0	///
7	polymalformations (5)	5	malformations multiples (5)	0	///
8	RCIU (6)	4	- RCIU d'origine vasculaire avec HELLP syndrome (1) - RCIU d'origine vasculaire (2) - RCIU secondaire à RPM/anamnios (1)	2	- RCIU d'origine vasculaire avec HELLP syndrome (1) - RCIU secondaire à RPM/anamnios (1)
9	anomalies de l'appareil pulmonaire (1)	1	malformation adénomatoïde kystique du poumon (1)	0	///
10	anomalies chromosomiques (25)	18	- trisomie 21 (10) - trisomie 18 (3) - tétrasomie 15p11-q13 (1) - délétion 22q11 (1) - délétion 21q22.3 (1) - maladie de l'X fragile (1) - sclérose tubéreuse de Bourneville (1)	7	- trisomie 21 (4) - trisomie 18 (2) - trisomie 5 partielle en mosaïque (1)
11	autres (5)	3	- immobilisme foetal (1) - chondrodysplasie (1) - prééclampsie sévère (1)	2	-RPM précoce avec anamnios sans RCIU (2)

Tableau XXVI : Description des pathologies observées chez les fœtus sans et avec macroCK.

En analysant de façon détaillée les données du tableau XXVI, nous cherchons à répondre à la question suivante : la présence de macroCK est-elle spécifique d'une pathologie ?

Sur l'ensemble des 84 foetus, 19 représentent un cas unique de pathologie parmi celles référencées, ce qui ne permet pas de conclure quant à la signification de la présence éventuelle d'une macroCK.

- infection à CMV
- infection à *Toxoplasma gondii*
- uropathie obstructive bilatérale
- lésions cérébrales ischémohémorragiques
- arthrogrypose
- encéphalomalacie
- kyste arachnoïdien frontal
- rhabdomyome du ventricule droit
- AIFM
- malformation adénomatoïde kystique du poumon
- immobilisme foetal
- chondrodysplasie
- prééclampsie
- anomalies chromosomiques et/ou génétiques (6) : tétrasomie 15, délétion 22q11, délétion 21q22.3, maladie de l'X fragile, sclérose tubéreuse de Bourneville, trisomie 5 partielle.

Pour les 65 autres cas on constate :

- dans **le groupe des pathologies infectieuses** : sur 3 cas de RPM survenues à des âges gestationnels voisins dans un contexte de chorioamniotite sans RCIU, un seul foetus présente une macroCK.

- **dans le groupe des anomalies de l'appareil urinaire** : 4 foetus sont atteints de polykystose rénale mais un seul présente une macroCK.

Nous rapportons le cas d'une patiente enceinte en 2008 et 2009 dont les deux foetus présentaient une polykystose rénale : une macroCK n'a été mise en évidence que pour l'un d'entre eux ce qui laisse penser que la pathologie n'est pas en cause.

- **dans le groupe des pathologies du SNC** : la présence de macroCK n'est spécifique ni d'un myéloméningocèle (1 cas sur 8) ni d'une agénésie du corps calleux (1 cas sur 5).

On n'observe pas de macroCK chez les 3 foetus atteints d'agénésie cérébelleuse.

- **dans le groupe des anomalies cardiovasculaires** : une macroCK de type 1 est mise en évidence chez un seul des 6 fœtus porteurs de malformations du cœur et/ou des gros vaisseaux.

- **dans les cas de RCIU** d'étiologie soit vasculaire soit secondaire à un RPM, la présence de macroCK n'est pas significative (1/4 cas de RCIU d'origine vasculaire et 1 /2 cas de RCIU sur RPM).

- **dans les cas d'anomalies chromosomiques** : sur l'ensemble des 20 fœtus ayant une macroCK, 35% sont porteurs d'une anomalie chromosomique et/ou génétique mais sans spécificité retrouvée.

→ 14 fœtus sont porteurs d'une trisomie 21 : 4 présentent une macroCK, dont 3 sans anomalies associées et 1 avec RCIU, cardiopathie, et malformations cérébrales.

→ 5 fœtus sont porteurs d'une trisomie 18 (anomalie toujours associée à d'autres malformations en particulier cardiaques) : seuls 2 fœtus ont une macroCK.

3.3.5 Signes cliniques d'appel

En l'absence de lien entre une pathologie donnée et la présence de macroCK, nous avons cherché à savoir si l'existence d'un signe clinique commun pouvait expliquer la détection de macroCK :

- oligoamnios ou anamnios (n=16) : 8 fœtus présentent une macroCK

- hydramnios (n=4) : 2 fœtus présentent une macroCK

- existence d'une ventriculomégalie (n=15) : quelle que soit l'étiologie principale, elle s'accompagne d'une macroCK chez seulement 4 fœtus

Sachant que des macroCK ont été décrites chez des fœtus en état de souffrance cérébrale hypoxique, nous avons regroupé les fœtus de notre cohorte pour lesquels l'analyse anatomopathologique placentaire montrait des anomalies de type infarctus. Une macroCK n'a été mise en évidence que dans 4 cas sur 13.

Résumé :

L'ensemble des profils électrophorétiques interprétables, réalisés sur 4 années, constitue une cohorte de 84 foetus

- ***de sexe ratio égal à 1***
- ***d'âge gestationnel variant de 20 à 37 SA, soit $\frac{3}{4}$ des ponctions réalisées au 2^{ème} trimestre et $\frac{1}{4}$ au 3^{ème} trimestre***
- ***dont les pathologies les plus fréquemment observées sont les anomalies chromosomiques (31%) et les anomalies du SNC (27%).***

L'activité CK totale et CKMB (immunoinhibition) ainsi que la distribution des isoenzymes dans le sang foetal (en moyenne 72,5% de CKMM, 17% de CKMB, 5% de CKBB) ne varie pas selon :

- ***le sexe***
- ***l'âge gestationnel***
- ***l'existence ou non d'un RCIU***
- ***la pathologie.***

La présence de macroCK de type 1 est détectée chez $\frac{1}{4}$ des foetus.

Aucune macroCK de type 2 n'a été mise en évidence dans notre cohorte.

L'analyse comparative des foetus avec et sans macroCK 1 montre que :

- ***l'âge gestationnel est plus faible chez les foetus avec macroCK (25,5 SA versus 28SA)***
- ***la répartition selon le sexe est identique***
- ***l'activité CK totale et CKMB (immunoinhibition) ne diffèrent pas significativement dans les 2 groupes***
- ***seul le pourcentage relatif de l'isoenzyme CKMM est plus faible chez les foetus avec macroCK***
- ***les pathologies observées sont similaires dans les 2 groupes à l'exception de l'absence de macroCK chez les foetus polymalformés.***

4. Etude des foetus présentant une macroCK (n=20)

4.1. Caractéristiques épidémiologiques : sexe, âge gestationnel, pathologie

Parmi les 84 échantillons de sang foetal, l'électrophorèse a mis en évidence une macroCK de type 1 chez 20 foetus soit une prévalence de 23,8%.

Elle est détectée aussi bien chez des foetus de sexe masculin (n=11) que féminin (n=9) et à des âges gestationnels variant de 22 à 37 SA (médiane 25,5 ans).

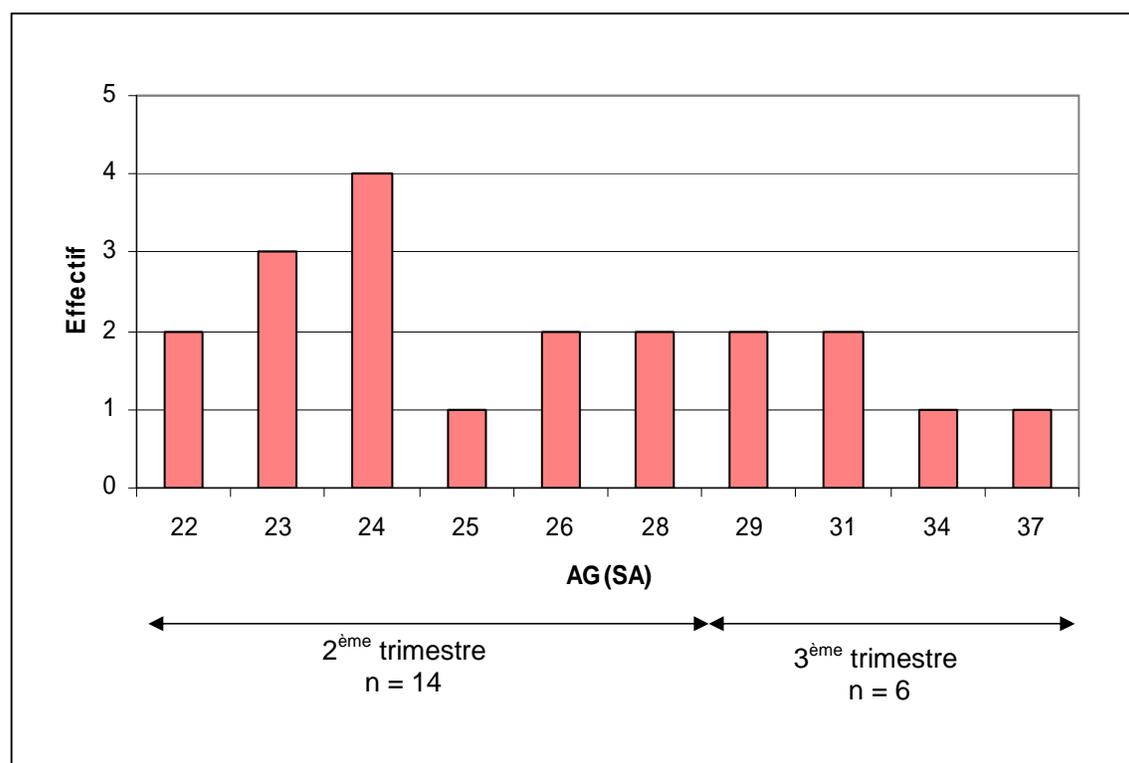


Figure 44 : Répartition des foetus avec présence de macroCK 1 en fonction de l'âge gestationnel

La présence de macroCK de type 1 est constatée dans la quasi totalité des groupes de pathologies et ne peut pas être reliée à l'existence d'une pathologie foetale grave particulière.

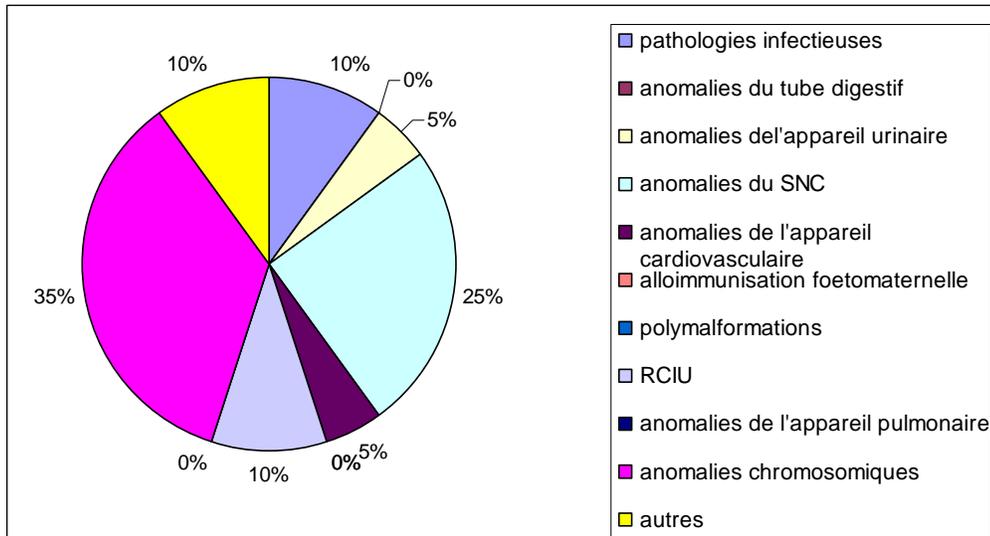


Figure 45 : Répartition des foetus avec macroCK selon le code pathologie de l'Agence de la Biomédecine

Les caractéristiques biologiques et cliniques des foetus sont détaillées dans le tableau en annexe 5.

4.2. Lien entre activité CK totale et présence de macroCK

Dans notre groupe de foetus avec macroCK, l'activité CK totale est relativement faible variant de 50 à 554 UI/L avec une valeur médiane à 159 UI/L et 72% des foetus ont une activité CK totale < 200 UI/L (figure 46).

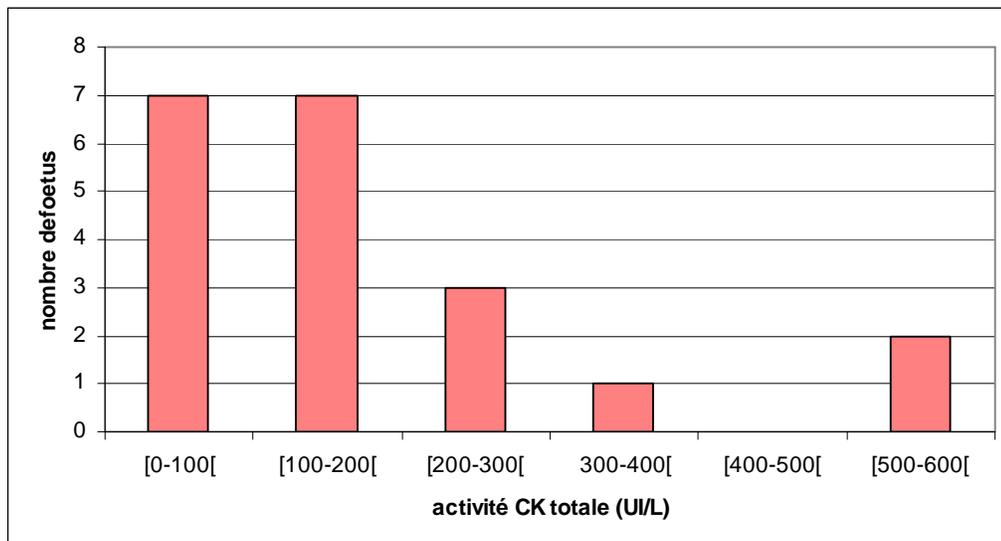


Figure 46 : Répartition des foetus avec macroCK en fonction de l'activité CK totale

Statistiquement, l'activité CK totale ne diffère pas selon la présence ou l'absence de macroCK et une répartition identique des valeurs de CK totale est observée dans la population générale des 84 foetus, dans le groupe des foetus sans macroCK et dans le groupe des foetus avec macroCK (figure 47).

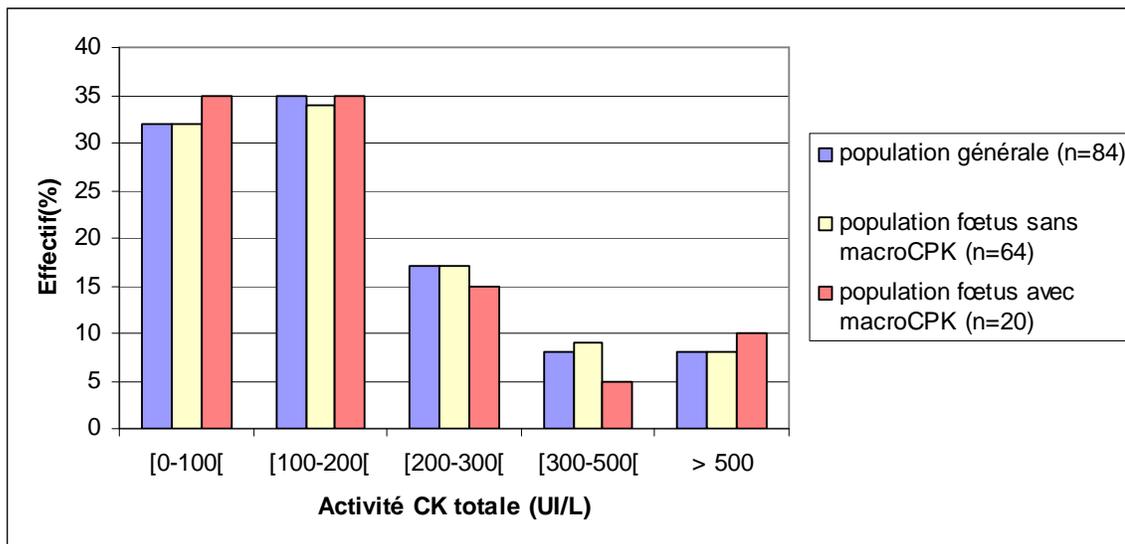


Figure 47 : Distribution de l'activité CK totale chez l'ensemble des foetus étudiés, chez les foetus sans et avec macroCK.

La présence de macroCK n'entraîne donc pas constamment une élévation de l'activité CK totale.

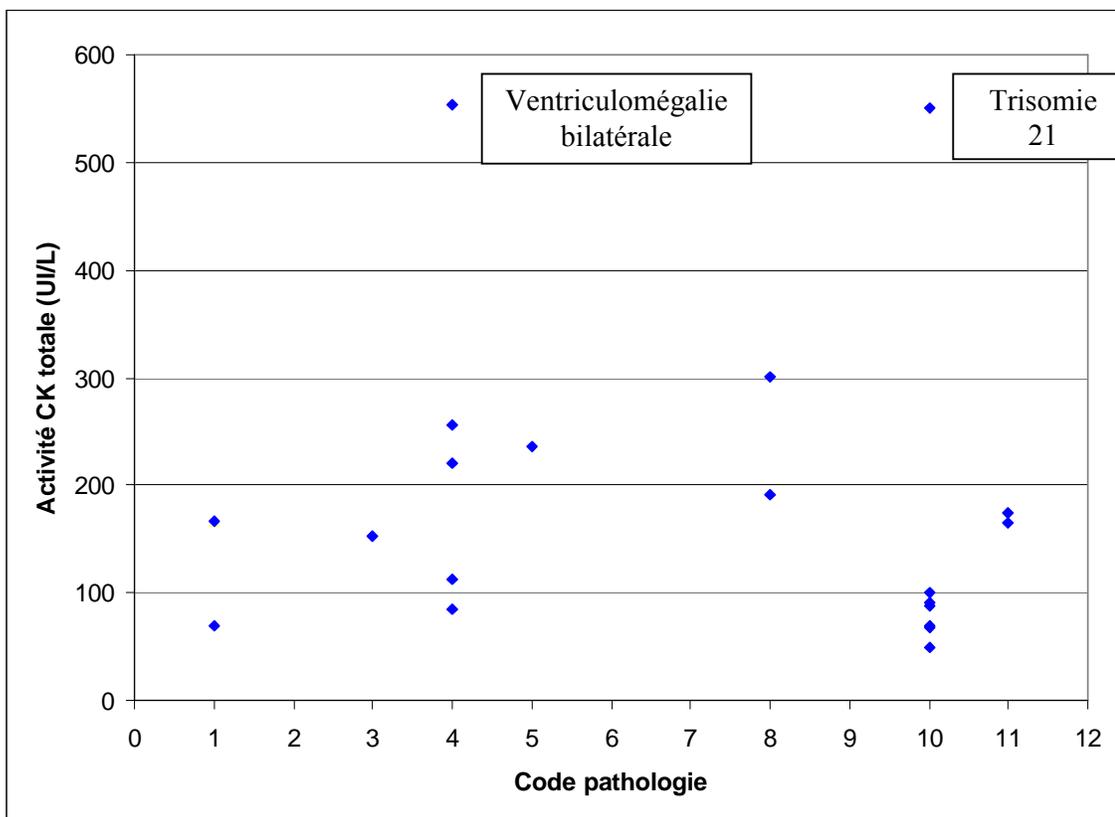


Figure 48 : Répartition de l'activité CK totale en fonction du code pathologie

Les 2 cas avec activité CK totale entre 500 et 600 UI/L correspondent à un fœtus âgé de 24 SA atteint de trisomie 21 et un fœtus âgé de 37 SA présentant une ventriculomégalie bilatérale. Ces valeurs élevées ne semblent pas en rapport avec une pathologie particulière puisque nous avons 3 autres fœtus atteints de trisomie 21 dont l'activité CK est inférieure à 100 UI/L (les pourcentages relatifs de macroCK sont par ailleurs plus élevés respectivement 26%, 10% et 4% versus 5%) et un autre de cas de ventriculomégalie isolée chez un fœtus de 28 SA avec une activité CK à seulement 256 UI/L (la macro CK représentant 7% de l'activité totale).

