CRP, haptoglobine, orosomucoïde: variations biologiques et valeurs de références, relation entre CRP et risque cardiovasculaire

Olivier Chenillot

▶ **To cite this version:**

Olivier Chenillot. CRP, haptoglobine, orosomucoïde: variations biologiques et valeurs de références, relation entre CRP et risque cardiovasculaire. Sciences pharmaceutiques. 2000. hal-01738859

HAL Id: hal-01738859
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738859

Submitted on 20 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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-theses-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

Mem Ph N 2000
Double 1

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2000

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le vendredi 4 février 2000

par Olivier Chenillot

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

CRP, Haptoglobine, Orosomucoïde : variations biologiques et valeurs de référence

Relation entre CRP et risque cardiovasculaire

Membres du Jury

Président : Pr G. Siest

Juges : Pr J-P. Nicolas, Dr J. Henny, Dr J. Steinmetz

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2000

SB 18969

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Soutenu devant le jury interrégional

le vendredi 4 février 2000

par Olivier Chenillot

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

CRP, Haptoglobine, Orosomucoïde : variations biologiques et valeurs de référence

Relation entre CRP et risque cardiovasculaire

Membres du Jury

Président : Pr G. Siest

Juges : Pr J-P. Nicolas, Dr J. Henny, Dr J. Steinmetz

BU PHARM. ODONTOL.
D 104 047835 9

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON
Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales (50%)

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

« 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 ».

SERMENT D'APOTHICAIRE

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.

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Gérard Siest,

Professeur de Biochimie Pharmacologique, faculté des Sciences Pharmaceutiques, UHP-Nancy I,
Directeur de recherche au laboratoire du Centre de Médecine Préventive et au Centre du Médicament

Nous sommes sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence du jury de cette thèse
Recevez le témoignage de notre profonde et respectueuse gratitude.

A notre juge

Monsieur le Professeur J-P Nicolas,

Professeur de Biochimie,
Chef de service du laboratoire de Biochimie A de l'hôpital de Brabois et du laboratoire de biochimie médicale et pédiatrique de la faculté de Médecine, UHP-Nancy I

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.
Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

A notre juge et directeur de thèse

Monsieur le Docteur J. Henny,

Directeur du laboratoire du Centre de Médecine Préventive

Vous nous avez orienté vers un sujet de thèse captivant et avez su, par votre disponibilité et vos bons conseils nous aider tout au long de ce travail.
Pour tout ceci, veuillez recevoir tous nos remerciements et l'expression de notre profonde gratitude.

A notre juge

Madame le Docteur J. Steinmetz,

Pharmacien Biologiste, Centre de Médecine Préventive

Nous avons pu apprécier vos grandes qualités humaines et vos conseils judicieux.
Nous vous remercions de nous avoir fait confiance et d'avoir accepté de nous suivre tout au long de l'élaboration de ce trravail.
Recevez le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Bernard Herbeth,

Pour sa précieuse aide et son dévouement durant ce travail

A tout le personnel du Centre de Médecine Préventive,

Pour sa précieuse collaboration et sa gentillesse

A Christelle, ma future Epouse et à ma fille Constance

A mes parents

Pour votre patience, vos encouragements
Pour tout ce que vous m'avez enseigné et m'enseignerez encore,
Pour m'avoir permis d'être ce que je suis

A toute ma famille

Plan

Abréviations 5

I. Introduction 6

II. Rappels et Situation du sujet 9

II.1. La réaction inflammatoire et les protéines de l'inflammation 10

II.2. CRP 13
- II.2.1. Historique
- II.2.2. Caractéristiques et cinétique
- II.2.3. Méthodes de dosage
- II.2.4. Sensibilité et Spécificité vis à vis de la réaction inflammatoire

II.3. Orosomucoïde 16
- II.3.1. Caractéristiques et cinétique
- II.3.2. Fonctions
- II.3.3. Méthodes de dosage

II.4. Haptoglobine 17
- II.4.1. Caractéristiques et cinétique
- II.4.2. Fonctions
- II.4.3. Méthodes de dosage

II.5. Profil protéique inflammatoire 18
- II.5.1. Définition
- II.5.2. Indications

II.6. Concept de valeurs de référence 21

II.7. CRP-Risque cardiovasculaire et indice de risque cardiovasculaire 23
- II.7.1. CRP et risque cardiovasculaire
- II.7.2. Modèles multifactoriels de prédiction de risque cardiovasculaire

III. Matériels et méthodes 27

III.1. Population d'étude 27
III.1.1. Présentation
III.1.2. Données recueillies
III.1.3. Questionnaires

III.2. Recueil des échantillons 29
III.2.1. Prélèvement et conservation des échantillons
III.2.2. Echantillons destinés au dosage de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde

III.3. Réalisation des dosages sur le BN II (Dade Behring) 30
III.3.1. Principe général de la méthode de dosage
III.3.2. Principe du dosage des 3 protéines de l'inflammation sur le BN II
III.3.2.1. CRP
III.3.2.2. Haptoglobine et orosomucoïde