Contrairement à ce qu'on pourrait penser compte tenu de l'interférence analytique, l'activité CK totale n'augmente pas parallèlement au pourcentage de macroCK (Figure 49).

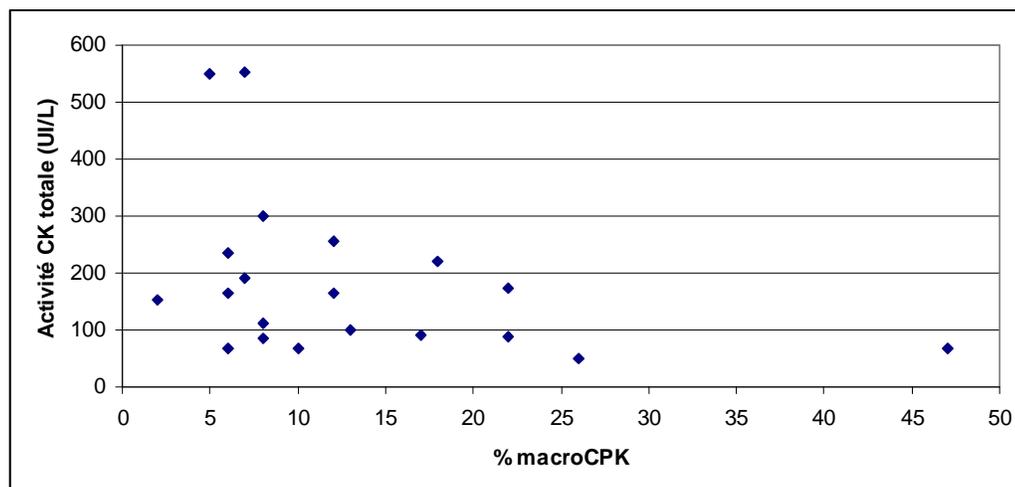


Figure 49 : Variation de l'activité CK totale en fonction du pourcentage relatif de macroCK

4.3. Pourcentage de macroCK & sexe, âge gestationnel, pathologie foetale

4.3.1. Répartition des pourcentages de macroCK

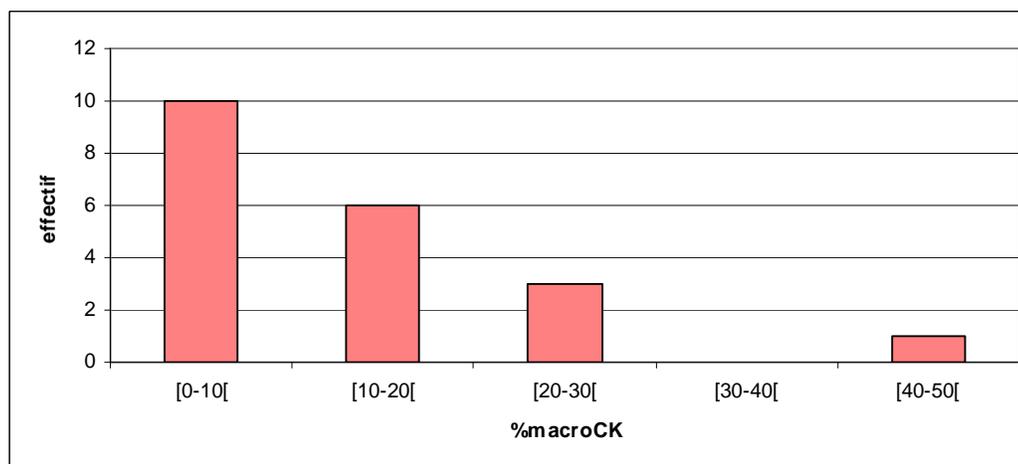


Figure 50 : Répartition des foetus en fonction du pourcentage de macroCK

- 50% des foetus ont une macroCK inférieure à 10% de l'activité CK totale (valeur minimale détectée 2% chez un foetus de 29 SA atteint de polykystose rénale).
- 30% des foetus ont une macroCK représentant entre 10 et 20% de l'activité CK totale.
- 20% présentent une macro CK supérieure à 20% avec une valeur maximale à 47% (cas d'un foetus de 22 SA atteint de trisomie 21).

4.3.2. Relation avec le sexe foetal

Les valeurs médianes du pourcentage de macroCK sont respectivement de

8% chez les foetus de sexe masculin (valeurs extrêmes : 2-22%)

12% chez les foetus de sexe féminin (valeurs extrêmes : 5-47%).

Il n'y a donc pas de différence significative selon le sexe du foetus (test de Mann Whitney au risque de 5%)

4.3.3. Relation avec l'âge gestationnel

D'après le graphique (figure 51), il n'y a pas de relation entre le pourcentage de macroCK et l'âge gestationnel.

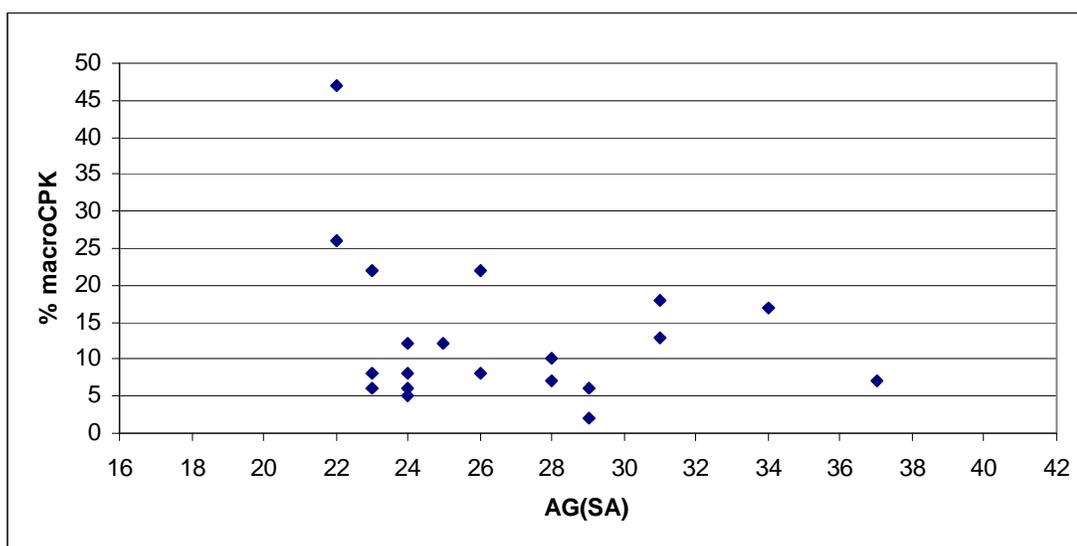


Figure 51 : Répartition du pourcentage de macroCK en fonction de l'âge gestationnel

4.3.4. Relation avec la pathologie foetale

On n'observe pas de différence significative entre les pourcentages relatifs de macroCK dans un groupe par rapport aux autres (figure 52). A noter une répartition plus hétérogène dans le groupe 10.

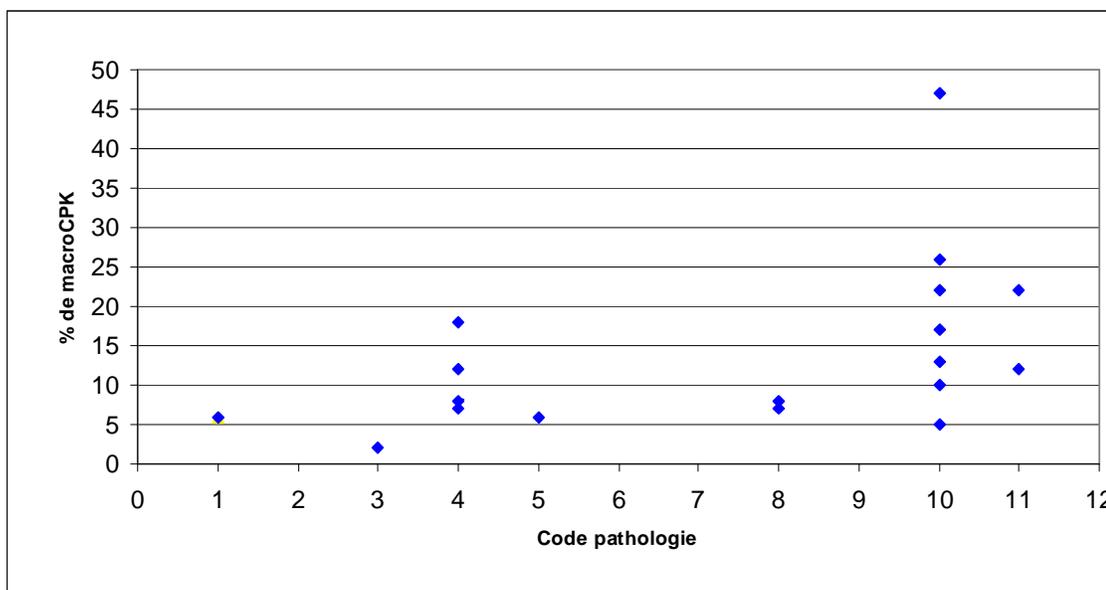


Figure 52 : Répartition du pourcentage de macroCK en fonction du code pathologie

4.4. Interférence liée à la présence de macroCK sur la mesure de l'activité CKMB par technique d'immunoinhibition :

Dans les cas où la présence de macroCK a été identifiée, l'activité CKMB dosée par immunoinhibition n'a jamais été retrouvée supérieure à l'activité CK totale.

Seul un cas (cas n° 14) où l'activité CKMB représente 90% de l'activité CK totale fait suspecter la présence d'une interférence confirmée par l'électrophorèse qui met en évidence une macroCK de type 1 à 47% et une répartition des isoenzymes CK MM, MB et BB respectivement à 33%, 9% et 11%.

Les pourcentages de CKMB déterminés par immunoinhibition et par électrophorèse sont significativement différents (test de Wilcoxon, $p < 0,01$), le dosage par immunoinhibition donnant des résultats supérieurs comme l'illustre le diagramme de Bland et Altman (Figure 53). Dans 8 cas sur 20, on observe une différence absolue de plus de 10% entre le pourcentage de CKMB mesuré par immunoinhibition et le pourcentage déterminé à partir de l'électrophorèse.

Il existe une corrélation linéaire positive entre l'activité CK mesurée par immunoinhibition (correspondant à la totalité de l'activité CK exprimée par les sous-unités non M) et le pourcentage de macroCK (figure 53). L'interférence analytique est d'autant plus importante que le pourcentage de macroCK est élevé.

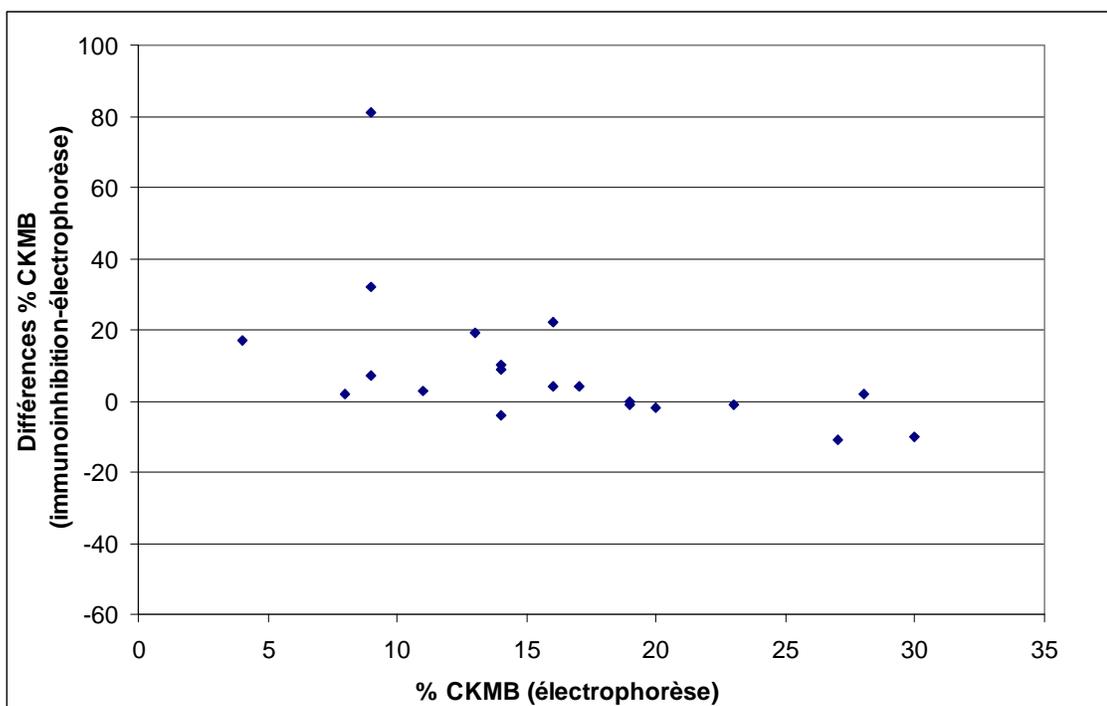


Figure 53 : Comparaison des pourcentages de CKMB mesurés par technique d'immunoinhibition et par électrophorèse (méthode des différences)

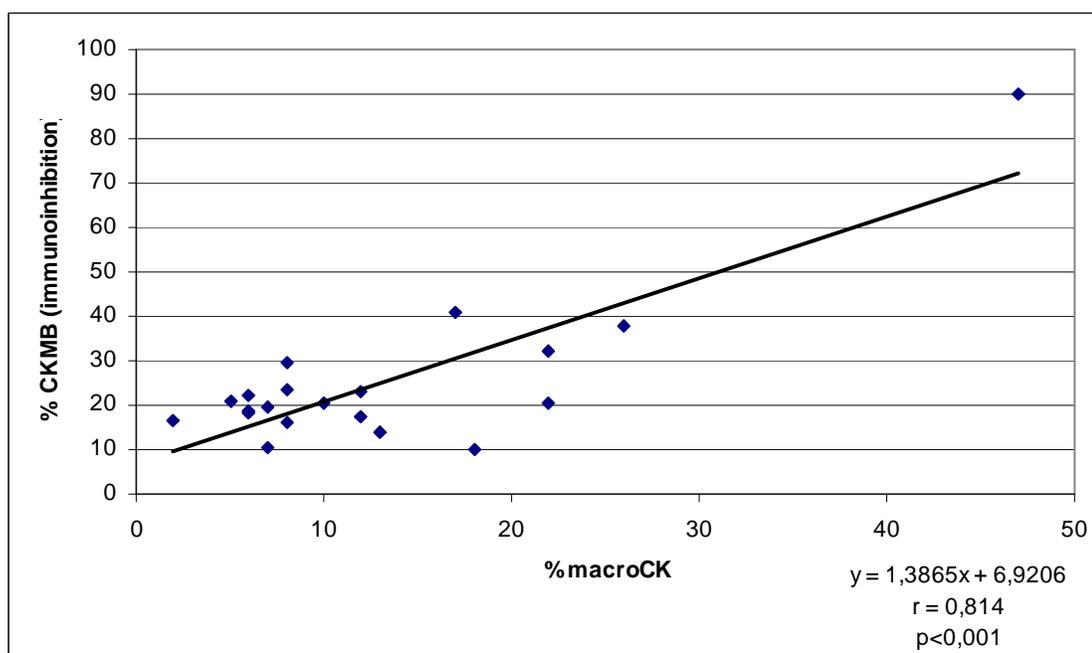


Figure 54 : Activité CKMB (dosage par immunoinhibition) en pourcentage de l'activité CK totale en fonction du pourcentage de macroCK

Cependant dans 10 cas sur 20, les pourcentages déterminés par les deux méthodes sont équivalents et dans 2 cas le pourcentage déterminé par l'électrophorèse est même supérieur à celui du dosage par immunoinhibition.

4.5. Présence de macroCK et détermination des isoenzymes CK

On constate une corrélation linéaire négative significative ($p < 0,001$) entre le pourcentage de CKMM et le pourcentage de macroCK comme le montre le graphique de la figure 55.

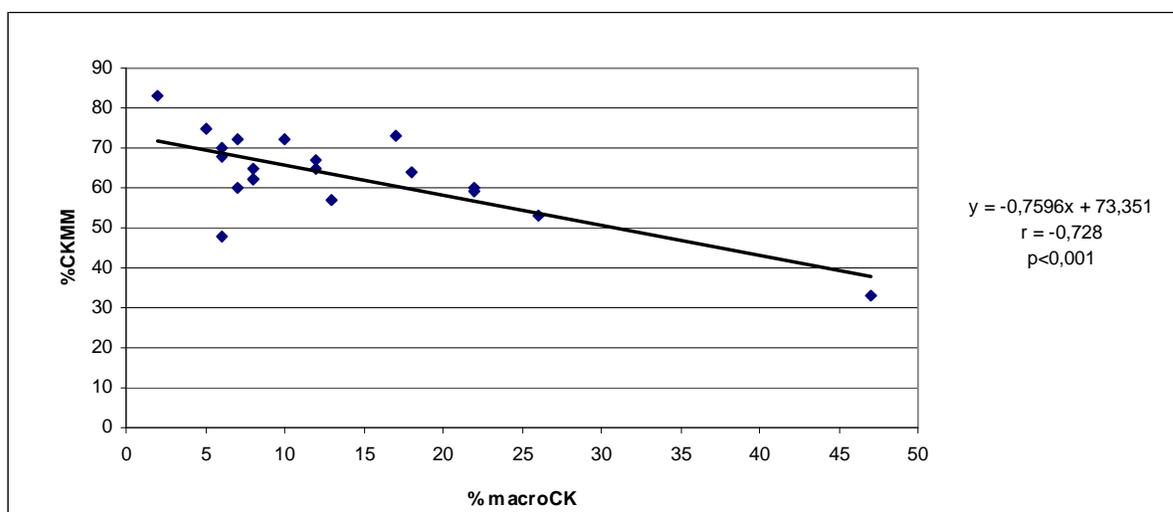


Figure 55 : Variation du pourcentage de CKMM en fonction du pourcentage de macroCK

Au contraire, les pourcentages des autres isoenzymes CKMB et CKBB ne semblent pas varier d'une quelconque façon avec le pourcentage de macroCK, comme l'illustrent les figures 55 et 56.