III.4. Modèle de prédiction multifactoriel 33

III.5. Analyses statistiques 35

IV. Résultats 37

IV.1. Description de la population 37

IV.2. Description des paramètres physiologiques, biologiques et des habitudes comportementales 38

IV.3. Dosage de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde 42
IV.3.1. Validation des techniques de dosage
IV.3.1.1. Essai de répétabilité
IV.3.1.2. Essai de reproductibilité
IV.3.1.3. Sensibilité des techniques de dosage
IV.3.1.4. Exactitude des résultats
IV.3.1.5. Essai de linéarité
IV.3.2. Distribution du nombre d'individus en fonction de la concentration des 3 protéines
IV.3.3. Evolution de la concentration des 3 protéines en fonction de l'âge et du sexe
IV.3.3.1. Selon 3 classes d'âge
IV.3.3.2. Valeurs fréquentes des 3 protéines de l'ensemble de la population en fonction de l'âge et du sexe

IV.4. Analyse de régression multiple 57
IV.4.1. CRP
IV.4.2. Haptoglobine
IV.4.3. Orosomucoïde

IV.5. Critères de sélection de l'échantillon de référence 66

IV.6. Valeurs de référence 69
IV.6.1. Valeurs de référence de la CRP
IV.6.2. Valeurs de référence de l'haptoglobine
IV.6.3. Valeurs de référence de l'orosomucoïde

IV.7. Intervalles de référence 75

IV.8. Facteurs de variation de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde 76
IV.8.1. CRP
IV.8.2. Haptoglobine
IV.8.3. Orosomucoïde

IV.9. Synthèse des variations analytiques et biologiques des 3 protéines 80
IV.9.1. CRP
IV.9.2. Haptoglobine
IV.9.3. Orosomucoïde

IV.10. CRP et indice de risque cardiovasculaire 92
IV.10.1. Risque de morbidité coronarienne
IV.10.2. Comparaison de la concentration en CRP entre population à haut risque et population à risque modéré

V. Discussion 95

V.1. Validation de la technique de dosage 95

V.2. Critères de choix des paramètres étudiés sur la population 97

V.3. Validité des résultats des dosages de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde 99
V.3.1. CRP
V.3.2. Haptoglobine
V.3.3. Orosomucoïde

V.4. Analyse de régression multiple 101

V.5. Sélection de la population de référence 103

V.6. Valeurs de référence 104

V.7. CRP et risque cardiovasculaire 107

VI. Conclusion 111

VII. Références bibliographiques 112

VIII. Annexe 125

Publication en cours

Liste des abréviations

ALAT : Alanine Aminotransférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BCR : Community of Bureau Reference

BMI : Body Mass Index

BN II : Behring Néphélomètre II

CMP : Centre de Médecine Préventive

CRM : Certified Reference Material

CRP : Protéine C-Réactive

ELISA : Enzyme Like ImmunoSorbent Assay

GGT : Gamma-glutamyl transférase

HDL : High Density Lipoprotein

HTA : Hypertension Artérielle

HVG : Hypertrophie Ventriculaire Gauche

IFCC : International Federation of Clinical Chemistry

IL : Interleukine

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

MRFIT : Multiple Risk Factor Intervention Trial

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Pression Artérielle Systolique

PROCAM : Prospective Cardiovascular Munster Study

RCV : Risque Cardio-Vasculaire

STANISLAS : Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux

TNF : Tumor Necrosis Factor

VS : Vitesse de sédimentation

Introduction

Depuis sa création, le laboratoire du Centre de Médecine Préventive (CMP) de Vandoeuvre-les-Nancy (CMP) développe parallèlement à la réalisation d'examens périodiques de santé, des activités de recherche notamment dans le domaine des valeurs de référence. Ces valeurs de référence sont à la base de toute interprétation en biologie clinique. Le CMP, grâce à ses nombreux consultants, possède une formidable puissance de production des valeurs de référence.

Ainsi, a débuté, il y a déjà 5 ans, une grande étude sur le Suivi Temporaire Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux : la Cohorte STANISLAS (*1*) dont le but principal est de suivre les interactions gène-environnement au cours de la croissance, du développement et du vieillissement dans le domaine des maladies cardiovasculaires.

A partir de cette cohorte constituée d'individus à priori en bonne santé , il nous est apparu intéressant de décrire les valeurs de référence et les variations biologiques de 3 protéines de l'inflammation : à savoir la Protéine C-Réactive (CRP), l'haptoglobine et l'orosomucoïde. Ces protéines sont connues et dosées depuis de nombreuses années et sont largement utilisées en biologie clinique, soit seules, soit associées dans le cadre du profil inflammatoire.
Les résultats des études préexistantes (*2,3,4,5*) concernant la détermination des valeurs de référence de ces 3 protéines souffrent soit d'effectif trop faible, de recrutement de qualité insuffisante ou de techniques de dosage peu sensibles. Ainsi, il sera possible de fournir au praticien une aide au diagnostic clinico-biologique plus précise et également de lui apporter des éléments supplémentaires de décision.
La CRP est par ailleurs un marqueur d'état inflammatoire qui paraît prédire un événement cardiovasculaire (*6,7,8,9,10,11*) ce qui donne un intérêt supplémentaire à la détermination de valeurs de référence précises.