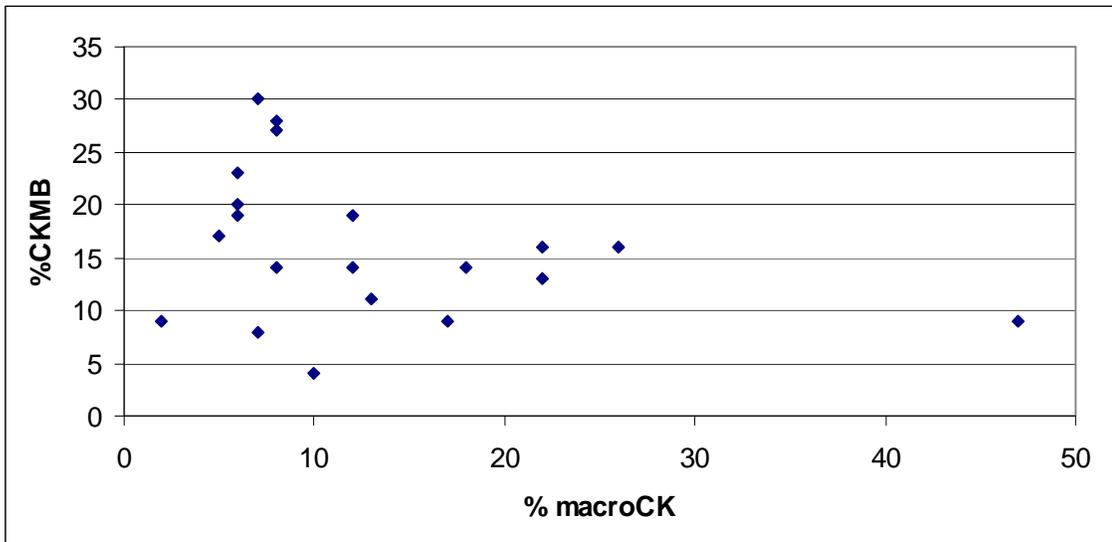


Figure 56 : Variation du pourcentage de CKMB en fonction du pourcentage de macroCK

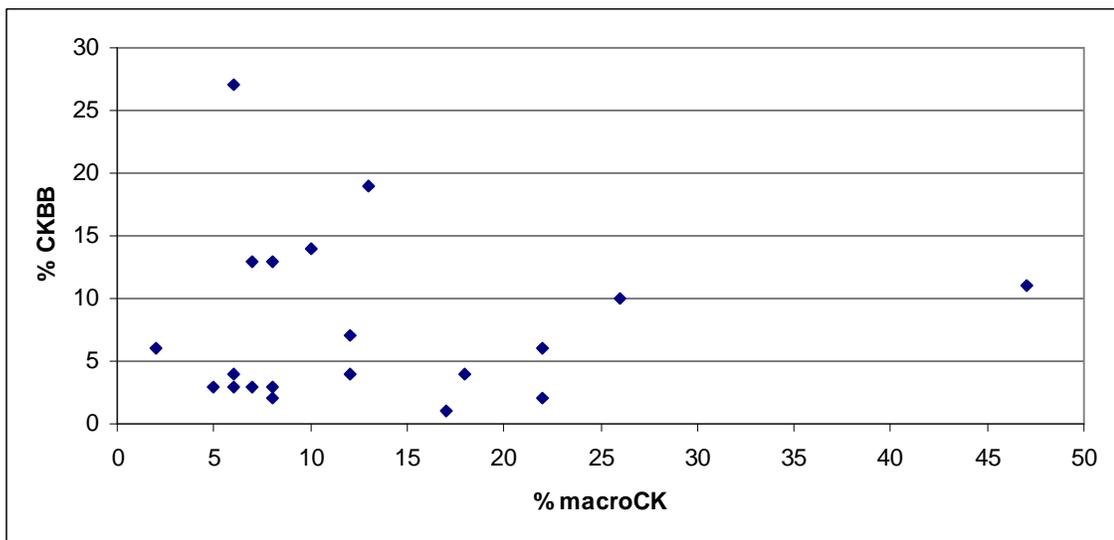


Figure 57 : Variation du pourcentage de CKBB en fonction du pourcentage de macroCK

En résumé :

- **Une électrophorèse des isoenzymes CK est réalisable sur du sang foetal malgré la très faible prise d'essai (30µL de sérum)**
- **Le profil électrophorétique est caractérisé par un léger décalage à gauche des bandes correspondantes aux 3 isoenzymes (MM, MB et BB) d'origine humaine (sang adulte et sang foetal) par rapport à celles du contrôle de qualité interne constitué d'isoenzymes CK d'origine animale.**
- **Dans le système électrophorétique Hélène Biosciences®, l'hémolyse est responsable d'un artefact visible sur le profil sous la forme d'un épaulement situé à droite du pic de la CKMM, pouvant être confondu avec l'existence d'une macroCK de type 1.**
- **Parmi les 116 profils de sangs foetaux analysés, 18 sont ininterprétables en raison de la présence d'albumine en grande quantité qui interfère dans la séparation électrophorétique des isoenzymes.**
- **La présence de macroCK de type 1 est**
 - ✓ **détectée chez ¼ des foetus, toutes pathologies confondues**
 - ✓ **indépendante du sexe foetal : sexe ratio égal à 1**
 - ✓ **sans relation avec l'âge gestationnel : les foetus sont âgés de 22 à 37 SA, 2/3 des ponctions de sang foetal ayant été réalisées au 2^{ème} trimestre de grossesse et 1/3 au 3^{ème} trimestre ; la répartition est identique dans la population générale.**
 - ✓ **détectée dans des cas d'activité CK totale faible : ¾ des foetus ayant une macroCK ont une activité CK totale inférieure à 200 UI/L (85% <300UI/L). A noter que la répartition des valeurs d'activité CK totale est identique dans la population générale des 84 foetus et dans la population des 64 foetus sans macroCK (CK totale < 200UI/L chez 2/3 des foetus et < 300UI/L chez 83% des foetus)**
 - ✓ **non corrélée à une pathologie foetale particulière.**

- ***Le pourcentage de macroCK :***
 - ✓ ***varie entre 2% et 47% de l'activité CK totale : macroCK < 10% chez 50% des foetus, compris entre 10 et 20% chez 30% des foetus et >20% chez 20% des foetus***
 - ✓ ***ne diffère pas selon le sexe du foetus : le pourcentage médian de macroCK est de 8% chez les foetus de sexe masculin (2-22%) et de 12 % chez les foetus de sexe féminin (5-47%)***
 - ✓ ***est sans relation avec l'âge gestationnel***
 - ✓ ***est sans relation avec l'activité CK totale***
 - ✓ ***ne diffère pas selon le type de pathologie***

- ***En présence de macroCK, l'activité CKMB exprimée en pourcentage de l'activité CK totale est différente selon la méthode de dosage utilisée : immunoinhibition versus électrophorèse :***
 - ✓ ***Le dosage par immunoinhibition surestime le pourcentage de CKMB : une différence absolue de plus de 10% est observée dans 8 cas sur 20.***
 - ✓ ***il existe une corrélation linéaire positive entre le % de CK MB déterminé par immunoinhibition et le % de macroCK.***

- ***Il existe une corrélation linéaire négative entre le pourcentage de CKMM déterminé par électrophorèse et le pourcentage de macroCK.***

C. DISCUSSION

La biochimie foetale constitue un domaine très particulier de la biologie qui a connu un essor considérable grâce à la mise au point de la technique de ponction de sang foetal au cordon mais se heurte à certaines contraintes inévitables :

- le caractère invasif de la cordocentèse, geste non dénué de complications potentielles pour le foetus, ce qui en restreint les indications
- les faibles quantités de sang foetal prélevées, ce qui impose l'utilisation de microméthodes de dosage et limite le nombre de paramètres pouvant être analysés simultanément sur le même échantillon
- l'impossibilité pour des raisons éthiques, de prélever du sang chez des foetus sains afin d'établir des valeurs biologiques de référence.

L'ensemble de ces éléments explique la rareté des études cliniques réalisées chez les foetus et pose la question de savoir quels paramètres biologiques présentent un intérêt dans l'aide au diagnostic des pathologies foetales, à leur évaluation pronostique et à la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Toutes ces études ne peuvent se faire qu'en collaboration étroite avec les services de médecine foetale.

Dans le sang foetal, seules quelques études se sont intéressées à l'évaluation de la créatine kinase.

Des interférences potentielles lors du dosage de l'activité enzymatique de la CK avec risque d'erreurs d'interprétation des résultats ont été décrites : l'une d'entre elles concerne la présence de macroenzymes circulantes de poids moléculaire supérieur aux enzymes normales. Ces molécules résultent de modifications post-traductionnelles (liaison à une Ig ou autoaggrégation) mais ni le mécanisme à l'origine de la formation de ces complexes ni leur signification physiopathologique ne sont à l'heure actuelle parfaitement élucidés. Leur présence ne peut être détectée qu'au décours de l'électrophorèse permettant la séparation et l'identification des isoenzymes MM, MB et BB.

A notre connaissance la présence de macroCK n'a pas été décrite dans le sang foetal contrairement aux observations faites chez les adultes, les enfants et les nouveaux-nés.

L'évaluation de l'activité CK dans le sang de fœtus ne peut donc pas être envisagée sans électrophorèse des isoenzymes et recherche de macroCK, en particulier lorsque les fœtus sont atteints de pathologies extrêmement graves.

1. Population

L'étude que nous avons réalisée concerne l'analyse rétrospective de 135 échantillons de sang foetal reçus au laboratoire de biochimie et biologie moléculaire de l'hôpital Central au cours des années 2008, 2009, 2010 et 2011 pour évaluation de paramètres sanguins dont l'activité CK et l'électrophorèse des isoenzymes. Notre travail concerne tous les prélèvements de sang foetal adressés au laboratoire, sans critère de sélection préalable.

Sur la période d'étude, le nombre de dossiers soumis à l'avis du CPDPN est relativement constant d'une année sur l'autre, avec en moyenne 360 dossiers par an. Une autorisation d'IMG a été délivrée pour la moitié d'entre eux. Un prélèvement de sang foetal n'a été réalisé que dans un cas sur 5 des interruptions de grossesse. La faible proportion d'échantillons de sang foetaux reçus au laboratoire par rapport au nombre d'IMG peut s'expliquer par :

- la réalisation de la majorité des IMG dans des établissements extérieurs au CHU de Nancy,
- le refus de prélèvement de sang par les parents
- l'absence de prescription d'analyses biologiques, non indiquées pour la pathologie foetale en cause.

Sur les 4 années d'étude, on observe une diminution du nombre de prélèvements de sang foetal effectués, sans relation avec le nombre d'IMG autorisées : ils représentent un quart des IMG en 2008 et 2009 puis seulement 15% et 10% respectivement en 2010 et 2011. Cette diminution pourrait s'expliquer par la pluralité des opérateurs et le dépistage plus précoce de la trisomie 21 au 1^{er} trimestre permettant une IMG par aspiration avant 15 SA.

Sur les 135 échantillons reçus, les dosages de CK totale, CKMB et /ou l'électrophorèse des isoenzymes n'ont cependant pas pu être réalisés dans 19 cas en raison soit d'une absence de prescription médicale soit d'une quantité insuffisante de sérum expliquée par :

- le faible volume de sang foetal prélevé
- la nécessité de respecter l'ordre de priorité des prescriptions établie par le médecin
- le volume mort nécessaire à chaque analyse réalisée sur les automates Olympus AU 640 (50µL) et Access (80µL).

L'électrophorèse étant parfois réalisée en dernier lieu, selon la quantité de sérum restante, il n'est donc pas toujours possible d'effectuer 2 ou 3 dépôts d'échantillon voire même un seul.

Notre cohorte initiale ainsi constituée ne comporte pas :

- de population témoin de foetus sains
- d'échantillons de sang foetal prélevé au 1^{er} trimestre de la grossesse

Plusieurs explications à cette constatation :

- Soit les malformations détectées à l'échographie du 1^{er} trimestre sont d'emblée suffisamment graves (anencéphalie, exencéphalie, holoprosencéphalie...) pour conduire rapidement à la décision d'IMG qui sera alors réalisée par aspiration avant 15 SA.
- Soit les malformations, notamment cardiaques et les anomalies de fermeture du tube neural, sont difficilement visibles au 1^{er} trimestre.
- Soit les anomalies détectées nécessitent des explorations complémentaires avant de statuer sur le devenir de la grossesse (par exemple, réalisation d'un caryotype foetal en cas d'augmentation de la clarté nucale) et/ou peuvent être transitoires, nécessitant de répéter les échographies et de suivre l'évolution dans le temps (par exemple, mégavessie, hygroma, ...).
Dans ce cas, l'IMG, si elle est autorisée, sera réalisée plus tardivement au 2^{ème} trimestre voire au 3^{ème} trimestre.
- Soit il existe un cas index d'anomalie génétique dans la famille (myopathies, mucoviscidose, maladies métaboliques héréditaires, hémophilies...) : le dépistage sera alors effectué précocément par prélèvement de villosités choriales dès 11 SA, permettant une interruption avant la fin du 1^{er} trimestre.
- Enfin, depuis l'arrêté du 23 juin 2009, le dépistage de la trisomie 21 réalisable dès le 1^{er} trimestre (entre 11 et 13,6 SA) par mesure échographique de la clarté nucale combinée aux dosages sériques maternels, offre la possibilité de réaliser plus précocément le caryotype foetal sur prélèvement de villosités choriales, ce qui permet d'avoir recours à une IMG avant 15 SA.

- certaines pathologies qui sont soit absentes (pathologies du tube digestif) soit sous représentées (malformations de l'appareil pulmonaire, allo-immunisation foetomaternelle). Ceci constitue un biais de notre étude.

- L'absence de myopathies, de mucoviscidose, de maladies métaboliques ... s'explique par le dépistage précoce au 1^{er} trimestre et la réalisation de l'IMG par aspiration.
- Bien que représentant 6,4% des dossiers présentés au CPDPN sur les 4 années de la période d'étude, les pathologies digestives lorsqu'elles sont isolées (atrésie/sténose de l'oesophage, atrésie du grêle, défaut de fermeture de la paroi abdominale, duplications digestives, malformations anorectales...) ne constituent qu'exceptionnellement une indication d'IMG, car elles peuvent bénéficier d'une prise en charge chirurgicale à la naissance. Lorsqu'elles sont associées à d'autres malformations et/ou à des anomalies chromosomiques, elles ont été classées dans les groupes correspondants selon la classification de l'Agence de la Biomédecine, à savoir les groupes 7 et 10.
- D'autre part, l'apparente sous représentation des pathologies pulmonaires et des allo-immunisations dans notre cohorte est en accord avec la très faible prévalence de ces anomalies décrite dans la littérature. Par rapport à l'activité du CPDPN de 2008 à 2011, les anomalies de l'appareil pulmonaire représentent seulement 1,4% des dossiers présentés (essentiellement des cas de maladie adénomatoïde kystique du poumon) et les allo-immunisations seulement 0,4%.
- Enfin, pour certaines pathologies un seul cas a été observé.

L'âge gestationnel des foetus au moment de l'IMG diffère selon les groupes de pathologies.

Le groupe 10 des anomalies chromosomiques est caractérisé par l'âge gestationnel le plus faible observé avec une valeur médiane de 25 SA. Cela peut s'expliquer par leur dépistage précoce échographique et biologique et la prise de décision rapide d'IMG en cas d'anomalie avérée.

Dans le cas des foetus atteints de polymalformations (médiane 32,2 SA) ainsi que chez ceux présentant des anomalies du système nerveux central (médiane 30,0 SA), l'âge gestationnel est tardif. Il peut néanmoins s'expliquer par le temps d'investigation nécessaire pour s'assurer du caractère rédhibitoire de l'anomalie détectée. Des échographies répétées au cours de la grossesse sont indispensables pour juger de l'aggravation de la malformation

initiale (par exemple, dans le cas des ventriculomégalies) et /ou de l'apparition d'autres malformations associées.

2. Activité CK totale

Un des objectifs de notre travail était d'étudier les variations de la créatine kinase chez des foetus atteints de pathologies graves.

Nos résultats ne montrent pas de variation des valeurs selon le sexe du foetus, ce qui est conforme aux observations de Perkins (*Perkins et al., 1993*) et Gomez (*Gomez et al., 1984*) chez des nouveaux nés sains prélevés à la naissance.

Dans notre cohorte, nous ne mettons pas en évidence de variation significative selon l'âge gestationnel, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature chez des foetus sains où il est observé une augmentation significative à partir de 28 SA (*Nava et al, 1996 ; Gozzo et al, 1998*) en raison de l'accroissement de la masse musculaire au 3^{ème} trimestre.

Dans l'étude de Gozzo réalisée chez des foetus sains, l'activité CK totale est d'environ 100 UI/L pour des foetus âgés de 20 à 26 SA et de 200 UI/L à terme (*Gozzo et al, 1998*). Par comparaison dans notre série, les valeurs trouvées sont également faibles : 32% des foetus ont une activité CK totale inférieure à 100 UI/L, 35% entre 100 et 200 UI/L, 25% entre 200 et 500 UI/L et seulement 8% ont une CK totale supérieure à 500 UI/L.

Un seul foetus présente une activité CK totale qui est anormalement élevée (1067 UI/L) par rapport à l'ensemble des valeurs mesurées. Il s'agit d'un foetus de 27 SA présentant un oligoamnios secondaire à une RPM précoce (23 SA) dans un contexte de chorioamnionite bactérienne. Ce taux est difficile à expliquer car 2 autres foetus de notre cohorte atteints de la même pathologie (RPM à 21 et 22SA) ont quant à eux, une activité CK totale faible respectivement de 150 et 69 UI/L.

3. Profil électrophorétique des isoenzymes CK du sang foetal

L'étape préliminaire de notre travail a consisté à vérifier que l'électrophorèse des isoenzymes de la créatine kinase était réalisable sur du sang foetal de la même façon qu'elle est effectuée depuis longtemps sur du sang adulte.

La technique utilisée dans notre étude montre qu'un dépôt de 30µL de sérum permet la séparation correcte des isoenzymes et leur quantification par calcul de la surface des pics.

Sur le gel de migration, la position des bandes correspondantes aux isoenzymes CKMM, CKMB et CKBB d'origine humaine (sang adulte et sang foetal) est légèrement décalée à gauche par rapport à la position des fractions correspondantes du contrôle de qualité interne commercialisé par Hélène®. Ceci résulte probablement du fait que les isoenzymes CK du contrôle interne sont d'origine animale (extraits de tissus murins) avec des différences de structure modifiant la migration sur le gel utilisé.

3.1. Interférence liée à la présence d'albumine

Le profil de migration des isoenzymes CK du foetus est identique à celui de l'adulte.

Néanmoins, on observe constamment la présence d'une bande supplémentaire, plus ou moins intense, migrant entre les fractions CKMB et CKBB qui est attribuée, d'après les indications du fabricant, à la présence d'albumine. Cet aspect n'est pas retrouvé chez l'adulte.

Dans la littérature, cette interférence liée à l'albumine n'est décrite que dans les systèmes électrophorétiques avec révélation des bandes par fluorimétrie. Il s'agirait dans ce cas de la fluorescence non spécifique d'un complexe formé par liaison de l'albumine soit à de la bilirubine (*Chuga, 1979*) soit à des substances exogènes fluorescentes telles que l'acide salicylique et le pyridoxal-5-phosphate s'accumulant en particulier chez l'insuffisant rénal sévère (*Aleyassine & Tonks, 1978 ; Dick & Blick, 1982a*).

Comment expliquer que l'albumine interfère dans un système de révélation colorimétrique tel celui utilisé au laboratoire alors qu'elle ne possède aucune activité catalytique propre sur le substrat créatine phosphate susceptible de conduire à la formation des produits de la réaction ?