Nous avons, dans un premier temps, recensé dans la littérature les principaux paramètres pré-analytiques, analytiques, biologiques ou physiologiques influençant la CRP, l'haptoglobine, et l'orosomucoïde.

Nous avons ensuite validé la technique de dosage des 3 protéines en réalisant des essais de répétabilité, de reproductibilité, de linéarité, de sensibilité et d'exactitude.

Puis, nous avons réalisé le dosage de la CRP, de l'haptoglobine, de l'orosomucoïde sur les individus de la cohorte STANISLAS.

A partir de toutes ces données, nous avons regroupé les principaux facteurs de variation de ces 3 protéines de l'inflammation.

Après une analyse de régression multiple, les facteurs de variation significatifs nous ont servi à sélectionner une sous-population sur laquelle les valeurs de référence ont été produites.

Enfin, à partir d'un modèle de prédiction multifactoriel, nous avons évalué la CRP en tant que marqueur prédictif de risque cardiovasculaire.

Rappels et Situation du sujet

II. Rappels et situation du sujet

II.1. La réaction inflammatoire et les protéines de l'inflammation

Douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction restent les marqueurs cliniques classiques de l'inflammation. Le phénomène inflammatoire résultent d'activation cellulaire multiple qui, en fin de compte, tendent à faciliter la phagocytose, la digestion de débris cellulaires ou la destruction de micro-organismes. Une phase de réparation de la matrice cellulaire, associée à une prolifération du tissu conjonctif, lui succède. Ces événements sont contrôlés localement par un réseau complexe d'interactions cellulaires et humorales dont parmi les intervenants principaux, l'interleukine 6 (IL-6) produite par les fibroblastes et les cellules endothéliales, l'interleukine 1 (IL-1) et le tumor necrosis factor (TNF), produits par les macrophages et/ou les neutrophiles, à l'origine d'un contrôle sophistiqué de la réponse inflammatoire (fig.1 et 2). Localement, celle-ci se marque par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire, par la diapédèse leucocytaire et la phagocytose. Des répercussions métaboliques systémiques renforcent ces différents mécanismes : la fièvre, qui active certaines réactions enzymatiques, la leucocytose avec son afflux de cellules phagocytaires et la stimulation de la production des protéines de la phase aiguë. Le foie est la source de production des protéines de la phase aiguë.

Les protéines de la phase aiguë, définies comme des protéines dont la concentration s'élève de plus de 25% lors de l'inflammation, ont été classées en trois groupes par Kushner (7) : un premier groupe comprend les protéines dont la concentration s'élève d'environ 50% (ex : céruloplasmine), un deuxième celles dont le taux s'élève de deux à quatre fois (ex : haptoglobine et orosomucoïde), et un troisième dont le taux s'élève jusqu'à mille fois dans certaines situations (ex : CRP).