Si on émet l'hypothèse que l'albumine fixe de façon non spécifique le nitrobleu de tétrazolium, l'artéfact devrait apparaître sur tous les profils foetaux ou adultes. Or la bande correspondant à l'albumine n'est observée que sur les profils de sérums foetaux et elle est d'intensité variable.

Dans ces conditions, il ne s'agit probablement pas d'albumine native mais on peut évoquer la présence chez le foetus d'albumine modifiée par liaison à des substances endogènes ou exogènes colorées.

D'autre part, il est aussi possible que la bande observée corresponde à un complexe entre l'isoenzyme CKBB et l'albumine puisque cette association a été décrite comme voie d'inactivation de l'isoenzyme in vivo par Nealon et al. (*Nealon & Henderson, 1977*). Cette explication paraît plus plausible dans la mesure où dans ce cas il existe une activité enzymatique liée à la CKBB. De plus, elle permettrait de comprendre pourquoi l'interférence

n'est visible que dans le sérum de fœtus : la présence de CKBB circulante est en effet physiologique chez le fœtus alors qu'elle est indétectable chez l'adulte sain.

3.2 Influence de l'hémolyse

L'hémolyse est un paramètre important à prendre en considération, d'autant plus que le réactif utilisé pour l'électrophorèse ne contient pas de mélange AMP - diadénosine pentaphosphate pouvant partiellement inhiber l'adénylate kinase érythrocytaire à la différence des méthodes de dosage de la CK totale et de la CKMB.

L'électrophorèse d'un prélèvement hémolysé est caractérisée par un épaulement supplémentaire sur le pic de CKMM, du côté anodique. Les essais que nous avons réalisés avec des sérums d'adultes présentant divers degrés d'hémolyse (+, ++, +++) montrent qu'un artéfact n'est visible que pour des échantillons fortement hémolysés (+++).

Le profil « hémolysé » du sang adulte diffère de celui observé chez le fœtus : en effet, l'épaulement correspondant à l'hémolyse est décalé à droite par rapport au pic CKMM du contrôle chez l'adulte alors qu'il est parfaitement aligné avec celui-ci chez le fœtus.

L'artéfact lié à l'hémolyse peut être confondu avec l'existence d'une macroCK de type 1, les deux ayant la même position sur les profils foetaux, à savoir une migration anodique par rapport à la CKMM. Mais il s'agit plutôt d'un épaulement débutant aux deux tiers de la pente descendante du pic de CKMM dans le cas de l'hémolyse et d'un « vrai » pic séparé du pic de CKMM dans le cas d'une macroCK. Cet aspect se retrouve quel que soit le pourcentage de macroCK.

3.3. Profil ininterprétable

Parmi les 116 profils analysés, 18 se révèlent ininterprétables.

- La première hypothèse réside dans un problème technique survenant sur une piste de migration du gel. Une quantité insuffisante de sérum pour renouveler l'analyse et l'impossibilité de recueillir un nouveau prélèvement ne permettent pas d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

- Une autre hypothèse concerne la faible activité CK totale mesurée (médiane 76,5 UI/L ; valeurs extrêmes 22-213 UI/L).

- Dans la moitié des cas, l'activité CK est inférieure à 100 UI/L alors que dans la population totale étudiée seul 1/3 des foetus a une activité inférieure à 100 UI/L.

- Sur l'ensemble des sérums analysés, 5 ont une activité CK totale inférieure à 50 UI/L. Parmi ceux-ci, un seul profil a pu être interprété sans difficulté (CK : 40 UI/L), les 4 autres étant ininterprétables (activités CK respectives : 22 UI/L ; 28 UI/L ; 45 UI/L ; 49 UI/L). Au delà de 50 UI/L, la majorité des profils sont interprétables.

- Par ailleurs, les 2 dossiers pour lesquels l'électrophorèse n'a pas mis en évidence de macroCK, pourtant fortement suspectée d'après le résultat aberrant du dosage de l'activité CKMB par immunoinhibition, avaient des activités CK extrêmement faibles (15 et 18 UI/L).

L'ensemble de ces éléments nous amène à penser que l'électrophorèse des isoenzymes CK avec le système Hélène Biosciences® requiert une activité CK minimale d'environ 50 UI/L, bien que la sensibilité annoncée par le fabricant soit de 4 UI par bande. Le fabricant ne précise d'ailleurs pas de fourchette d'activité CK pour laquelle l'électrophorèse est validée ni ne mentionne la nécessité d'adapter le volume de sérum déposé en fonction de l'activité CK totale.

- L'hypothèse de la présence d'albumine en grande quantité et/ou d'une substance d'origine inconnue gênant la séparation correcte des isoenzymes est également en cause.

- Aucun lien entre l'impossibilité d'interprétation et une pathologie particulière n'a été mis en évidence.

4. Distribution des isoenzymes de CK

Les valeurs médianes observées (exprimées en pourcentage de l'activité CK totale) sont respectivement de :

- 72,5% (valeurs extrêmes 33 -100%) pour la CKMM,
- 17% (0-48%) pour la CKMB
- 5% (0-27%) pour la CKBB.

Cette répartition est similaire à ce qui est décrit dans la littérature pour les isoenzymes CKMM (70 à 93% selon les auteurs) et CKBB (4 à 18%) (*Cf tableau VII*) mais la proportion de

CKMB est plus élevée dans notre série (en moyenne 17% versus 1,4 à 7% dans la littérature). Il faut cependant souligner que les dosages réalisés dans ces études ont été effectués dans le sang de cordon de nouveaux nés à terme sans complications ce qui n'est pas le cas dans notre travail.

Dans l'étude de Panteghini menée chez 46 foetus prélevés entre 26 SA et le terme, le pourcentage de CKMB reste stable aux environs de 5% (*Panteghini et al, 1995*).

Par contre, l'étude de Fonseca (n= 14 foetus) montre une répartition différente des isoenzymes dans le sang foetal avec en particulier une proportion plus élevée de CKMB (37-43%) (*Fonseca et al, 1995*). De même, Chemnitz et al. mettent en évidence la présence de CKMB avec un pourcentage pouvant aller jusqu'à 20% de l'activité CK totale dans 52 échantillons de sang foetal au cordon parmi 112 nouveaux nés à terme (*Chemnitz et al., 1979*).

Dans notre travail nous observons que :

- la répartition des isoenzymes ne diffère pas selon le sexe du foetus
- l'âge gestationnel n'influe pas sur cette distribution ce qui peut surprendre compte tenu de la modification du profil de distribution des isoenzymes dans le muscle squelettique au cours de la vie foetale. En effet on observe un remplacement progressif de la CKMB (représentant 20 à 46% de la CK musculaire à 30 SA) au profit de la CKMM (80-90% dans le muscle à terme) (*Foxall et al, 1975 ; Schmidt et al, 1979*).
- la présence ou l'absence d'un RCIU n'a pas d'influence sur les paramètres biologiques étudiés dans notre série. Abe et Chemnitz observaient, quant à eux, un taux plus faible de CK totale et de CK MM associé à une proportion plus élevée de CK BB dans le sang de cordon ombilical à la délivrance chez les enfants prématurés et chez ceux souffrant de RCIU par rapport à un enfant de maturité normale (*Chemnitz et al, 1979 ; Abe et al, 1992*). Pour ces auteurs, les valeurs de CK totale et CK MM sont à relier à la masse musculaire plus faible de ces enfants.

L'étude de Chemnitz comprend 7 foetus hypotrophiques sur 108, notre cohorte compte 6 RCIU isolés sur 84 foetus.

- la répartition des isoenzymes ne varie pas en fonction des groupes de pathologies.

Cette observation peut étonner à priori pour deux types de pathologies.

Dans le groupe des malformations cardiaques, l'activité CKMB en valeur absolue et en pourcentage relatif de l'activité CK totale n'est pas supérieure à celle observée dans les autres groupes. Ceci peut s'expliquer :

❖ d'une part, par la répartition tissulaire différente des isoenzymes CK chez le fœtus et chez l'adulte :

- le cœur d'un enfant contient de 96 à 100 % de CKMM et de 0 à 4% de CKMB (Kanemitsu & Okigaki, 1988).

- la CKMB représente 20 à 46% de l'activité CK totale du muscle squelettique chez des fœtus âgés d'environ 30 semaines (Foxall et al, 1975 ; Schmidt et al, 1979).

Par conséquent, la CKMB n'est pas un marqueur fiable d'une atteinte cardiaque fœtale.

❖ d'autre part, les malformations observées dans notre cohorte sont constituées d'anomalies des cavités et des gros vaisseaux et il n'y a donc pas de nécrose myocardique susceptible d'entraîner une libération des isoenzymes CK cytosoliques.

Dans le groupe des pathologies cérébrales, la proportion de CKBB devrait être plus élevée, sachant que le système nerveux central contient exclusivement l'isoenzyme CKBB. Or elle ne représente qu'en moyenne 5% de l'activité CK totale (valeurs extrêmes 0 – 18%) comme dans les autres groupes. Chez un fœtus âgé de 31 semaines présentant des lésions cérébrales ischémo-hémorragiques, la CKBB n'est qu'à 4% malgré la nécrose cellulaire. La présence associée de macroCK de type 1 (à 18%) dans le cas de ce fœtus pourrait sous-estimer le taux de CKBB observé : l'isoenzyme serait présente à la fois sous forme libre et majoritairement sous forme complexée à une Ig ce qui représenterait une voie d'élimination in vivo (Prabahkaran et al, 1979).

A la différence des souffrances cérébrales hypoxiques (Becker & Menzel, 1978 ; Lavaud et al, 1979 ; Chopin et al, 1980 ; Cuestas et al, 1980 ; Walsh et al, 1982 ; Niklinski, 1987 ; Fonseca et al, 1995) la CKBB ne semble pas être un marqueur informatif dans les malformations cérébrales.

5. Interférence analytique de la macroCK dans les dosages d'activités enzymatiques

5.1. Activité CK totale

En raison de leur poids moléculaire élevé (supérieure à 240 000 daltons pour les macroCK de type 1 et supérieure à 300 000 daltons pour les macroCK de type 2), les

macroenzymes ont une clairance plasmatique diminuée et une demi-vie plus longue par rapport aux enzymes classiques (*Stein et al, 1985b ; Remaley et al, 1989*) ce qui, en pratique, est généralement responsable d'élévations artéfactuelles de l'activité enzymatique mesurée.

Dans notre groupe de 20 foetus avec macroCK, l'activité CK totale est cependant relativement faible variant de 50 à 554 UI/L avec une valeur médiane à 159 UI/L et 72% des foetus ont une activité CK totale < 200 UI/L. Statistiquement, l'activité CK totale ne diffère pas selon la présence ou l'absence de macroCK et une répartition identique des valeurs de CK totale est observée dans la population générale des 84 foetus, dans le groupe des foetus sans macroCK et dans le groupe des foetus avec macroCK.

Contrairement à d'autres macroenzymes (macroamylase, macroASAT), la présence de macroCK n'entraîne donc pas constamment une élévation de l'activité CK totale.

Notre observation n'est pas une spécificité liée au foetus car plusieurs études menées chez des adultes rapportent que dans la majorité des cas, la présence d'une macroCK de type 1 est détectée en présence d'une activité CK totale dans les valeurs de référence (*Ljungdahl & Gerhardt, 1978 ; Galasso et al, 1993 ; Galarraga, 2003*) ou modérément augmentée, inférieure à 500 UI/L (*Galarraga, 2003*). Seule l'étude de Lee (1994) indique que 64 % des 36 patients avec macroCK de type 1 ont une activité CK totale supérieure à 500UI/L. Il faut cependant souligner que plusieurs de ces patients étaient atteints de polymyosite, pathologie qui est par elle-même responsable d'une augmentation de la CK circulante (*Lee et al, 1994*).

La même constatation est faite en présence de macroCK de type 2, et ce de façon encore plus marquée puisque l'activité CK totale n'est augmentée que dans 10 à 20% des cas (*Lang & Wurzburg, 1982 ; Stein et al, 1985c ; Lee et al, 1994*). Dans l'étude de Lee, 72% des patients avec macroCK de type 2 ont une CK totale inférieure à 100 UI/L (1994).

En conclusion, une valeur d'activité CK normale n'exclut pas la présence de macroCK, ce qui justifie d'autant plus la nécessité de réaliser systématiquement une électrophorèse. On peut penser que la liaison de l'enzyme à une immunoglobuline ou la polymérisation des CK mitochondriales modifie voire inhibe l'activité enzymatique.

5.2. Activité CKMB mesurée par immunoinhibition

L'élaboration de la méthode de dosage de la CKMB par immunoinhibition en 1976 (*Neumeier et al, 1976*) a augmenté l'incidence de la détection des macroCK.

La présence de macroCK interfère en effet avec ce dosage en donnant des valeurs de CK MB faussement élevées, parfois supérieure à l'activité CK totale, car elle n'est pas inhibée par les Ac dirigés contre la sous-unité M (*Girgenti et al*, 1981 ; *Fiehn & Seiler*, 1981 ; *Raga et al*, 1992). Une macroCK doit généralement être suspectée devant un pourcentage de CKMB supérieur à 25% de l'activité CK totale (*Lang & Wurzburg* 1982 ; *Gorus et al*, 1988) ; chez les sujets atteints d'un infarctus du myocarde récent, la CKMB dépasse rarement 30% de la CK totale (*Galasso et al*, 1993).

Par ailleurs, le fournisseur de la trousse Olympus® CK-MB référence OSR61155 utilisée au laboratoire indique une valeur seuil d'alerte de 25% chez l'adulte.

Chez le fœtus, la valeur d'alerte n'est pas définie. L'étude de *Panteghini* a montré que le pourcentage de CKMB reste stable aux environs de 5% de 26 SA jusqu'à terme (*Panteghini et al*, 1995) alors que dans notre série, on trouve un pourcentage médian de CKMB à 17% chez les fœtus sans macroCK.

Dans notre étude, lorsque la présence de macroCK a été identifiée, l'activité CKMB dosée par immunoinhibition n'a jamais été retrouvée supérieure à l'activité CK totale. Seul un cas où l'activité CKMB représente 90% de l'activité CK totale fait fortement suspecter la présence d'une interférence confirmée par l'électrophorèse qui met en évidence une macroCK de type 1 à 47%.

Les pourcentages de CKMB déterminés par immunoinhibition et par électrophorèse sont significativement différents, le dosage par immunoinhibition donnant des résultats supérieurs. Dans 8 cas sur 20, on observe une différence absolue entre les pourcentages mesurés supérieure à 10%.

Il existe une corrélation linéaire positive entre l'activité CKMB mesurée par immunoinhibition et le pourcentage de macroCK. L'interférence analytique est d'autant plus importante que le pourcentage de macroCK est élevé.

Cependant dans 10 cas sur 20, les pourcentages déterminés par les deux méthodes sont équivalents et dans 2 cas le pourcentage déterminé par l'électrophorèse est même supérieur à celui du dosage par immunoinhibition.

Nos résultats montrent finalement que l'interférence habituellement décrite n'est pas constante avec la technique utilisée au laboratoire et dans le cas de fœtus pathologiques. La diversité structurale des macroCK détectées chez les fœtus entraîne-t-elle des différences de reconnaissance du complexe par les anticorps de la trousse Olympus CKMB (référence OSR61155) ?

A l'inverse, on observe dans notre travail 2 cas aberrants pour lesquels l'activité CKMB par immunoinhibition est supérieure à l'activité CK totale mais sans macroCK retrouvée à l'électrophorèse. L'un des fœtus présentait un myéloméningocèle et l'autre était atteint de polymalformations. Or ces 2 fœtus présentent les activités CK totales les plus faibles parmi les 116 prélèvements reçus, respectivement 15 et 18 UI/L.

On peut émettre l'hypothèse que la technique d'électrophorèse n'est pas suffisamment sensible pour détecter des macroCK très faibles (sensibilité de la technique 4UI/L par bande).

5.3. Dosage de l'isoenzyme CKMM par électrophorèse

Chez les fœtus avec macroCK, le pourcentage de CKMM déterminé par électrophorèse est significativement plus faible que dans le groupe sans macroCK et nous avons mis en évidence une corrélation linéaire négative entre le pourcentage de CKMM et le pourcentage de macroCK.

Nous rappelons que l'autre élément discriminant entre les 2 groupes est l'âge gestationnel plus faible chez les fœtus avec macroCK.

Néanmoins nous avons montré qu'il n'y a pas de corrélation entre les pourcentages d'isoenzymes et l'âge gestationnel et que les groupes de fœtus avec et sans macroCK ne diffèrent pas quant aux pathologies observées.

On émet donc l'hypothèse d'une interférence analytique : en effet, la macro CK de type 1 migre de façon anodique par rapport à la fraction CKMM, créant un épaulement qui « empiète » sur le pic CKMM pouvant ainsi le sous-estimer.

6. Présence de macroCK en pathologie foetale

6.1. Résultats de l'étude

La description des macroCK chez l'adulte est régulièrement rapportée dans la littérature même si la prévalence reste faible.

Chez le nouveau-né et l'enfant, seules 9 publications sont référencées dans la base de données « Pubmed » depuis 1963, toutes avec des effectifs faibles (de 1 à 11 sujets) (*Wu et al, 1983 ; Rizotti et al, 1985 ; Ludvigsen et al, 1986 ; Kanemitsu, 1986 ; Tozawa, 1989 ; Bayer & Kraus, 1982 ; Kuint et al, 1993 ; Inoue et al, 1999 ; Pascarella et al, 2007*).

Par contre, à notre connaissance, aucun cas de macroCK n'a été rapporté chez le fœtus.

L'originalité de notre travail réside dans la mise en évidence de l'existence de macroCK de type 1 chez des foetus atteints de pathologies graves, et ce dans 20 cas sur 84.

- La présence de macroCK est
 - sans relation avec le sexe foetal
 - détectée à la fois chez des foetus au cours des 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse.
- Aucun lien évident n'a pu être mis en évidence avec une pathologie spécifique.
 - ❖ Néanmoins nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un lien avec des pathologies non observées dans notre travail.
 - ❖ La présence de macroCK de type 1 chez des adultes sains (*Whelan & Malkus, 1983*) peut faire penser qu'il en est de même chez le foetus sain. Il pourrait donc être envisagé de rechercher la présence de macroCK dans le sang du cordon à la naissance chez des nouveaux nés sains.

Chez l'adulte, il n'a jusqu'à présent jamais été établi de façon formelle un lien entre la présence de macroCK de type 1 et une pathologie. Seules certaines associations sont rapportées (maladies auto-immunes en particulier les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les pathologies cardiovasculaires dégénératives et les infarctus du myocarde, les myosites, plus rarement les infections respiratoires).

Chez l'enfant, les cas rapportés de macroCK de type 1 correspondant à des souffrances cérébrales hypoxiques.

Dans notre série, nous n'avons qu'un cas qui pourrait correspondre aux relations énoncées ci-dessus : il s'agit d'un foetus de 31 SA présentant des lésions ischémohémorragiques cérébrales pour lequel nous avons mis en évidence une macroCK à 18%.

L'absence de détection de macroCK de type 2 dans notre cohorte et en particulier chez les foetus atteints d'anomalies cardiovasculaires est conforme à la littérature : une macroCK de type 2 chez l'enfant (*Wu et al, 1983 ; Rizzoti et al, 1985*) n'a été décrite qu'en cas d'atteinte directe du muscle cardiaque au cours d'ischémie, de myocardite et de cardiomyopathie.

6.2. Origine des macroCK chez le fœtus

La présence de macroCK dans le sang de fœtus, sans relation établie avec une pathologie dans 19/20 cas, pose la question de l'origine maternelle ou foetale des macroCK.

La macroCK de type 1 est un complexe résultant de la liaison d'une isoenzyme CK avec une immunoglobuline majoritairement de type IgG, rarement IgA, et exceptionnellement IgM. Son haut poids moléculaire (> 240 000 daltons) rend improbable le passage transplacentaire. Les valeurs des CK mesurées chez le foetus ne sont pas corrélées aux concentrations maternelles ce qui confirme que la synthèse des CK est exclusivement foetale. La structure des isoenzymes CK est identique chez le foetus et l'adulte. La seule différence notée est la répartition des isoenzymes dans le sang : la CKBB est constamment présente de façon physiologique chez le foetus alors qu'elle est indétectable chez un adulte sain.

L'immaturation de la lymphopoïèse B chez le foetus explique sa capacité à produire essentiellement des IgM dès 12 SA mais très peu d'IgG et d'IgA (à partir de 15-20 SA) en raison de la capacité réduite de commutation isotypique des lymphocytes B naïfs et de l'absence de stimulation antigénique (*Durandy, 2001*).

Seules les IgG maternelles traversent le placenta à partir de la 13^{ème} SA selon un mode de passage passif dépendant de la concentration maternelle et selon un mode actif. Ce passage augmente au cours de la grossesse et est maximale au cours des 4 dernières semaines (*Palmeira et al, 2012*).

Dans notre travail, la macroCK détectée a été identifiée comme étant de type 1 de par sa position électrophorétique entre les fractions CKMM et CKMB. Par contre, la caractérisation biochimique du complexe n'a pas été réalisée. Les techniques utilisées pour déterminer la nature de l'isoenzyme et de l'immunoglobuline constitutives du complexe font appel à l'immunoprécipitation sélective à l'aide d'anticorps anti M ou anti B et à la chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A Sépharose pour les IgG. Une telle technique semble difficilement utilisable pour des échantillons de sang foetal compte tenu du volume nécessaire.

Compte tenu de ces notions et du fait que la macroCK de type 1 est le plus fréquemment un complexe formé de CK BB lié à une IgG, l'hypothèse la plus probable est que la macroCK détectée chez les foetus de notre étude résulterait de la liaison de l'enzyme CKBB circulante dans le sang foetal et d'une IgG maternelle.

Plusieurs éléments sont en faveur de notre hypothèse.

- Prabahkaran a réussi à reproduire in vitro le complexe macromoléculaire en incubant à 37°C des IgG humaines purifiées (à des taux comparables aux concentrations sériques 10-15g/L) avec de l'isoenzyme CKBB purifiée extraite de cerveau humain. Le même résultat a été obtenu avec du sérum humain normal frais additionné de CKBB purifiée (*Prabahkaran et al, 1979*).

- D'autre part, Bayer a mis en évidence la présence de macro CK de type 1 chez 3 membres d'une même famille, la mère et deux de ses trois enfants âgés respectivement de 20 jours et de 2 mois au moment de la découverte, sans notion d'hypoxie néonatale. La décroissance régulière de la macro CK dans le sérum des 2 enfants avec disparition constatée à 2 ans ainsi que l'absence de détection chez le père et l'autre soeur (âgée de 5 ans) sont en faveur du passage transplacentaire des IgG maternelles (*Bayer & Kraus, 1982b*).

- Halsall a mis en évidence la présence de macro TSH chez un nouveau né sain et euthyroïdien à 7 jours de vie, confirmée à 10 jours et persistante à 3 mois. Chez la mère euthyroïdienne prélevée en parallèle, une macroTSH a été également été retrouvée. L'analyse biochimique a identifié un complexe TSH-IgG. L'incubation du sérum maternel avec du sérum d'un patient hypothyroïdien a abouti à la formation in vitro de macroTSH, confirmant la présence chez la mère d'anticorps anti-TSH, très probablement transmis au fœtus. Par contre, la décroissance n'a pas pu être observée par défaut de suivi de l'enfant (*Halsall et al, 2006*).

Par contre, Tozawa rapporte 5 cas de macro-amylase (constituée d'IgG) chez des enfants de moins d'un an sans pathologie commune hormis la notion de fièvre chez 4 d'entre eux. L'absence de détection du complexe chez les mères n'est pas en faveur d'un transfert passif d'anticorps anti-amylase d'origine maternelle (*Tozawa, 1989*).

Au vu des résultats de notre étude, la mise en évidence de macroCK dans le sang de fœtus ne semble pas relever pas d'un état pathologique particulier et la contribution maternelle via le passage transplacentaire d'Ig mérite d'être suspectée.

Pour prouver notre hypothèse, il conviendrait de réaliser un travail ultérieur pour :

- mettre en évidence la présence éventuelle de macroCK chez la mère en réalisant systématiquement en parallèle un prélèvement chez la mère et le fœtus

- démontrer la présence d'anticorps dirigés contre la sous-unité B dans le sérum maternel en mettant en évidence la formation du complexe CKBB-IgG lors de l'incubation du sérum maternel avec un sérum contenant de la CKBB humaine.
- suivre l'évolution cinétique de la détection de la macroCK chez le fœtus puis chez l'enfant afin de démontrer la disparition du complexe parallèlement à la décroissance physiologique des IgG maternelles. Cela sous-entend d'élargir le recrutement à des fœtus viables.

Le phénomène de liaison d'une immunoglobuline avec une substance endogène est décrit pour de nombreuses enzymes autres que la créatine kinase mais aussi pour des hormones (prolactine essentiellement, TSH, FSH, hCG), pour des protéines sériques (albumine..) et même des vitamines (vitamine B12)...

A ce jour, la revue de la littérature montre que le mécanisme à l'origine de la liaison spécifique d'une Ig (puisque'il a été démontré l'implication des sites de reconnaissance épitopique) avec une substance de structure normale n'est toujours pas élucidé.

L'hypothèse d'un désordre immunitaire est séduisante mais la preuve de l'association d'une maladie auto-immune avec la présence de macroenzymes ou de macrohormones n'est pas encore formellement établie.

CONCLUSION

Toujours complémentaire de l'échographie prénatale, la biologie foetale a pour but de préciser le diagnostic et de tenter d'évaluer le pronostic des pathologies suspectées chez le fœtus.

Actuellement indiqué dans l'exploration de l'hématologie foetale et l'analyse chromosomique et génétique, le prélèvement de sang foetal a peu d'indication en biochimie, à l'exception du dosage de la β 2microglobuline dans les uropathies. Quelques équipes se sont intéressées aux marqueurs biochimiques courants, notamment cardiaque et hépatique, dans l'évaluation de la souffrance tissulaire au cours de pathologies foetales infectieuses ou non. Notre travail portant sur la créatine kinase rentre dans ce cadre.

Le système d'électrophorèse développée par la société Hélène Biosciences®, mis en place au laboratoire de Biochimie spécialisée depuis 5 ans, permet de réaliser une électrophorèse des isoenzymes CK sur du sang foetal avec une faible prise d'essai (30 μ L de sérum), selon la même procédure que pour les échantillons de sang adulte.

La démarche qualité impose l'utilisation d'un contrôle interne pour valider chaque série d'électrophorèse. Le profil électrophorétique des CPK du sérum humain, que ce soit chez l'adulte ou le fœtus, est caractérisé par un léger décalage à gauche des bandes correspondantes aux 3 isoenzymes (MM, MB et BB) par rapport à celles du contrôle de qualité interne commercialisé par Hélène® et constitué d'isoenzymes CK extraits de tissus murins. Les différences de structure entre les isoenzymes de la souris et de l'Homme expliquent les différences de mobilité électrophorétique dans le système utilisé.

Dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, le passage régulier de contrôles de qualité externe devient obligatoire pour la validation de la méthode. Etant donné la rareté des laboratoires réalisant ce dosage spécialisé, des sérums de contrôle ne sont pas commercialisés par les programmes de contrôle de qualité. La solution reposera probablement sur l'échange volontaire d'échantillons de sérum entre les laboratoires.

L'hémolyse est un élément préanalytique essentiel à prendre en considération en raison de la libération de l'adénylate kinase érythrocytaire.

Dans le système utilisé au laboratoire, l'hémolyse est responsable d'un artefact visible sur le profil sous la forme d'un épaulement situé à droite du pic de la CKMM (position anodique), pouvant être confondu avec l'existence d'une macroCK de type 1. Les essais que nous avons réalisés avec des sérums d'adulte montrent que l'interférence n'apparaît que pour des échantillons fortement hémolysés.

Par rapport au sang adulte, l'électrophorèse des CK dans le sang foetal entraîne davantage de difficultés d'interprétation des profils pour le biologiste. La présence constante d'albumine, probablement sous une forme non native, détectée en quantité variable selon les sérums et/ou d'autres substances d'origine inconnue chez le foetus est à l'origine de bandes supplémentaires artéfactuelles pouvant gêner la séparation des isoenzymes. De ce fait, le profil devient ininterprétable. Par contre, l'albumine n'interfère pas sur les électrophorèses de sérums d'adulte.

Bien qu'aucune indication ne soit mentionnée par le fabricant, il nous semble qu'une activité CK totale minimale d'environ 50 UI/L est nécessaire pour obtenir une séparation correcte des isoenzymes.

L'analyse rétrospective des profils de 116 échantillons de sérums fœtaux obtenus sur 4 ans nous a permis de définir 4 types de profils :

- Profil ininterprétable
- Profil avec hémolyse
- Profil sans macroCK
- Profil avec macroCK de type 1

L'électrophorèse est indispensable pour détecter la présence de macroCK. En effet nos résultats montrent que la présence de macroCK n'entraîne pas constamment une élévation de l'activité CK totale ni systématiquement une surestimation de l'activité CKMB mesurée par immunoinhibition.

Une différence absolue de plus de 10% entre les pourcentages de CKMB déterminés par immunoinhibition et par électrophorèse a été observée uniquement dans 8 cas sur 20, avec cependant une corrélation linéaire positive entre le pourcentage de CK MB déterminé par immunoinhibition et le pourcentage de macroCK.

Dans 10 cas sur 20, les pourcentages déterminés par les deux méthodes sont équivalents et dans 2 cas le pourcentage déterminé par l'électrophorèse est même supérieur à celui du dosage par immunoinhibition.

D'autre part, il existe une corrélation linéaire négative entre le pourcentage de CKMM déterminé par électrophorèse et le pourcentage de macroCK. Cette sous-estimation serait la conséquence d'une simple interférence analytique liée à la migration de la macroCK de type 1 à proximité de la fraction CKMM.

Dans notre étude menée chez des foetus atteints de pathologies graves, l'activité CK totale et l'activité CKMB (mesurée par immunoinhibition) ainsi que la distribution des

isoenzymes dans le sang foetal (en moyenne 72,5% de CKMM, 17% de CKMB, 5% de CKBB) ne varie pas selon le sexe, l'âge gestationnel, l'existence ou non d'un RCIU et la pathologie foetale.

En conclusion, ni l'activité CK totale ni les isoenzymes CK MM, MB et BB ne semblent être des marqueurs intéressants dans les différentes malformations foetales et dans les autres pathologies infectieuses ou non (RCIU, RPM) observées dans notre cohorte. La CKMB n'est pas un bon indicateur des malformations du coeur et des gros vaisseaux. La CKBB ne semble pas être un marqueur informatif dans les malformations cérébrales à la différence de ce qui est observé dans les souffrances cérébrales hypoxiques.

A notre connaissance, notre étude est la première à mettre en évidence la présence de macroCK de type 1 chez des foetus atteints de pathologies graves. Elle est retrouvée chez ¼ des foetus de notre série.

La détection de macroCK, ainsi que son pourcentage relatif par rapport à l'activité CK totale (de 2 à 47%) ne varie pas selon le sexe ni l'âge gestationnel (22 à 37 SA).

Elle est détectée même si l'activité CK totale est faible : ¾ des foetus ayant une macroCK ont une activité CK totale inférieure à 200 UI/L.

Aucune corrélation avec les pathologies foetales représentées dans notre étude n'a été mise en évidence.

L'ensemble de ces éléments pose donc la question de l'origine foetale ou maternelle de ce complexe macromoléculaire. Au vu de la littérature existante, l'hypothèse de la formation de la macroCK dans la circulation foetale par liaison d'une IgG d'origine maternelle avec l'isoenzyme CKBB présente de manière physiologique dans le sang foetal peut être évoquée. Seules des études complémentaires pourraient étayer notre hypothèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe F., Nagamine Y., Ueda J., Shima K. (1992)

Creatine kinase activity and its isoenzymes levels in cord blood

Rinsho Byori, 40:875-880

Alberry M., Maddocks D., Jones M., Abdel Hadi M., Abedl-Fattah S., Avent ND., Scothill PW. (2007)

Free fetal DNA in maternal plasma in embryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*, 27:415-418

Aleyassine H., Tonks D.B. (1978)

Albumin-bound fluorescence: a potential source of error in fluorimetric assay of creatine kinase BB isoenzyme. *Clin Chem*, 24 (10):1849-1850

Alfirevic Z. (2000)

Early amniocentesis versus transabdominal chorionic villus sampling for prenatal diagnosis

Cochrane Database Syst Rev 2000 (2) CD000077

Alfirevic Z., Sundberg K., Brigham S. (2003)

Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis.

Cochrane Database Syst Rev, 3: CD003252

Almeida CM, Carrapato MR, Pinto F., Pinto M., Ferreira S., Schmitt D., Marinho L. (2011)

Biochemical markers of neonatal myocardial dysfunction. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 24(4):568-573

Amato M., Aegerter E., Reiber W., Schneider H. (1992)

Creatine phosphokinase isoenzyme activity in umbilical artery, umbilical vein and capillary blood of newborn infants at term. *Arch Gynecol Obstet*, 251:171-174

Antsaklis Al., Papantonjou NE., Mesogitis SA., Koutra PT., Vintzileos AM.,

Aravantinos DI. (1992) Cardiocentesis: an alternative method of fetal blood sampling for the prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Obstet Gynecol*, 79:630-633

Apple F.S. (1984)

Profile of CK isoenzymes in skeletal muscles of marathon runners

Clin Chem, 30(3): 413-416

Apple FS, Sharkey SW., et al. (1987)

Analyses of creatine kinase isoenzymes and isoforms in serum to detect reperfusion after acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 33:507-511

Ariga H., Ohto H., Busch MP., Inamura S., Watson R., Reed W. (2001)

Kinetics of fetal cellular and cell free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for non invasive prenatal diagnosis. *Transfusion*, 41:1524-1530

Artur Y., Wellman-Bednawska M., Jacquier A., Siest G. (1984)

Complexes of serum gamma-glutamyl transferase with apolipoproteins and immunoglobulin A. *Clin Chem*, 30:361

Artur Y., Sanderink G.J., Maire I. (1987) Les macroenzymes dans le plasma humain : 2ème partie. Macrogamma-glutamyltransférase, macroalanine aminopeptidase, macrophosphatase alcaline, macroaminotransférases et autres macroenzymes. *Ann Biol Clin*, 45:277-284

Aoyagi Y., Ikenaka T., Ichida F. (1979) Alphafoetoprotein as a carrier protein in plasma and its bilirubin-binding ability. *Cancer research*, 39:3571-3574

Bark JC. (1980) Mitochondrial creatine kinase: a poor prognostic sign. *JAMA*, 243:2058-2060

Bayer P.M., Gabl F., Gergeley T., Zazgornik T. (1977) Isoenzymes of creatine kinase in the perinatal period. *J Clin Chem Clin Biochem*, 15:349-352

Bayer P.M., Wider G., Unger W (1982a) Variant creatine kinase isoenzymes: frequency and clinical significance. *Klin Wochenschr*, 60 (7): 365-369

Bayer P.M., Kraus S. (1982b) Multiple occurrence of macrocreatine kinase in one family. *Clin Chem*, 38(7):1379-1381

Becker M., Menzel K. (1978) Brain typical creatine kinase in the serum of newborn infants with perinatal brain damage. *Acta Paediatr Scand*, 67:177-180

Berrebi A., Bénichou A.C., Sarramon M.F., Bessières M.H., Rolland M., Kobuch W.E., Demur C., Solera M.L., Sie P., Amouroux J., Fournié A. (1992) Valeurs biologiques de référence chez le foetus humain : à propos de 106 ponctions de cordon in utéro. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 21:355-359

Berrebi A., Cohen-Khallas Y., Bessières MH, Rolland M., Sarramon MF, Fournié A. (1992) Predictive value of non-specific signs of fetal infection in congenital toxoplasmosis *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 21(7):791-4.

Berry S., Lecolier B et al. (1995) Predictive value of fetal serum β 2-microglobulin for neonatal renal function. *Lancet*, 345:1277-1278

Bessman S.P., Carpenter C.L. (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Ann Rev Histochem*, 54:831-862

Bianchi DW., Zickwolf GK., Weil GJ., Sylvester S., DeMaria MA., (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:705-708

Bianchi DW, Williams JM., Sullivan LM., Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. (1997) PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies *Am J Hum Genet*, 61: 822-829

Bianchi DW., Simpson JL., Jackson LG., Elias S., Holzgreve W., Evans MI., (2002) Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn*, 22: 609-615

Black HR., Quallich H., Gareleck CB. (1986) Racial differences in serum creatine kinase levels. *Am J Med*, 81:479-487

Blessed B., Lacoste H., Wech R. (2001) Obstetrician-gynecologists performing genetic amniocentesis may be misleading themselves and their patients. *Am J Obstet Gynecol*, 184:1340-1344

Bodensteiner J.B., Zellweger H. (1971) Creatine phosphokinase in normal neonates and young infants. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 77 (5): 853-858

Bohner J., Stein W., Kuhlmann E., Eggstein M. (1979) Serum CK BB linked to IgG. *Clin Chim Acta*, 97:83-85

Bohner J., Stein W., Renn W., Steinhart R., Eggstein M. (1981) Stability of macrocreatinase kinases and creatine kinase isoenzymes compared: heat inactivation test for determination of thermostable creatine kinases. *J Clin Chem Clin Biochem*, 19:1021-1026

Bohner J., Stein N., Steinhart R., Wurzburg U., Eggstein M. (1982) Macrocreatinase kinase: results of isoenzyme electrophoresis and differentiation of the Ig-bound type by radioassay *Clin Chem*, 28(4):618-623

Bon C., Raudrant D., Golfier F., Poloce F., Champion F., Pichot J., Revol A. (2007) Métabolisme foeto-maternel au cours de grossesses humaines normales : étude de 73 cas *Ann Biol Clin*, 65 (6):609-619

Bon C., Raudrant D., Poloce F., Champion F., Golfier F., Pichot J., Revol A. (2007) Etude biochimique du sang foetal prélevé par cordocentèse au cours de 35 grossesses compliquées de retard de croissance. *Pathologie Biologie*, 55 :111-120

Bonnet S., Mercie P., Lacape G., Viallard J.F., Faure I., Martel J., Couzil L., Leng B., Pellegron J.L. (2001) Macro-CK révélatrice d'un carcinome épidermoïde disséminé du sinus piriforme chez un patient atteint de dermatomyosite. *Rev Med Int*, 22:292-296

Bugugnani M.J., Dehlinger S. (1990) Puissance diagnostique du dosage immunométrique de l'isoenzyme MB de la créatine kinase (CKMB) au cours des premières heures de l'infarctus du myocarde. *Information scientifique du Biologiste*, 16:297-299

Bugugnani M.J. (2002)
Créatine kinase, CKMB et isoformes
In : Cahier de formation Bioforma, Les marqueurs cardiaques (2002)

Bunday S., Crawley JM., Edwards JH, Westhead RA. (1979) Serum creatine kinase levels in pubertal, mature, pregnant and post menopausal women. *J Med Genet*, 16:117-121