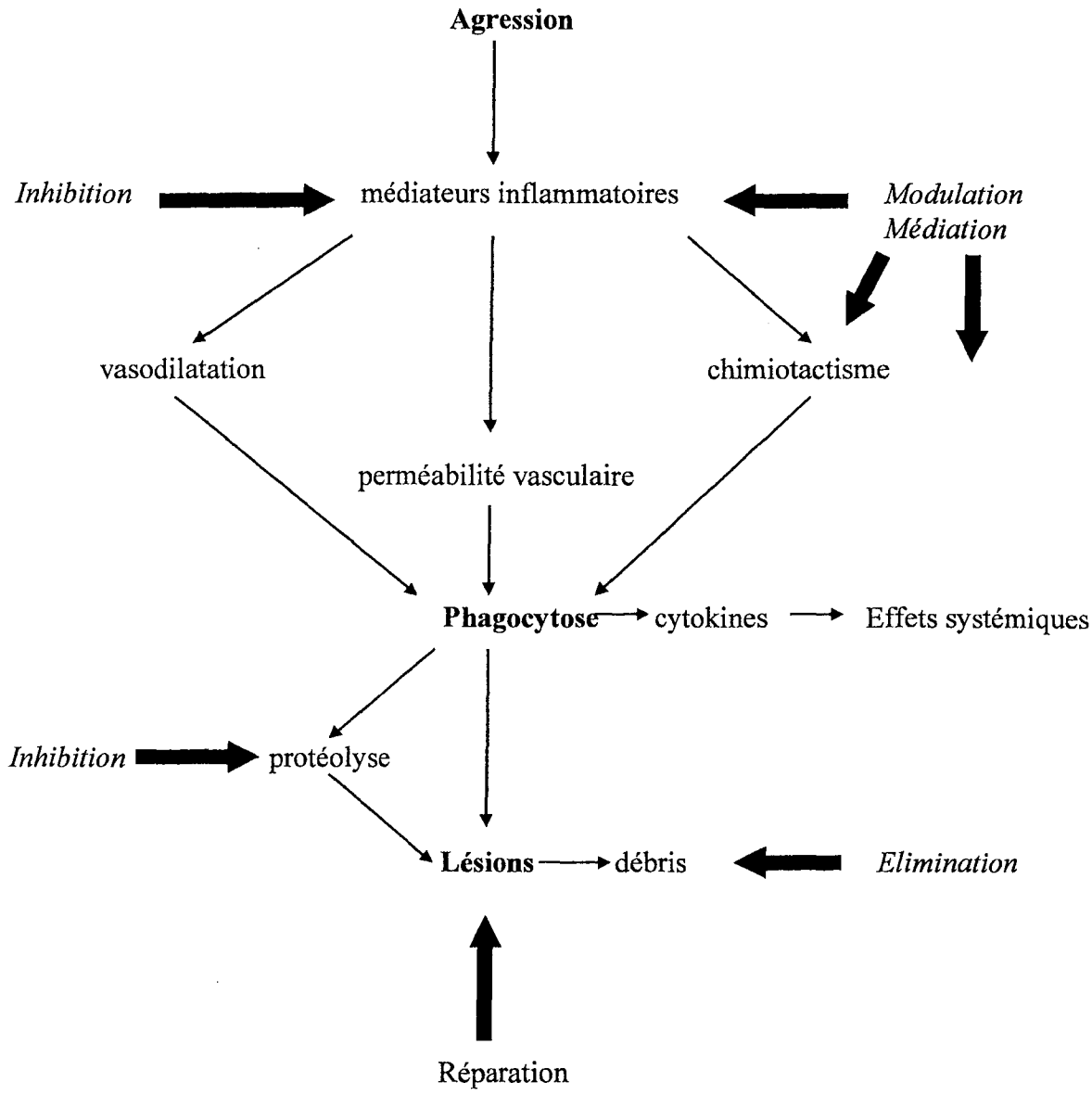

Fig.1 Régulation de l'inflammation : quelques points d'intervention des protéines de la phase aiguë (la fonction est indiquée en italique) (➡)

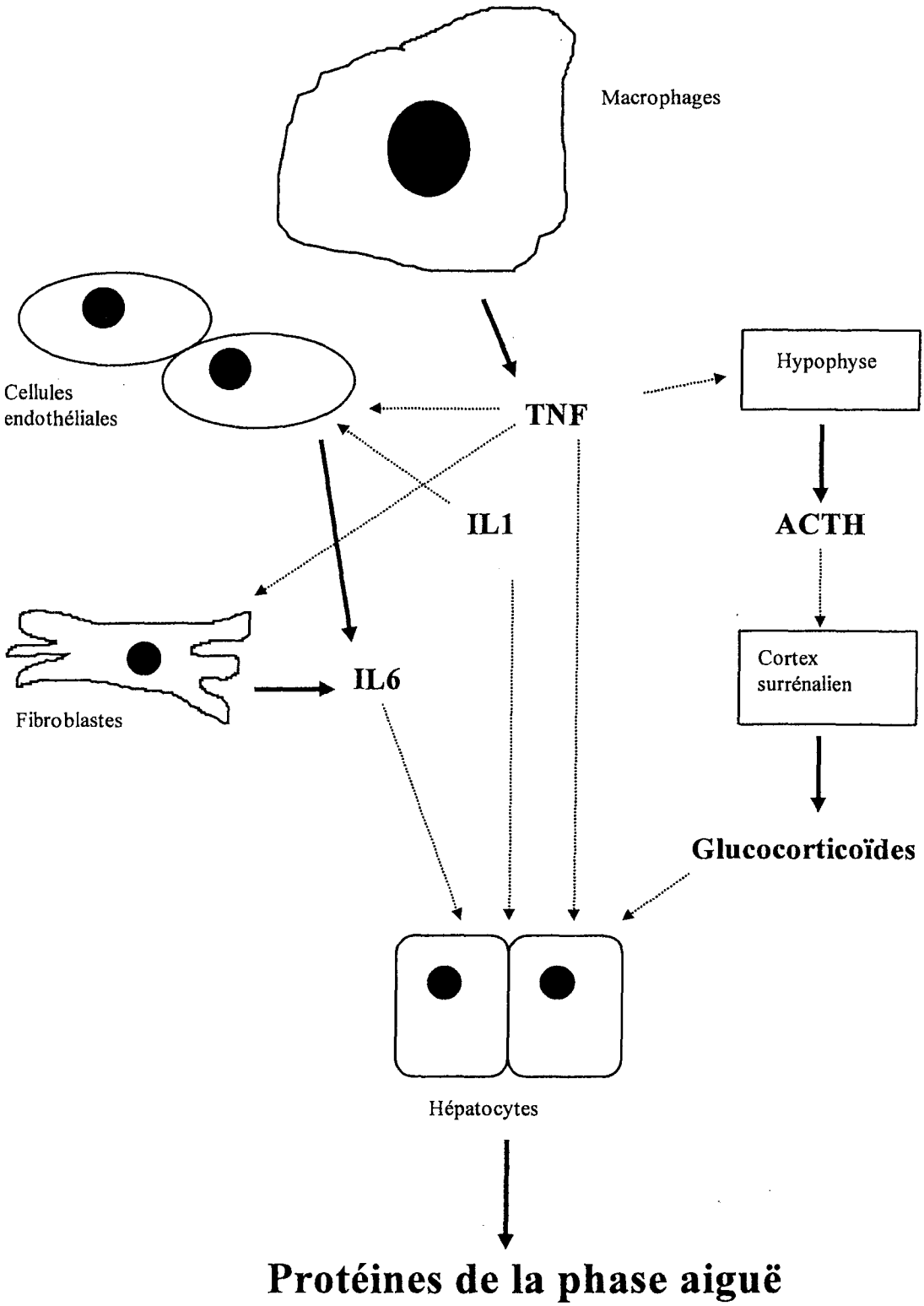

Fig.2 Contrôle de la réponse inflammatoire et induction de la synthèse des protéines de la phase aiguë

II.2. CRP

II.2.1. Historique

La protéine C-réactive, plus couramment appelée CRP a été détectée en 1930 par Tillet et Francis (*12*) dans le sérum de patients atteints d'infections à pneumocoque, à streptocoque ou à staphylocoque. En effet, ces auteurs ont décrit une réaction biochimique précise : en présence d'ions calcium, le polyoside C pariétal du pneumocoque est précipité par une protéine non identifiée du plasma. Celui-ci a reçu de ce fait, le nom de protéine C-réactive. La CRP a été purifiée en 1941 par Mac Leod et Avery (*13*), qui ont développé un anticorps de lapin anti-CRP.
La séquence complète en amino-acides de la CRP a été établie par Oliveira et collaborateurs (*14*) en 1977 et n'a aucune homologie avec les immunoglobulines.

II.2.2. Caractéristiques et cinétique

LA CRP est une holoprotéine pentamérique de 120 kDa. Elle ne traverse pas la barrière foeto-placentaire. Elle est synthétisée par les hépatocytes à un stade précoce (dès la 6 ième heure) de la réaction inflammatoire, en réponse à la stimulation de médiateurs sécrétés par les phagocytes tissulaires : le TNF α (Tumor Necrosis Factor) et les interleukines IL 1 et IL 6.

A l'état de traces dans le sang de sujets sains, elle atteint sa concentration maximale en 24 à 48 heures. La CRP se définit donc comme étant une protéine de l'inflammation.
Son taux peut être multiplié par 100 (voire 1000) dans les processus inflammatoires aigus. De plus grâce à sa demi-vie très courte, la CRP diminue rapidement dès que l'affection a disparu, pour retrouver son taux de base en 10 jours environ.
En comparaison, la vitesse de sédimentation (VS), autre marqueur de l'inflammation utilisé en routine, s'élève plus tardivement et peut nécessiter plusieurs semaines pour se normaliser (3 à 6 semaines). Au cours de l'inflammation, processus non spécifique de défense, la CRP permet une bonne cicatrisation tissulaire en assurant une clairance sensiblement accrue des débris cellulaires ou de divers corps étrangers. De plus, la CRP a un rôle opsonisant en se fixant sur la paroi des bactéries pour faciliter leur phagocytose en complétant l'action non spécifique de

certaines fractions du complément, et l'action spécifique des immunoglobulines. Enfin, elle a un rôle immunomodulateur vis à vis des lymphocytes T.

II.2.3. Méthodes de dosages

Le dosage de la CRP peut être réalisé par différentes techniques :

- agglutination latex
- radio-immunologie
- immunoturbidimétrie
- immunonéphélémétrie
- cinétique néphélométrique

Les 3 dernières techniques sont actuellement les plus couramment utilisées.

II.2.4. Sensibilité et spécificité vis à vis de la réaction inflammatoire

De nombreuses études comparatives ont montré une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité de la CRP par rapport à la VS.

La CRP s'élève dans les affections inflammatoires, quelles que soient leur étiologie (Tableau 1).

Tableau 1. Principales pathologies associées à une augmentation de la CRP

Pathologies	CRP élevée	CRP peu ou pas élevée
Rhumatologiques	Polyarthrite rhumatoïde	Lupus érythémateux disséminé
	Maladie de Horton	Dermatomyosite
	Spondylarthrite ankylosante	Sclérodermie
	Maladie de Behcet	Syndrome de Gougerot-Sjögren
	Vascularites	
Digestives	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
	Appendicite aiguë	
	Péritonite aiguë	
	Pancréatite aiguë	
Néoplasiques	Lymphome malin	Leucémie
	Certaines tumeurs solides	
Ischémiques	Infarctus du myocarde	Insuffisance coronarienne
Traumatiques	Traumatisme crânien avec fracture	Traumatisme crânien non
	Brûlures	compliqué
	Chirurgie	
Infectieuses	Infections bactériennes :	Infections virales
	pneumonie, méningite,	Infections urogénitales basses
	infections urogénitales hautes,	Prostatite chronique....
	prostatite aiguë, septicémie	