Buttery J.E., Stuart S., Pannall P.R. (1992) Stability of the CK-MB isoenzyme on routine storage. *Clin Biochem*, 25:11-13

The Canadian Early and Mid-trimester Amniocentesis trial (CEMAT) Group (1998)
Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet*, 351:242-247

- Cao A., De Virigillis S., Falorni A. (1968)** The ontogeny of creatine kinase isoenzymes. *Biol Neonate*, 13:375-380
- Cetin I., Corbetta C., Sereni LP, Marconi AM, Bozzetti P., Pardi G., Battaglia FC. (1990)** Umbilical amino acid concentrations in normal and growth-retarded fetuses sampled in utero by cordocentesis. *Am J Obstet Gynecol*, 162(1): 253-261
- Cetin I., Ronzoni S., Marconi AM, Perugino G., Corbetta C., Battaglia FC, Pardi G. (1996)** Maternal concentrations and fetal-maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 174(5):1575-1583
- Chan KCA., Zhang J., Hui A., Wong N., Lau JK., Leung TN., Lo KW., Huang DWS., Lo YMD (2004)** Size distribution of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 50:88-92
- Chemnitz G., Jockers-Wretou E., Schmidt E et al. (1979)** MacroCPK BB observation on 6 patients. *J Clin Chem Clin Biochem*, 17:725-729
- Chemnitz G., Nevermann L., Schmidt F.W., Lobers J. (1979)** Creatine kinase and creatine kinase isoenzymes during pregnancy and labor and in the cord blood. *Clin Biochem*, 12(6):277-281
- Chevrot M, Herson S., Piton A., Godeau P., Galli J. (1982)** Atypical serum creatine kinase MM and myeloma during dermatomyositis. *Clin Chem*, 28:1980-1981
- Chopin N., Lavaud J., Voyer M., Bailly M., Cloup M. (1980)** Créatine kinase BB sérique dans la souffrance cérébrale du nouveau né. *Ann Biol Clin*, 38:345-350
- Christenson R.H., Vaidya H., Landt Y., Bauer R.S., Green S.F., Apple F.S., Jacob A., Magnuson G., Nag S., Wu A.H.B, Azzary H.M.E (1999)** Standardization of creatine kinase MB mass assays: the use of recombinant CK –MB as a reference materials. *Clin Chem*, 45:1414-1423
- Chuga D.J. (1979)** Fluorescent albumin-bilirubin complex on cellulose acetate electrophoregrams which may confuse creatine isoenzyme assay. *Clin Chem*, 25(3):494
- Clarkson PM, Apple D., Byrnes WC., Mc Cormick KM., Triffleti Ph. (1987)** Creatine kinase isoforms following isometric exercise. *Muscle Nerve*, 110:41-44
- Clifford S.M., Bunker A.M., Jacobsen J.R., Roberts W.L (2011)** Age and gender specific pediatric reference intervals for aldolase, amylase, ceruloplasmin, creatine kinase, pancreatic amylase, prealbumin, and uric acid. *Clin Chim Acta*, 412:788-790
- Colmant C., Senat M.V. (2012)** Techniques de prélèvements foetaux. *EMC-Obstétrique/Gynécologie*, 7 (3):1-6 [Article 5-021-A-15]
- Costa J.M., Gautier E., Benacchi A., (2004)** Analyse génétique du foetus à partir du sang maternel. *Gyn Obst Fertil*, 32:646-650
- Costill DL., Fink WJ., Pollock MI. (1976)** Muscle fiber composition and enzyme activities of elite distance runners. *Med Sci Sport Ex*, 8:96-101

- Cuestas R.A. (1980)** Creatine kinase isoenzymes in high risk infants. *Pediatr Res*, 14:935
- Daffos F., Capella-Pavlovsky M., Forestier F. (1983)** A new procedure for fetal sampling in utero: preliminary results of 53 cases. *Am J Obstet Gynecol*, 146: 985-998
- Daffos F., Forestier F. (1988)**
Médecine et biologie du foetus humain
Edition Maloine Paris 1988
- Daffos F., Forestier F., Capella-Pavlovsky M., Mac Aleese J., Descombey D., Jacquemard F. (1994)** Facteurs de risque du prélèvement de sang foetal. *Rev Prat*, 44: 923-926
- Daffos F., Jacquemard F., Rouquet Y. (2004)** Techniques et indications hématologiques du prélèvement de sang foetal et de la transfusion in utéro. *EMC- Hématologie*, 1: 35-45
- Davies J., Reynolds T., Penney M.D. (1992)** Creatine kinase isoforms: investigation of inhibitors of in vitro degradation and establishment of a reference range. *Ann Clin Biochem*, 29:202-205
- Delahunty T.J. (1983)** Cathodally migrating creatine kinase in sera of patients treated with theophylline and its diagnostic implications. *Clin Chem*, 29:1484
- Delanghe J., De Scheerder I., De Buyzere M., Algoed L., Robbrecht J. (1986)**
Macro Creatine kinase type 1 as a marker for autoimmunity in coronary heart disease.
Atherosclerosis, 60:215-219
- DGKC : Recommandation of the German Society of Clinical Chemistry (1977)**
Standard method for the determination of creatine kinase activity.
J Clin Chem Clin Biochem, 15:255-260
- Dick T., Blick K. (1982a)** Fluorescent acidic substances with electrophoretic migration similar to CKBB. *Clin Chem*, 28(7):1717-1718
- Dick T.T., Blick K.E. (1982b)**
Immunoglobulin bound creatine kinase BB in serum with electrophoretic migration between MM and MB isoenzymes
Clin Chem [Letter], 28:1809-1810
- Dieusaert P. (1998)**
Guide pratique des analyses prénatales
Edition Maloine Paris 1998
- Dommergues M., Muller F., et al. (2000)** Fetal serum β 2microglobulin predicts postnatal renal function in bilateral uropathies. *Kidney International*, 58:312-316
- Doré D. (1994)**
Les CPK
Biochimie clinique, Ed Maloine: 360-369

- Duchatel F., Oury JF., Menesson B., Muray JM. (2003)** Complications of diagnostic ultrasound-guided percutaneous umbilical blood sampling: analysis of a series of 341 cases and review of the literature. *Eur J Obstet Reprod Biol*, 52 : 95-104
- Durandy A. (2001)** Ontogenèse du système immunitaire embryonnaire et foetal
Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier), *Gynécologie Obstétrique*, 5-006-C-20, 2001, 5 p
- Economides DL, Nicolaidis KH et al. (1989)** Plasma amino acids in appropriate and small for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, 161:1219-1224
- Edwards RJ., Watts DC. (1987)** Development of carboxypeptidase K (creatinine kinase conversion factor) in man. *Clin Chim Acta*, 162:69-74
- Emery A.E.H., Pascasio F.M. (1965)** The effects of pregnancy on the concentration of creatine kinase in serum, skeletal muscle and myometrium. *Am J Obstet Gynecol*, 91:18-
- Ezitis J., Finnstrom O., Hedman G., Rabow L. (1987)** CKBB-enzyme activity in serum in neonates born after vaginal delivery and cesarean section. *Neuropediatrics*, 18:146-148
- Fahie-Wilson MN, Burrows S., Lawson GJ, Gordon T., Wong W., Dasgupta B. (2007)** Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatinine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals.
Ann Clin Biochem, 44:377-383
- Fernandez F., Verdu A., Quero J., Perez-Higueras A. (1987)** Serum CPK-BB isoenzyme in the assessment of brain damage in asphyxiated term infants. *Acta Paediatr Scand*, 76:914-918
- Fiehn W., Seiler D. (1981)** Macrocreatinine kinase in plasma: a cause positive CK MB immunoinhibition test. *Klin Wochenschr*, 59:141
- Fishbach F, Zawta B. (1992)** Age-dependant reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. *Klin Lab*, 38:555-561
- Fonseca E., Garcia-Alonso A., Zarate A., Ochoa R., Galvan R.E., Jimenez-Solis G. (1995)** Elevation of activity of creatine phosphokinase and its isoenzymes in the newborn is associated with fetal asphyxia and risk at birth. *Clin Biochem*, 28:9195
- Forestier F., Daffos F., Rainaud M., Bruneau M., Trivin F. (1987)** Blood chemistry of normal human fetuses at midtrimester of pregnancy. *Pediatric Research*, 21 (6):579-583
- Forestier F, Cox W, Daffos F, Rainaut M. (1988)** The assessment of fetal blood samples.
Am J Obstet Gynecol, 158:1184-1188
- Foxall C.D., Emery A.E.H. (1975)** Changes in creatine kinase and its isoenzymes in human fetal muscle during development. *J Neurol Sci*, 24:483-492
- Franza C., Palmieri A. (1964)** Creatine phosphokinase activity of maternal and umbilical cord blood. *Arch Obstet Gynecol.*, 69:724-

Freer D.E., Statland B.E., Johnson M., Felton H. (1979) Reference values for selected enzyme activities and protein concentrations in serum and plasma derived from cord-blood specimens. *Clin Chem*, 25(4):565-569

Galasso P.J., Litin S.C., O'Brien JF (1993) The macroenzymes : a clinical review. *Mayo Clin Proc*, 68:349-354

Galarraga B., Sinclair M.N., Fahie-Wilson M.N., McCrae F.C., Hull R.G., Ledingham J.M. (2003) A rare but important cause for a raised serum creatine concentrations: two case reports and a literature review. *British Society for Rheumatology*, 42:186-188

Ganshirt D., Garritsen H., Miny P., Holzgreve W. (1994) Fetal cells in maternal circulation throughout gestation. *Lancet*, 23:1038-1039

George S., Ishikawa Y., Perryman M.B., Roberts R. (1984) Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *J Biol Chem*, 259:2667 – 2674

Gerhardt W., Waldenström J., Gruber W. (1979) EDTA effect on creatine kinase (CK) and on the SCE reagent. *Scand J Clin Lab Invest*, 39:737-742

Gilboa N., Swanson R. (1976) Serum creatine phosphokinase in normal newborns. *Arch Dis Child*, 51:283-285

Girgenti A.J., Brown M.T., Arroyo J.G. (1980) Interference with the determination of serum myocardial creatine kinase (CK-MB) by a macrocreatinase activity. *Clin Chem*, 26:977-978

Glick M.R., Ryder K.W., Jackson S.A. (1986) Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem*, 32:470-475

Gomez P., Coca C., Vargas C., Acebillo J., Maartinez A. (1984) Normal reference-intervals for 20 biochemical variables in healthy infants, children and adolescents. *Clin Chem*, 30(3):407-412

Gorus F., Claessens V., Goubert P., Laureys M. (1988) A sensitive bioluminescent immunoinhibition test for CK-B subunit activity and a CK-MB specific ELISA compared : correlation with agarose electrophoresis and influence of CK isoenzyme profile on results *Clin Chem*, 34(7):1474-1476

Goto I, Nagamine M.,Katsuki S. (1969) Creatine phosphokinase isoenzymes in muscles *Arch Neurol*, 20:422-426

Gozzo M.L., Noia G., Barbaresi G., Colacicco L., Serraino M., De Santis M., Lippa S., Calla C., Caruso A., Mancuso S., Giardina B. (1998) Reference intervals for 18 clinical chemistry analytes in fetal plasma samples between 18 and 40 weeks of pregnancy. *Clin Chem*, 44(3):683-685

Grande P., Hansen B.F., Christiansen C., Naestoft J. (1982) Estimation of acute myocardial infarct size in man by serum CK MB measurements. *Circulation*, 65:756-764

Grande P., Granborg J., Clemmensen P., Sevilla D.C., Wagner N.B., Wagner G.S. (1991) Indices of reperfusion in patients with acute myocardial infarction using characteristics of the CK MB time activity curve. *Am Heart*, 122:400-408

Griffiths P.D. (1964) Serum levels of creatine phosphokinase. *J Clin Path*, 17:56-57

Grobbe MA., Lawson SN., Calam RR. (1982) Cathodal creatine kinase band, a poor prognostic sign in malignancy. *Clin Chem*, 28:1995-1996

Haggarty P, Allstaff S, Hoad G, Ashton J, Abramovich Dr. (2002) Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta*, 23:86-92

Hallak M, Berry SM, Bichalski JA, Evans MI, Cotton DB (1994) Fetal liver function tests: umbilical cord gamma-glutamyltransferase as a marker for fetal abnormality. *Fetal Diagn Ther*, 9(3):165-9.

Halsall D., Fahie-Wilson M., Hall S., Barker P., Anderson J., Gama R., Chatterjee V. (2006) Macro Thyrotropin-IgG complex causes factitious increase in thyroid-stimulating hormone screening test in a neonate and mother. *Clin Chem*, 52(10):1968-1969

Hayashi T., Tanaka T. (1985) Appearance of cathodic band in the electrophoregram of blood creatine kinase isoenzyme-MM fraction during hypoxia in rats. *Clin Chem*, 31:533-536

Heinz JW., O'Donnel NJ., Lott JA. (1980) Apparent mitochondrial creatine kinase in the serum of a patient with metastatic cancer of the liver. *Clin Chem*, 26:1908-1911

Hennequin C., Vassault A., Dumont G., Bailly M. (1990) Validité des facteurs de conversion de température 30/37°C en enzymologie clinique. *Act Pharm Bio. Clin*, 5:386-389

Horder M., Elser R.C., Gerhardt W., Mathieu M., Sampson E.J. (1991) Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 7. IFCC method for creatine kinase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 29:435-456

Hoshino J., Arai H., Fukusato T., Nakamura T., Nushoro N., Sato K., et al (1995) Creatine phosphokinase linked immunoglobulins associated with hypokaliemic myopathy. *Intern Med*, 34:1210-1214

Hsiao J.F., Ning HC., Gu PW., Lin WY., Chu PH. (2008) Clinical role of recurrently elevated macrocreatinase kinase type 1. *J Clin Lab Anal*, 22:186-191

Illanes S., Denbow M., Kailasam C., Finning K., Soothill PW. (2007) Early detection of cell free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev*, 83:563-566

Inoue Y., Kobayashi T., Tomomasa T., Morikawa A. (1999) Macrocreatinase kinase in Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol*, 20(3):206-207

International Federation of Clinical Chemistry IFCC Document Stage. Draft 1, 1986, 3 IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase. Horder M., Elser R.C., Gerhardt W., Mathieu M., Sampson E.J. Ann Biol Clin, 44:419-436

Jaffé A.S., Serota H., Grace A., Sobel B. (1986) Diagnostic changes in plasma creatine kinase isoforms early after the onset of acute myocardial infarction. *Circulation*, 7:105-109

James G.P., Harrison R.L. (1979) Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum. *Clin Chem*, 25:943

Jay DW. (1988) Macrocreatine kinase comigrating with CK MB on electrophoresis. *Clin Chem*, 34 (9)

Jedeikin R., Makela S.K., Shennan A.T., Rowe R.D, Ellis G. (1982) Creatine kinase isoenzymes in serum from cord blood and the blood of healthy full-term infants during the first three postnatal days. *Clin Chem*, 28(2):317-322

Jockers-Wretou E., Pflleiderer G. (1975) *Clin Chim Acta*, 58:252

Jockers-Wretou E., Plessing E. (1979) Atypical serum CK isoenzyme pattern caused by complexing of CK BB with IgG and IgA. *J Clin Chem Clin Biochem*, 17:731-737

Jouppila R., Jouppila P., Koivisto M., et al. (1978) Maternal, foetal and neonatal blood creatine-phosphokinase isoenzymes after labor and without epidural analgesia and after caesarean section. *Anaesth Scand*, 22:491-496

Jung K., Neumann R., Cobet G., Nugel E., Egger E. (1979) Creatine kinase isoenzyme BB in serum of healthy adults and children. *Clin Chim Acta*, 91:165

Kajita Y., Majima T., Yoshimura M., Hachiya T., Miyazaki T., Ijichi H., Ochi Y. (1978) Demonstration of antibody for glutamic pyruvic transaminase (GPT) in chronic hepatic disorders. *Clin Chim Acta*, 89:485

Kamoun P, Droin V, Forestier F, Daffos F. (1985) Free aminoacids in human fetal plasma. *Clin Chim Acta*, 150(3):227-230

Kanemitsu F, Kawanishi I., Mizushima J. (1980) Complex of CK MM and IgA. *Physico-Chem Biol* 1980

Kanemitsu F, Kawanishi I., Mizushima J. (1981) Three atypical serum CK in a patient with carcinoma of the colon. *Clin Chim Acta*, 112:275-283

Kanemitsu F., Kawanishi I., Mizushima J. (1982a) Characteristics of mitochondrial creatine kinase from normal human heart and liver tissues. *Clin Chim Acta*, 119:307-317

Kanemitsu F., Kawanishi I., Mizushima J. (1982b) The origin of a cathode-migrating creatine kinase found in serum from a cancer patient. *Clin Chim Acta*, 122:377-383

Kanemitsu F., Kawanishi I., Mizushima J., Okigaki T. (1984) Mitochondrial creatine kinase as tumor-associated marker. *Clin Chim Acta*, 138:175-183

Kanemitsu F. (1986a) CK anomaly. *Jap J Clin Path*, 34:402-403

- Kanemitsu F. (1986b)** Clinical significance and characteristics of creatine kinase Ig complex in sera from patients with malignant tumors. *Clin Chim Acta*, 160:19-26
- Kanemitsu F., Okigaki T. (1988)** Creatine kinase isoenzymes. *J Chromatogr*, 429:399-417
- Kate LP., Offringa PJ., Hindricks FR. (1983)** Serum creatine kinase in normal pregnancy *Am J Med Genet*, 15:665-667
- Kerenyi T., Sarkozi L. (1974)** Diagnosis of fetal death in utero by elevated amniotic fluid CPK levels. *Obstetrics and Gynecology*, 44(2):215-218
- Konttinen A., Pyorala T. (1963)** Serum enzyme activity in late pregnancy, at delivery and during the puerperium. *Scand J Clin Lab Invest*, 15:429-
- Konttinen A., Murros J., Ojala K., Salaspuro M., Somer H., Rasanen J. (1978)** A new cause of increased serum aspartate aminotransferase activity. *Clin Chim Acta*, 84: 145
- Kristensen S.R., Horder M., Pederseng J. (1979)** Reference values for 6 enzymes in plasma from newborns and women at delivery. *Scand J Clin Lab Invest*, 39 (8):777-784
- Kuint J., Pipano S., Linder N., Reichman B., Sela B-A. (1993)** Serum macrocreatine kinase type 2 in asphyxiated newborn infants. *Clin Biochem*, 26:117-120
- Kumpel B., Wood SM., Anthony PP., Brimblecombe FS. (1983)** Umbilical cord serum creatine kinase BB in the diagnosis of brain damage in the newborn : problems in interpretation. *Arch Dis Child*, 58:382-383
- Kwong T.C., Arvan D.A (1981)** How many creatine kinase isoenzymes are there and what is their clinical significance? *Clin Chim Acta*, 115:3-8
- Lacher DA., Elsea RE. (1986)** Effect of a lipid clarifying reagent on results of Beckman Astra methods. *Clin Chem*, 32:394
- Landaas S., Urdal P., Reikvama A., Semb G. (1981)**
Clin Chim Acta, 111: p179
- Lang H. (1981)**
Creatine kinase isoenzymes
Springer-Verlag Berlin: p24
- Lang H., Wurzburg U. (1982)** Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clin Chem*, 28:1439-1447
- Laraki R. (2006)**
Élévation des créatine-phosphokinases
EMC (Elsevier SAS, Paris), Traité de Médecine Akos 1-1210
- Larsen F., Rossner S. (1983)** Serum creatine kinase in obese subjects before and during weight reduction. *Clin Chim Acta*, 33:285-288

- Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY, Lo YM. (2000)** Cell-free fetal desoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term. *Am J Obstet Gynecol*, 183:712-716
- Laureys M, Sion JP, Slabbynck. et al (1991)** Macromolecular creatine kinase type 1: a serum marker associated with disease. *Clin Chem*, 37(3):430-434
- Laurino J.P., Bender E.W., Kessimian N., Chang J., Pelletier T., Usategui M. (1996)** Comparative sensitivities and specificities of the mass measurements of CK MB2, CK MB and myoglobin for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 42:1454-1459
- Lavaud J., Chopin N., et al. (1979)** Isoenzyme BB de la creatine kinase sérique, témoin de la souffrance cérébrale néonatale. *Nouv. Presse Med*, 8:3821-3824
- Lavoine A., Quillard M., Hue G. (1997)** Marqueurs cardiaques : de l'activité de la créatine-kinase au dosage de la troponine I. *Feuillets de biologie*, 38(16):67-71
- Lee KN., Csako G., Bernhardt P., Elin RJ. (1994)** Relevance of macrocreatinine type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem*, 40:1278-1283
- Legras B., Clerc C., Ruelland A., Vialard J., Millon J., Cloarec L. (1990)** Blood chemistry of human fetuses in the second and third trimesters. *Prenat Diagn*, 10:801-807
- Levy R., Arfi J-S., Daffos F. (2003)** Techniques de prélèvements foetaux. *Gynécologie Obstétrique et fertilité*, 31:550-555
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM (1998)** Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet*, 352:1904-1905
- Lim F. (1975)** Significance and application of CPK isoenzyme sub-bands in the clinical laboratory. *Clin Chem*, 21:975
- Lipitz S. et al. (1993)** Fetal urine analysis for the assessment of renal function in obstructive uropathy. *Am J Obstet Gynecol*, 168:174-179
- Liras G., Diaz V., Alvarez C., Arenas J., Sanz R., Martinez V. (1988)** Total creatine kinase and CK-B activity in maternal blood and cord-blood samples after vaginal and cesarean births *Clin Chem*, 34(7):1498-1499
- Liu TZ., Shen JT., Shohet SB. (1980)** Atypical cathode-migrating creatine kinase isoenzyme and human breast carcinoma: a specific marker? *Clin Chem*, 26:1765-1666
- Ljungdahl L., Gerhardt W. (1978)** Creatine kinase isoenzymes variants in human serum *Clin Chem*, 24:832-834
- Lo YMD., Corbetta N., Chamberlain PF., Rai V., Sargent IL., Redman CW., Wainscoat JS. (1997)** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350:485-487

Lo YMD, Jein MSC., Lau TK., Haines CJ., Leung TN., Poon PMK., et al. (1998) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for non invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 62:768-775

Lo YMD, Zhang J., Leung TN., Lau TK., Chang AMZ, Hjelm NM. (1999)
Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999c, 64 : 218-224

Lo YM., Tsui NB., Chiu RW., Lau TK., Leung TN., Heung MM et al. (2007)
Plasma placenta RNA allelic ratio permits non invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med*, 13:218-223

Ludvigsen C.W., Muus C., Meyer I., Haven M. (1986) Creatine kinase variant type 1 in children with anoxic insult. *Clin Chem*, 32(4):689-691

Lundh B. (1965) A macromolecular serum lactate deshydrogenase activity in a case of leukemia. *Clin. Chim. Acta.*, 16 :305

Maire I, Artur Y., Sanderink G.J (1987) Les macroenzymes dans le plasma humain : 1ère partie. Macroamylase, macrocréatine kinase, macrolactate deshydrogenase. *Ann Biol Clin*, 45:269-276

McIntosh N, Rodeck CH, Heath R (1984) Plasma amino acids of the mid-trimester human fetus. *Biol Neonate*, 45(5):218-24.

Mc Neely M., Berris B., Papsin F.R., Lyons E., Schipper H. (1977) Creatine kinase and its isoenzymes in the serum of women during pregnancy and the peripartum period. *Clin Chem*, 23(10):1878-1880

Massey T.H., Barta S. (1982) Creatine kinase isoenzymes in neonate plasma by cellulose acetate electrophoresis : albumin and adenylate kinase artifacts. *Clin Chem*, 28(5):1174-1176

Massey TH., Goe MR. (1984) Transient creatine kinase BB activity in serum or plasma after cardiac or respiratory arrest. *Clin Chim Acta*, 30:50-55

Mathieu M. (1990)
Créatine kinase, chapitre 15
In : Référence en biochimie, édition Option Bio : 247-260

Medeiros LJ., Greco A.F, Walsh D., Gerson B. (1985) Macrocreatine kinase type 1 with electrophoretic mobility identical to that of the MB isoenzyme. *Clin Chem*, 31(8):1393-1396

Mercer DW., Talamo TS.(1985) Multiple markers of malignancy in sera of patients with colorectal carcinoma: preliminary clinical studies. *Clin Chem*, 31:1824-1828

Mirlesse V, Jacquemard F, Daffos F, Forestier F. (1996) Fetal gammaglutamyl transferase activity: clinical implication in fetal medicine. *Biol Neonate.*, 70(4):193-8.

Miyaki S., Taketa K., Izumi M. (1980) Cathodic isoenzyme of CK in a case of stomach cancer complicated by disseminated intravascular coagulation. *Clin Chim Acta*, 108: 323-328

- Moe AJ. (1995)** Placental aminoacid transport. *Am J of Physiology*, 268:C1321-1331
- Monitz CF, Nikolaides KH., (1985)** Normal reference ranges for biochemical substances relating to renal, hepatic, and bone function in fetal and maternal throughout pregnancy. *J Clin Pathol*, 38:468-472
- Morelli RL, Carlson CJ, Emilson B., Abendschein DR, Rapaport E. (1983)** Serum creatine kinase MM isoenzyme sub-bands after acute myocardial infarction in man. *Circulation*, 67:1283-1289
- Morris R.K. (2007)** Systematic review of accuracy of fetal urine analysis to predict poor postnatal renal function in cases of congenital urinary tract obstruction. *Prenat diagn*, 27:901-911
- Muller F., Dommergues M. (1993)** Fetal urine biochemistry predicts postnatal renal function in children with bilateral obstructive uropathies. *Obstet Gynecol*, 82:813-820
- Muller F., Dommergues M. et al (1996)** Development of human renal function: reference intervals for 10 biochemical markers in fetal urine. *Clin Chem*, 42(11):1855-1860
- Nagamine M., Ohkuma S. (1975)** Serum alkaline phosphatase isoenzymes linked to immunoglobulin G. *Clin Chim Acta*, 65: 39
- Nakagawa H. (1982)** An abnormal isoenzyme of creatine kinase in the serum of a patient with metastatic carcinoma: identity with mitochondrial creatine kinase. *Clin Chem*, 28:723-725
- Nanji AA. (1983)** Serum creatine kinase isoenzymes. *Muscle and Nerve*, 6:83-90
- Nava S., Bocconi L., Zuliani G., Kustermann A., Nicolini U. (1996)** Aspects of fetal physiology from 18 to 37 week's gestation as assessed by blood sampling. *Obstet Gynecol*, 87(6):975-980
- Nealon D.A., Henderson A.R. (1977a)** Inactivation of brain creatine kinase: an in vitro effect of dimeric albumin. *J Clin Pathol*, 30:1977
- Nealon DA., Henderson AR. (1977b)** Stability of commonly used thiols and of human creatine kinase isoenzymes during storage at various temperatures in various media. *Clin Chem*, 23:816-829
- Nelson RM., Bucciarelli RL., Eitzman DV., Egan EA., Gessner IH. (1978)** Serum creatine phosphokinase MB fraction in newborn with transient tricuspid insufficiency. *N Engl J Med*, 298:146-149
- Neumeier D., Prellwitz W., Wurzburg U, et al. (1976)** Determination of creatine kinase isoenzyme MB activity in serum using immunological inhibition of creatine kinase M subunit activity. Activity kinetics and diagnostic significance in myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 73:445-451.
- Neumeier D., Prellwitz W., Sandel P., Knedel M. (1978)** *Klin. Wochenschr*, 56: p449

Nicolini U., Nicolaidis P., Fisk NM., Tannirandon Y., Rodeck CH. (1990) Fetal blood sampling from the intrahepatic vein : analysis of safety and clinical experience with 214 procedures. *Obstet Gynecol*, 76:47-53

Nicolini U, Nicolaidis P, Tannirandorn Y, Fisk NM, Nasrat H, Rodeck CH. (1991) Fetal liver dysfunction in Rh alloimmunization. *Br J Obstet Gynaecol*. 98(3):287-93.

Niklinski W. (1987) Cord blood serum creatine kinase isoenzymes with placental dysfunction *J Perinat Med*, 15(4):350-354

Niklinski W. (1989) Acid base status of the newborn in relation to cord blood serum creatine kinase isoenzymes activities. *Biomed Biochem Acta*, 48(2-3):200-203

Okano O., Yamamoto K., Ohba Y., Matsumura K., Miyaji T (1987) Source of elevated serum mitochondrial creatine kinase activity in patients with malignancy. *Clin Chim Acta*, 169:159-164

Oliver IT. (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J*, 61:6116-6122

Orlandi F. (1987) Clinical results and fetal biochemical data in 140 early second trimester diagnostic cordocenteses. *Acta Europea Fertilitatis*, 18(5):329-333

Otashi Y., Miharu N., Honda H., Samura O., Ohama K. (2001) Quantification of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Human Genet*, 108:123-127

Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa A, Zago C, Carneiro-Sampaio M. (2012) IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*, ID 985646:13 pages

Panteghini M., Cuccia C., Malchiodi A., Calardo M., Pagnoni N. (1986) Isoforms of creatine kinase MM and MB in acute myocardial infarction : a clinical evaluation. *Clin Chim Acta*, 155:1-10

Panteghini M., Pagani F. (1987) Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes in acute myocardial infarction after intracoronary thrombolysis. *Clin Chem*, 33:2039-2042

Panteghini M. (1988) Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes : review. *Clin Biochem*, 21:211-218

Panteghini M, Agnoletti G, Spandrio M. (1995) Reference values for two serum cardiac markers, troponin T and CKMB mass in premature infants. *Clin Chem*, 41:1105-1109

Pascarella F., Caropreso M; Miele E., Fortunato G., Vajro P., Staiano A. (2007) Macro-creatine kinase and macro-lactate dehydrogenase in a girl with ulcerative colitis *Dig Liver Dis*, 39(8):780-781

Passos-Bueno MR., Rabbi-Bortolini E., Azevedo E., Zatz M. (1989) Racial effect on serum creatine kinase : implications for estimation of heterozygosity risks for females at risk for Duchenne dystrophy. *Clin Chim Acta*, 170:163-168

- Pearlman C., Wheadon D., Epstein S. (1988)** Creatine kinase elevation after neuroleptic treatment. *Am J psychiatry*, 145:1018-1019
- Pearson H.A (1971)** Life span of fetal red blood cells. *J Pediatr*, 70:166-177
- Père MC. (2003)** Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: comparison between species. *Reprod Nutr Dev*, 43:1-15
- Perkins S., Livesey J.F., Belcher J. (1993)** Reference intervals for 21 clinical chemistry analytes in arterial and venous umbilical cord blood. *Clin Chem*, 39(6):1041-1044
- Perryman MB, Strauss AW, Buettner TL, Roberts R. (1983)** Molecular heterogeneity of creatine kinase isoenzymes. *Biochim Biophys Acta*, 747:284-290
- Perryman MB., Knell JD., Roberts R. (1984)** Carboxypeptidase-catalysed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma. *Clin Chem*, 30:662-664
- Pesce M., Bodourian SH. (1983)** Effect of atypical creatine kinase isoenzyme and CKBB on an immunochemical CK-MB assay. *Clin Chem*, 29:584
- Pesce MA. (1985)** A macromolecular isoenzyme : the CK BB IgG complex
The American Society of Clinical Pathologists Check Sample Clinical Chemistry Program, 25(5):1-6
- Pesce M.A., Bodourian S.H. (1987)** A novel CK isoenzyme migrating between CK-MB and CK-BB. *Clin Biochem*, 20:37-42
- Poon LL., Leung JN., Lau TK., Lo YMD. (2000)** Presence of fetal RNA in maternal plasma
Clin Chem, 46:1832-1834
- Prabhakaran V, Nealon D.A., Henderson P. (1979)** Interaction between human IgG and human creatine kinase isoenzyme 1 in serum : a route for the intravascular catabolism of creatine kinase 1?
Clin Chem, 25(1):112-116
- Pudek MR, Jacobson BE. (1982)** Falsely negative laboratory diagnosis for myocardial infarction owing to concurrent presence of macro CK and macro LDH.
Clin Chem, 28:2434-2437
- Raga X., Vilanova MA., Bardaji A., Pastor MR., Richart C. (1992)** Macrocréatine kinase, origine de valeurs faussement élevées d'isoenzyme MB. *Arch Mal Coeur*, 85:1601-1603
- Remaley AT, Wilding P. (1989)** Macroenzymes biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*, 35:2261-2270
- Rizotti P., Cocco C., Burlina A., Marcer V., Plebani M., Burlina A. (1985)** Macro creatine kinase type 2 : a marker of myocardial damage in infants? *Clin Biochem*, 18:239-241
- Roberts R., Grace AM. (1980)** Purification of mitochondrial creatine kinase : biochemical and immunological characterization. *J Biol Chem*, 255:2870-2877

Rock RC., Dreskin R., Kickley JP., Simsatt T. (1975) Creatine kinase isoenzymes in the serum of patients with Reyes's syndrome. *Clin Chim Acta*, 62:159-162

Rogalsky VY., Koven IH., Miller DR., Pollard A. (1985) Macrocreatine kinase type 2 in human colonic tissues. *Clin Biochem*, 18:338-341

Rosalski SB. (1967) An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination *J Lab Clin Med*, 69:696-705

Rosalki S.B. (1998) Low serum creatine kinase activity. *Clin Chem*, 44:905-

Rudolph N., Gross R.T. (1986) Creatine phosphokinase activity in serum of newborn infants as an indicator of fetal trauma during birth. *Pediatrics*, 38:1039

Ruth V.J. (1989) Prognostic value of creatine kinase BB isoenzymes in high risk newborn infants. *Archives of Disease in childhood*, 64:563-568

Sabater J., Villalba M. (1972) Creatine phosphokinase levels in umbilical cord blood *Clin Chim Acta*, 36:201-206

Sammour M, Fattah M.A., Fawzia K., Ramadan M. (1974) Creatine phosphokinase activity in maternal, cord blood and placenta of normal pregnancy, and in EPH-gestosis *Biochemical Medicine*, 11:205-209

Sax S, Moore J.J, Giegel J.L., Welsh M. (1976) Atypical increase in serum creatine kinase activity in hospital patients. *Clin Chem*, 22:87

Sax S.M., Moore J.J., Giegel J.L., Welsh M. (1979) Further observations on the incidence and nature of atypical creatine kinase activity. *Clin Chem*, 25:535-

Scandinavian Committee on Enzymes Evaluation SSCC (1981)

I. Creatine Kinase (EC 2.7.3.2.) and creatine kinase B-subunit activity in serum in suspect myocardial infarction. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology (SCE). The Nordic Clinical Chemistry Project (NORDKEM), Helsinki, Finland, ISBN, 1981; 951-46-5203-7

Schmidt E.W., Bender W., Breinl H., et al. (1979) Creatine kinase and creatine kinase isoenzyme activities in newborns. Development of the organ-typical isoenzyme pattern during the fetal period. *Zeitschrift für Geburtshilfe and Perinatologie*, 183 (1):51-57

Shields WD., Feldman RC. (1982) Serum CK BB isoenzymes in preterm infants with periventricular hemorrhage. *J Pediatr*, 100:464-468

Siegel AJ., Silverman LM., Evans WJ. (1983) Elevated skeletal muscle creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. *J Am Med Assoc*, 250:2835-2837

Simpson J, Zellweger H, Burmeister LF, Christee R, Nielsen MK. (1974) Effect of oral contraceptive pills on the level of creatine phosphokinase with regard to carrier detection in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta*, 52:219-223

Commission Enzymologique de la **Société Française de Biologie Clinique SFBC (1982)**
Recommandations pour la mesure de la concentration catalytique de la créatine kinase dans le sérum humain à 30°C. *Ann Biol Clin*, 40:99-111

Somer H., Votila A., Kontinnen A., Saris NE. (1974) Creatine kinase activity and its isoenzyme patterns in heart mitochondria. *Clin Chim Acta*, 53:369-372

Somer H., Dubowitz V. (1976) CPK isoenzymes in neuromuscular disorders. *J Neurol Sci*, 29:129-136

Steghens JP (1984)

Creatine kinase BB placentaire humaine
Thèse Doctorat Es Sciences Pharmaceutiques
Lyon 1984

Stein W., Bohner J., Kraus J., Muller M. (1980)

J Clin Chem Clin Biochem, 18:677

Stein W., Bohner J., Kraus J., Muller H., Steinhart R., Eggstein M. (1981)

Macro CK BB: evidence for specific binding between CK BB and IgG.
J Clin Chem Clin Biochem, 19:925-930

Stein W., Bohner J., Steinhart R., Eggstein M. (1982a) Macrocreatine kinase: determination and differentiation of two types by their activation energies. *Clin Chem*, 28:19-24

Stein W., Bohner J., Eggstein M (1982b) Macrocreatine kinases in hospitalised patients. *Clin Chem*, 28:1641

Stein W., Bohner J., Eggstein M., Lang H. (1983a) Creatine variants. *J Clin Chem Clin Biochem*, 21:859-876

Stein W., Bohner J. (1983b) MacroCK: aspects of enzyme kinetics. *Clin Chem*, 29:1265

Stein W., Bohner J., Steinhart R. (1984) Differences in substrates affinity among creatine kinase isoenzymes and macrocreatine kinase. *J Clin Chem Clin Biochem*, 19:239

Stein W., Bohner J. (1985a) Influence of autoantibodies to CK-BB on assays for MB isoenzyme. *Clin Chem*, 31:1189-1192

Stein W., Bohner J., Bahlinger M. (1985b) Analytical patterns and biochemical properties of macroCPK 2. *Clin Chem*, 31:1952-1958

Stein W., Bohner J., Renn W., Maulbetsch R. (1985c) Macro creatine kinase type 2: results of a prospective study in hospitalized patients. *Clin Chem*, 31(12):1959-1964

Stein W., Bohner J., Bahlinger M (1987) Macro-lipase: a new member of the family of immunoglobulin-linked enzymes. *J Clin Chem Clin Biochem*, 25:837-843

Stein W, Decker E. (1989)

Post-transcriptional isoforms of CK: mechanisms and possible clinical applications.