Mais, phénomène important, la CRP n'est peu ou pas modifiée dans le lupus érythémateux disséminé (LED), la rectocolite hémorragique, la leucémie, l'insuffisance coronarienne et les traumatismes crâniens non compliqués. La VS qui augmente aussi dans le même type d'affection, semble moins sensible que la CRP. En effet, dans 30 à 50% des maladies inflammatoires, la VS reste pratiquement normale. Une étude réalisée sur des patients hospitalisés pour pneumonie bactérienne, a retrouvé une élévation de la CRP alors que la VS n'était pas systématiquement augmentée (*15*). D'autre part, des anomalies globulaires telles

que les polyglobulies ou les hémoglobinopathies peuvent contrarier l'élévation de la VS. Ainsi, une VS peu ou pas élevée, ne permet pas d'exclure une pathologie organique évolutive. Une augmentation de la CRP indique la présence d'une affection inflammatoire. Il n'existe pas de faux positif car il n'y a pas de déficience congénitale ou acquise de la CRP. En revanche, une élévation de la VS peut se rencontrer en l'absence de tout syndrome inflammatoire, lors de dysglobulinémies par exemple. Ainsi la VS par son manque de spécificité, doit toujours être interprétée en fonction des données cliniques et de l'anamnèse (*16*).

II.3. Orosomucoïde

II.3.1. Caractéristiques et cinétique

L'orosomucoïde ou α1 glycoprotéine acide est une glycoprotéine de masse relative 44 Kda environ, synthétisée par le foie, qui migre électrophorétiquement dans la région des α1-globulines.

L'orosomucoïde fait partie du groupe des glycoprotéines acido-solubles appelées séromucoïdes. Sa demi-vie est de 3 jours. Elle est catabolisée pour 30% dans le tube rénal et dans les macrophages mononuclés.

II.3.2. Fonctions (tableau 2)

Les rôles physiologiques de l'orosomucoïde sont nombreux : stimulation de la croissance des fibroblastes, rôle de protéine de transport (héparines, hormones stéroïdiennes), inhibition de l'agrégation plaquettaire, modération de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

II.3.3. Méthodes de dosage

Le dosage peut être réalisé par immunoturbidimétrie ou immunonéphélémétrie.

II.4. Haptoglobine

II.4.1. Caractéristiques et cinétique

L'haptoglobine est une glycoprotéine sérique migrant électrophorétiquement dans la zone des α2 globulines. Elle a été identifiée pour la première fois en 1938 par MF Jayle et M Polonovski. Elle est synthétisée par les hépatocytes.

Sa structure comprend des chaînes lourdes, communes à toutes les molécules, et des chaînes légères dont il existe 2 types. Elle présente un polymorphisme génétiquement contrôlé.

La précipitation de l'haptoglobine montre à l'électrophorèse une seule bande légère homogène, mais en électrophorèse sur gel d'amidon, il apparaît plusieurs bandes de précipitation définissant ainsi des groupes sériques (Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2) dont les variations portent sur le nombre et le type de chaînes.

La masse relative est variable selon le phénotype de la molécule : Hp 1-1 (85 kDa), Hp 2-1 (120 kDa), Hp 2-2 (170 kDa).

La demi-vie de la molécule est de 3 à 5 jours.

II.4.2. Fonctions (Tableau 2)

L'haptoglobine participe à la neutralisation de l'hémolyse intra-vasculaire physiologique (qui concerne les 2/3 du catabolisme de l'hémoglobine) en constituant un complexe haptoglobine-hémoglobine. Le complexe ainsi formé disparaît rapidement de la circulation. (les complexes ont une demi-vie inférieure à 20 min.)

Son catabolisme par le système réticulo-endothélial permet la récupération du fer de l'hémoglobine.

L'haptoglobine possède de plus un léger effet bactériostatique.

II.4.3. Méthodes de dosage

L'haptoglobine peut-être dosée en mesurant l'activité peroxydasique du complexe formé avec l'hémoglobine ou par des méthodes immunologiques (immunoturbidimétrie, immunonéphélémétrie).

Tableau 2. Structure et fonction de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde

	CRP	Haptoglobine	Orosomucoïde
Masse moléculaire (kDa)	120	44	86
Ph isoélectrique	5,5	2,7	4,2
Pourcentage de glucides	0	40	19
Migration électrophorétique	gamma	alpha-1	alpha-2
Demi-vie	12 heures	3 jours	3 à 5 jours
Lieu de synthèse	foie	foie	foie
Propriétés	Activation du complément, des lymphocytes T4 et des phagocytes, Opsonisation	Stimulation de la prolifération des fibroblastes, inhibition de la prolifération lymphocytaire	Complexe avec l'hémoglobine

II.5. Profil protéique inflammatoire

Au cours de ces dix dernières années, la réalisation du profil ciblé inflammatoire a connu un développement considérable. Cet essor est lié à plusieurs événements :

- les maladies ou syndromes inflammatoires sont très fréquents en clinique humaine
- l'augmentation des protéines appartenant au profil inflammatoire est une caractéristique majeure et objective de l'apparition d'un processus inflammatoire.
- des méthodes immunochimiques rapides, précises, adaptables sur de nombreux appareillages (spécialisés ou non) permettant le dosage en routine ou en urgence de ces protéines et ceci 24 heures sur 24.

II.5.1. Définition du profil ciblé inflammatoire

Plus de 30 protéines subissent une élévation de leur concentration circulante au cours d'un syndrome inflammatoire.

Pour des raisons pratiques et économiques, il convient de faire un choix parmi ces molécules afin de sélectionner le marqueur le plus fiable.

La protéine de l'inflammation idéale devrait remplir 5 critères qui avaient été définis par la commission protéine de la SFBC :

- dépendance exclusive du processus inflammatoire
- indépendance de l'étiologie du syndrome inflammatoire
- cinétique rapide d'évolution
- augmentation significative
- détermination précise et rapide

II.5.2. Indications du profil inflammatoire

- Détection des maladies organiques
  - infections post-chirurgicales

Du fait de sa cinétique rapide de variation, la CRP constitue la protéine de la phase aigüe la plus fiable pour suivre les patients en phase post-chirurgicale et pour diagnostiquer les complications infectieuses.

  - infections parasitaires

- Détermination de l'étendue d'une atteinte tissulaire et de la gravité d'une maladie
  - infarctus du myocarde
  - cancer
  - rhumatologie

La CRP est le plus précis et le plus objectif des examens de laboratoire permettant de préciser l'activité de la maladie , des concentrations supérieures à 50 mg/l sont fréquentes dans les polyarthrites rhumatoïdes sévères.

♦ Suivi thérapeutiques au cours des maladies inflammatoires ou infectieuses

- maladies inflammatoires
- suivi d'une antibiothérapie

C'est incontestablement dans le suivi précis d'une antibiothérapie au cours des infections bactériennes que reposent les indications majeures du dosage des protéines de la phase aiguë.

♦ Détection des maladies intercurrentes

Dans les maladies qui ne s'accompagnent pas habituellement d'une élévation des protéines de l'inflammation, une élévation soudaine et importante des valeurs de la CRP est très évocatrice d'une infection bactérienne intercurrente.

- lupus
- leucémie aiguë

♦ Diagnostic différentiel

Des différences quantitatives de la réponse en CRP au cours de certaines pathologies qui peuvent se présenter sous des tableaux cliniques semblables ont conduit quelques auteurs à proposer la CRP comme un outil pour les distinguer.

Tableaux 3. Maladies associées à une forte augmentation des protéines de la phase aiguë

Traumatisme	Chirurgie, Brûlures
Maladies inflammatoires	Arthrite rhumatoïde
	Arthrite juvénile chronique
	Spondylarthrite ankylosante
	Rhumatismes polymyalgiques
	Syndrome de Behcet
	Syndrome de Reiter
	Vascularite systémique
	Maladie de Crohn
Néoplasie	Lymphome, Hodgkin
	Carcinome, Sarcome
Nécrose ischémique	Infarctus du myocarde

II.6. Concept de valeurs de références

La variabilité des résultats des examens de laboratoire est un phénomène bien connu chez l'homme sain ou malade. Un examen de laboratoire au cours de la vie d'un individu peut avoir plusieurs valeurs correspondant à des états de santé ou à des pathologies variées. Le champ d'application de la biologie s'est élargi peu à peu à la prévention et en plus du dépistage précoce de pathologies existantes, il devient nécessaire de mettre en évidence des petites variations permettant de pronostiquer la probabilité d'altération de tel ou tel système fonctionnel chez les individus.(*17*)

Les sources de variations chez le sujet sain sont nombreuses mais une pratique couramment admise identifie 2 grands groupes de variations : la variation analytique et la variation biologique.(figure 3)