In : Biologie prospective. 7ème colloque de Pont-à-Mousson : 235-241

Steirteghem A.C., Robertson E.A., Zweig M.H. (1979) Distribution of serum concentrations of creatine kinase MM and BB isoenzymes measured by radioimmunoassay

Clin Chim Acta, 93:25-

Sturk A., Sanders GT. (1990) Macroenzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem*, 28:65-81

Sutton T., O'Brien J., Kleinberg F., House R., Feldt R. (1981) Serum levels of creatine phosphokinase and its isoenzymes in normal and stressed neonates. *Mayo Clin Proc*, 56:150-154

Szaz G., Gruber W. (1976) Creatine kinase serum. 1: determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem*, 22:650-656

Szaz G., Gruber W. (1982) Creatine kinase in serum: effect of thiols on isoenzyme activity during storage at various temperatures. *Clin Chem*, 24:1557-1583

Tabor A., Alfircvic Z. (2010) Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*, 27:1-7

Takahahashi K., Shutta K., Matsuo B. (1977) Serum CK isoenzymes in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta*, 75:435-442

Teramo K.A., Widness J.A (2009) Increased fetal plasma and amniotic-fluid erythropoietin concentrations: markers of intrauterine hypoxia. *Neonatology*, 95(2):105-116

Tozawa T. (1989) Enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance

Electrophoresis, 10:640-644

Tzvetanova E. (1971) Creatine kinase isoenzymes in muscle tissue of patients with neuromuscular diseases and human fetuses. *Enzyme*, 12:279-288

Urdal P., Landaas S. (1979) Macrocreatine kinase BB in serum and some data on its prevalence. *Clin Chem*, 25:461-465

Urdal P. (1981) Macrocreatine BB isoenzyme in serum: most likely an antigen autoantibody complex. *Scand J Clin Lab Invest*, 41:499

Urdal P., Urdal K., Stromme J.H. (1982) Age related reference intervals for creatine kinase BB in serum. *Scand J Clin Lab Invest*, 42:621-625

Velletri K, Griffiths WC., Diamonds I. (1975) Abnormal electrophoretic mobility of creatine kinase MM isoenzyme. *Clin Chem*, 21:1837-1838

Venta R., Geijo S.A., Sanchez A.C., Bao C.G., Bartolome L.A et al. (1989) IgA CK BB complex with CK MB electrophoretic mobility can lead to erroneous diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 35:200-2008

- Virji M.A., (1985)** Circulating prostatic acid phosphatase-immunoglobulin complexes in Sjogren's syndrome. *Clin Chim Acta*, 151:223
- Walsh P., Jedeikin R., Ellis G., Primhak R., Makela SK. (1982)** Assessment of neurologic outcome in asphyxiated term infants by use of serial CK BB isoenzyme measurements. *J Pediatr*, 101:988-92
- Weiner C.P., Sipes S., Wenstrom K. (1992)** The effect of fetal age upon normal fetal laboratory values and venous pressure. *Obstet Gynecol*, 7(5):713-718
- Weseley SA., Byrnes A., Alters S., Solangi B., Goodman AI. (1977)** Presence of brain creatine phosphokinase in the serum of chronic renal disease patients. *Clin Nephrol*, 8:345-348
- Wevers RA., Reutelingsperger CPM, Dam B., Soons JBJ (1981)** Mitochondrial creatine kinase in the brain. *Clin Chim Acta*, 119:209-223
- Whelan P.V., Malkus H. (1983)** A macrocreatine kinase isoenzyme in serum of apparently healthy individuals. *Clin Chem*, 20:1411-1414
- Wilding P., Cooke W.T., Nicholson G.L. (1964)** Globulin-bound amylase : a cause of persistently elevated levels in serum. *Ann Intern Med* 60: 1053-1059
- Wilkins I. et al. (1987)** The non predictive value of fetal urinary electrolytes : preliminary report of outcomes and correlations with pathologic diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*, 157:694-698
- Wright C.F., Burton H. (2009)** The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*, 15 (1):139-151
- Wu A.H.B., Bowers GN. (1982)** Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB from BB and macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals. *Clin Chem*, 28:2017-
- Wu A.H.B., Herson WC, Bowers GN (1983)** Macrocreatine kinase type 1 and 2: clinical significance in neonates and children as compared with adults. *Clin Chem*, 29:201-
- Wu A.H.B. (1992)** Creatine kinase MM and MB isoforms. *Lab med*, 23:303-305
- Yang X.S., Meng Q.Y. (1993)** Serum isoforms of creatine kinase MM isoenzyme in acute myocardial infarction. *Clin Med J*, 106:410-414
- Yasmineh WG, Yamada MK, Cohn JN. (1981)** Postsynthetic variants of creatine kinase MM. *J Lab Clin Med*, 98:109-118
- Yasmineh WG., Lewis LA, Apple FS. (1984)** Chromatographic behavior of Ig-bound creatine kinase on DEAE-Sephadex A-50. *Clin Chim Acta*, 144:29-37
- Yuu H., Ishizawa S., Takagi Y., Gomi K., Senju O., Ishii T. (1980)** Macro CPK : a study of CK linked Ig. *Clin Chem*, 26:1816-1820

Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. (2000) High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant women with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn* , 20:838-840

Zhong XY, Laivuori H, livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W. (2001) Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating desoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 184:414-419

ANNEXES

Annexe 1 : Descriptif des pathologies foetales diagnostiquées chez les 116 foetus

Code ABM	Groupe de pathologies	Effectif (n = 116)	Diagnostic
1	pathologies infectieuses	6	- infection à <i>Cytomégalo</i> virus (2) - infection à <i>Toxoplasma gondii</i> (1) - infections materno-foetales bactériennes (3)
2	anomalies du tube digestif	0	
3	anomalies de l'appareil urinaire	7	- polykystose rénale (4) - dysplasie rénale multikystique (1) - uropathie obstructive bilatérale (2)
4	anomalies du SNC	31	- anomalies de fermeture du tube neural (myéломéningocèle) (11) - anomalies de la fosse postérieure (agénésie vermiennne) (2) - anomalies de la ligne médiane (corps calleux et septum pellucidum) (8) - ventriculomégalie/hydrocéphalie isolée (4) - anomalie du cortex cérébral par défaut de migration neuronale (lissencéphalie) (1) - lésions cérébrales ischémo-hémorragiques (3) - encéphalomalacie (1) - kyste arachnoïdien frontal (1)
5	anomalies de l'appareil cardiovasculaire	9	- hypoplasies du coeur gauche (5) - cardiopathies cyanogènes (VDDI, APSO) (2) - tumeur du ventricule droit (rhabdomyome) (1) - cardiopathie complexe (1)
6	alloimmunisation	1	-alloimmunisation foetomaternelle RH1 (1)
7	polymalformations	14	- malformations multiples (14)
8	RCIU	9	- RCIU d'origine vasculo-placentaire (5) - RCIU secondaire à RPM/anamnios (4)
9	anomalies de l'appareil pulmonaire	1	- malformation adénomatoïde kystique du poumon (1)
10	anomalies chromosomiques	31	- trisomie 21 (16) - trisomie 18 (5) - trisomie 5 (2) - trisomie 13 (2) - tétrasomie 15 (1) - triploïdie X (1) - délétions chromosomiques (del 21 ; del 22q) (2) - maladie de l'X fragile (1) - sclérose tubéreuse de Bourneville (1)
11	autres	7	- RPM idiopathique sans RCIU associé (3) - mort foetale in utéro (1) - immobilisme foetal (2) - chondrodysplasie (1) - prééclampsie (1)

Annexe 2 : Descriptif des pathologies foetales diagnostiquées chez les 84 foetus étudiés

Code ABM	Groupe de pathologies	Effectif (n=84)	Diagnostic
1	pathologies infectieuses	5	- infection à <i>Cytomégalo</i> virus (1) - infection à <i>Toxoplasma gondii</i> (1) - infections materno-foetales bactériennes (3)
2	anomalies du tube digestif	0	///
3	anomalies de l'appareil urinaire	6	- polykystose rénale (4) - dysplasie rénale multikystique (1) - uropathie obstructive (1)
4	anomalies du SNC	23	- anomalies de fermeture du tube neural (myéломéningocèle) (8) - anomalies de la fosse postérieure (agénésie vermiennne, hypoplasie cérébelleuse) (2) - anomalies de la ligne médiane (corps calleux et septum pellucidum) (7) - ventriculomégalie/hydrocéphalie isolée (3) - lésions cérébrales ischémo-hémorragiques (1) - encéphalomalacie (1) - kyste arachnoïdien frontal (1)
5	anomalies de l'appareil cardiovasculaire	7	- hypoplasies du coeur gauche (3) - cardiopathies cyanogènes (VDDI, APSO) (2) - tumeur du ventricule droit (rhabdomyome) (1) - cardiopathie complexe (ventricule gauche unique, malposition des gros vaisseaux) (1)
6	alloimmunisation	1	-alloimmunisation foetomaternelle RH1 (1)
7	polymalformations	5	malformations multiples (5)
8	RCIU	6	- RCIU d'origine vasculo-placentaire (4) - RCIU secondaire à RPM/anamnios (2)
9	anomalies de l'appareil pulmonaire	1	- malformation adénomatoïde kystique du poumon (1)
10	anomalies chromosomiques	25	- trisomie 21 (14) - trisomie 18 (5) - trisomie 5 (1) - tétrasomie 15 (1) - délétions chromosomiques (del 21 ; del 22q) (2) - maladie de l'X fragile (1) - sclérose tubéreuse de Bourneville (1)
11	autres	5	- RPM idiopathique sans RCIU associé (2) - immobilisme foetal (1) - chondrodysplasie (1) - prééclampsie (1)

Annexe 3 : Analyse comparative des paramètres biologiques (activité CK totale et CKMB) selon le code « pathologie » chez les groupes de foetus avec et sans macroCK.

Code pathologie	Profil électrophorétique	Effectif	Age gestationnel (SA)	CK totale (UI/L)	CKMB (UI/L)
			<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]	<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]	<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]
1	sans macroCK	3	27 [27 ; 30]	197 [150,0 ; 1067,0]	30 [23 ; 186]
	avec macroCK	2	23,5 [23 ; 24]	117,5 [69 ; 168]	21,5 [13 ; 30]
3	sans macroCK	5	29 [21 ; 33]	198 [88 ; 409]	25 [14 ; 73]
	avec macroCK	1	29	153	25
4	sans macroCK	18	34 [25 ; 36]	182,5 [60 ; 653]	26,5 [11 ; 167]
	avec macroCK	5	26 [23 ; 37]	220 [85 ; 554]	22 [18 ; 109]
5	sans macroCK	6	27 [24 ; 36]	100 [40 ; 722]	18,5 [10 ; 147]
	avec macroCK	1	29	236	52
8	sans macroCK	4	27 [24 ; 29]	182,5 [96 ; 255]	19,5 [13 ; 25]
	avec macroCK	2	26 [24 ; 28]	246,5 [192 ; 301]	54,5 [20 ; 89]
10	sans macroCK	18	25,5 [20 ; 33]	152 [52 ; 395]	19,5 [10 ; 81]
	avec macroCK	7	24 [22 ; 34]	88 [50 ; 550]	19 [14 ; 115]
11	sans macroCK	3	29 [25 ; 31]	123 [74 ; 515]	9 [0 ; 84]
	avec macroCK	2	25,5 [25 ; 26]	169,5 [165 ; 174]	47 [38 ; 56]

La comparaison est effectuée avec un test de Mann Whitney (uniquement pour les groupes 4 et 10 en gras).

* différence significative au risque de 5%

Annexe 4 : Analyse comparative des paramètres biologiques (isoenzymes CK) selon le code « pathologie » chez les groupes de foetus avec et sans macroCK.

Code pathologie	Profil électrophorétique	Effectif	Pourcentage CK MM (%)	Pourcentage CK MB (%)	Pourcentage CK BB (%)
			électrophorèse	électrophorèse	électrophorèse
			<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]	<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]	<i>médiane</i> [valeurs extrêmes]
1	sans macroCK	3	78 [57 ; 83]	17 [14 ; 31]	5 [4 ; 12]
	avec macroCK	2	59 [48 ; 70]	19,5 [19 ; 20]	15,5 [4 ; 27]
3	sans macroCK	5	76 [71 ; 79]	19 [14 ; 23]	6 [2 ; 7]
	avec macroCK	1	83	9	6
4	sans macroCK	18	75 [58 ; 97]	19,5 [3 ; 29]	5,5 [0 ; 18]
	avec macroCK	5	64* [60 ; 65]	19 [14 ; 30]	4 [3 ; 13]
5	sans macroCK	6	74 [63 ; 100]	19 [0 ; 32]	3,5 [2 ; 11]
	avec macroCK	1	68	23	3
8	sans macroCK	4	80,5 [70 ; 84]	15 [10 ; 25]	5,5 [3 ; 6]
	avec macroCK	2	67 [62 ; 72]	18 [8 ; 28]	7,5 [2 ; 13]
10	sans macroCK	18	70,5 [42 ; 100]	20 [0 ; 48]	6 [0 ; 21]
	avec macroCK	7	60* [33 ; 75]	11* [4 ; 17]	10 [1 ; 19]
11	sans macroCK	3	83 [75 ; 100]	13 [0 ; 19]	4 [0 ; 6]
	avec macroCK	2	63 [59 ; 67]	13,5 [13 ; 14]	6,5 [6 ; 7]

La comparaison est effectuée avec un test de Mann Whitney (uniquement pour les groupes 4 et 10 en gras).

* différence significative au risque de 5%

Annexe 5 : Caractéristiques des foetus présentant une macroCK (n = 20)

n°	Age maternel (ans)	Age gestationnel (SA)	Sexe	Activité CK totale (UI/L)	Activité CKMB (UI/L)	CKMB (%)	CKMM (%)	CKMB (%)	CKBB (%)	MacroCK (%)	Diagnostic	Code
						<i>immuno-inhibition</i>	<i>électrophorèse</i>					
1	34	23	M	69	13	19	48	19	27	6	Infection maternofoetale bactérienne à Streptococcus agalactiae - RPM avec anamnios	1
2	28	24	F	166	30	18	70	20	4	6	Infection à CMV – anamnios et RCIU sévère et précoce (grossesse gémellaire)	1
3	29	29	M	153	25	16	83	9	6	2	Polyskystose hépatorénale autosomique récessive (quasi anamnios avec RCIU)	3
4	29	37	M	554	109	20	60	30	3	7	Ventriculomégalie bilatérale	4
5	31	31	M	220	22	10	64	14	4	18	Lésions cérébrales ischémo-hémorragiques (RCIU avec oligoamnios)	4
6	24	26	M	113	18	16	62	27	3	8	Myéломéningocèle lombosacrée étendue avec syndrome d'Arnold Chiari	4
7	36	23	M	85	20	24	65	14	13	8	Agénésie complète du corps calleux	4
8	28	24	M	256	45	18	65	19	4	12	Ventriculomégalie avec rupture septale et hypoplasie cérébelleuse	4
9	35	29	M	236	52	22	68	23	3	6	Cardiopathie type APSO avec hypoplasie de l'artère pulmonaire	5
10	17	24	F	301	89	30	62	28	2	8	RCIU sévère avec anamnios sur RPM et décollement placentaire précoce	8
11	30	28	M	192	20	10	72	8	13	7	RCIU sévère avec oligoamnios (HELLP syndrome)	8
12	34	28	F	68	14	21	72	4	14	10	Trisomie 21 (RCIU, cardiopathie, colpocéphalie)	10
13	32	22	F	50	19	38	53	16	10	26	Trisomie 21	10
14	34	22	F	69	62	90	33	9	11	47	Trisomie 21	10
15	40	24	F	550	115	21	75	17	3	5	Trisomie 21	10
16	44	23	M	88	18	20	60	16	2	22	Trisomie 18	10
17	39	31	F	100	14	14	57	11	19	13	Trisomie 18 (CIV, bifidité urétéropyélorénale, hydramnios, RCIU)	10
18	28	34	F	91	37	41	73	9	1	17	Trisomie 5 partielle en mosaïque (polymalformations, hydramnios, RCIU modéré)	10
19	31	26	M	174	56	32	59	13	6	22	RPM précoce à 23 SA avec anamnios sans RCIU	11
20	34	25	F	165	38	23	67	14	7	12	RPM précoce à 18 SA avec oligoamnios sans RCIU	11

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 25 Octobre 2012

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Isabelle BOCK</p> <p><u>Sujet</u> :</p> <p>Intérêt de l'étude des isoenzymes de la créatine kinase et de la détection des macroCK en pathologie foetale</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Professeur Brigitte LEININGER Directeur : Docteur Brigitte DOUSSET Juges : Professeur Jean-Luc OLIVIER Docteur Alain MITON</p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 13/09/2012</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">   </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 17.09.2012</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Francine PAULUS </p> <p align="center">  </p>	<p align="right">Vu, Nancy, le - 1 OCT. 2012</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Pierre MUTZENHARDT </p> <p align="right">N° d'enregistrement : 5032</p>

N° d'identification :

TITRE

Intérêt de l'étude des isoenzymes de la créatine kinase et de la détection des macroCK en pathologie foetale

Thèse soutenue le 25 Octobre 2012

Par Isabelle BOCK

RESUME :

La créatine kinase est une enzyme ubiquitaire indispensable au métabolisme énergétique de la cellule. Il existe 3 isoenzymes cytosoliques de spécificité tissulaire différente : la CKMM, provenant essentiellement des muscles squelettiques, la CKMB d'origine myocardique et la CKBB présente dans le SNC, le tractus digestif et génital, les reins et les poumons. La répartition tissulaire diffère légèrement chez le foetus : le muscle squelettique est riche en CKMB et le coeur contient majoritairement de la CKMM.

La présence de macroCK, complexe enzymatique circulant de haut poids moléculaire, interfère dans le dosage des activités enzymatiques CK totale et CK MB. Seule l'électrophorèse permet de mettre en évidence ces formes atypiques, résultant de la liaison d'une isoenzyme à une immunoglobuline (macroCK de type 1) soit d'une autoaggrégation de CK mitochondriale (macroCK de type 2).

Notre travail consiste en une étude rétrospective monocentrique menée sur une période 4 ans (2008-2011), portant sur la mesure de l'activité CK totale et sur l'analyse des profils électrophorétiques des isoenzymes CK réalisés sur du sang foetal prélevé en intracardiaque au moment de l'interruption médicale de grossesse chez des foetus atteints de pathologies d'une gravité particulière. La cohorte comporte 116 foetus de sexe ratio égal à 1 et d'âge gestationnel variant de 18,5 à 39 SA. L'objectif de notre travail est double : 1) évaluer l'intérêt du dosage de l'activité CK totale et des isoenzymes comme marqueurs de souffrance tissulaire 2) rechercher l'existence de macroCK chez des foetus et évaluer un lien avec une pathologie foetale spécifique. L'analyse rétrospective nous a permis de définir 4 types de profils électrophorétiques chez le foetus : a) hémolysé (n=12), b) ininterprétable (n=18), c) sans macroCK (n=64), d) avec macroCK de type 1 (n=20).

Nos résultats ne mettent pas en évidence de différence significative dans les taux de CK totale et la répartition des isoenzymes selon le sexe, l'âge gestationnel, la notion de RCIU et entre les différents groupes de pathologies. La CKMB et la CKBB ne semblent pas être des marqueurs informatifs respectivement dans les malformations cardiaques et les malformations cérébrales chez le foetus.

L'originalité de notre travail réside surtout dans la mise en évidence de macroCK de type 1 chez un quart des foetus de notre cohorte, indépendamment du sexe foetal, de l'âge gestationnel, de l'activité CK totale et de la pathologie. Nous avançons l'hypothèse que la formation chez le foetus de tels complexes résulterait de la liaison d'une IgG d'origine maternelle et de l'enzyme CKBB circulante dans le sang foetal et ne témoignerait pas d'un état pathologique particulier du foetus.

MOTS CLES : créatine kinase, isoenzymes CK, macroCK, électrophorèse, sang foetal

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Brigitte DOUSSET	Biochimie et biologie moléculaire Hôpital Central CHU Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème 5

Thèmes
1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle