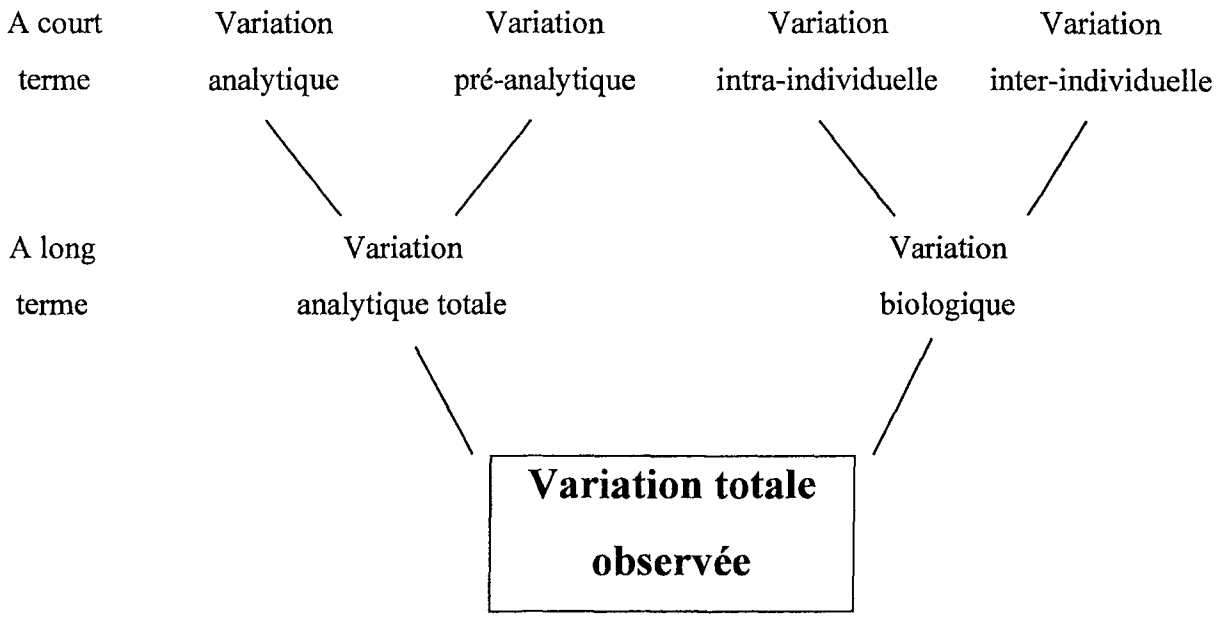

Figure 3. Variations analytiques et biologiques

Les variations physiologiques sont habituellement d'amplitude plus faible que les variations pathologiques. C'est dans la zone intermédiaire entre les valeurs physiologiques et les valeurs pathologiques que l'interprétation est souvent la plus difficile. La décision de classer des sujets dans l'une ou l'autre catégorie à des conséquences importantes : médicales et économiques. Dans cette zone intermédiaire, les variations physiologiques augmentent le bruit de fond et provoquent en général une multiplication du nombre des examens de laboratoire. Il est donc nécessaire de préciser les limites des populations saines.

La démarche habituellement admise pour produire des valeurs de référence est la suivante (*18*) :

- établir la liste des variations biologiques
- décider les facteurs d'exclusion à prendre en compte pour sélectionner un sous-ensemble de référence
- décider parmi les variations biologiques les facteurs de stratification pour avoir des groupes homogènes
- préparer les sujets pour la prise de sang
- traiter les spécimens biologiques
- effectuer les analyses dans des conditions bien définies.

Quelques définitions : (*75*)

- les valeurs de référence sont toutes les valeurs qui sont obtenues pour une variable biologique particulière sur les individus de l'échantillon de référence.
- l'échantillon de référence est un sous-ensemble formé d'un nombre adéquat d'individus issus de la population de référence ; il doit être représentatif de la population de référence.
- la population de référence comprend tous les individus qui ont été sélectionnés selon des critères bien définis

II.7. CRP-risque cardiovasculaire et indice de risque cardiovasculaire

II.7.1. CRP et risque cardiovasculaire

Depuis plusieurs années, une nouvelle application porte sur l'étude de la liaison entre la concentration plasmatique en CRP et le risque cardiovasculaire (*7,8,9,10,11*).

Dès 1978, Kushner (*7*) a montré, que la concentration en CRP est augmentée après un infarctus du myocarde Pour Liuzzo et coll (*9*), une concentration en CRP supérieure à 3 mg/L au moment de l'hospitalisation chez des patients admis pour infarctus du myocarde paraît être de moins bon pronostic qu'une concentration inférieure à 3 mg/L. C'est Kuller (*10*) dans la première grande étude prospective portant sur des individus sains mais à haut risque cardiovasculaire qui a montré qu'il existe un lien entre la concentration en CRP et la mortalité par maladies coronariennes.

L'élévation de la CRP apparaît également être un facteur de risque d'infarctus du myocarde et d'AVC (Accident vasculaire Cérébrale) chez les hommes d'âge moyen et l'aspirine diminue ce risque (*19*). Dans cette étude, la CRP a été dosée dans une population d'hommes qui participaient à l'étude contrôlée de la prévention primaire des maladies cardiovasculaires ou des cancers par l'aspirine et/ou par le béta-carotène ou par un placebo. La concentration en CRP des hommes ayant eu un infarctus du myocarde, un AVC ou une phlébite pendant la période de surveillance d'au moins huit ans a été comparée à celle de sujets contrôles sans pathologie vasculaire artérielle.

La CRP était plus élevée chez les patients ayant eu un infarctus que chez les sujets contrôles et également plus élevée chez ceux ayant eu un AVC. Le risque d'infarctus augmente avec l'élévation de la CRP, les sujets ayant les taux les plus élevés avaient un risque multiplié par 3 par comparaison avec ceux ayant le taux le plus bas. Cette risque était de 2 pour les AVC. Il n'existait pas de différence entre les patients ayant eu une phlébite et les sujets contrôles.

La CRP apparaît d'après ces études être un marqueur prédictif du risque cardiovasculaire au même titre que les paramètres classiques plus connus. Ces derniers peuvent être regroupés dans des modèles de prédiction de risque cardiovasculaire.

II.7.2. Modèles multifactoriels de prédiction de risque cardiovasculaire

Les maladies cardiovasculaires demeurent les principales causes de mortalité chez les adultes dans la plupart des pays industrialisés. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires sont dans leur ensemble bien connus et peuvent être séparés en facteur d'origine génétique et facteurs environnementaux ou comportementaux ou acquis. La limite entre les deux est quelque fois difficile à distinguer tant les facteurs sont intriqués.

Il est maintenant bien connu, grâce aux études épidémiologiques prospectives comme l'étude de Framingham (*20*), l'étude de PROCAM (*21,22*) (Prospective Cardiovascular Munster Study), MRFIT (*23*) (Multiple Risk Factor Intervention Trial) que les principaux facteurs de risques cardiovasculaires sont l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle, le tabagisme et que leurs interactions quand ils sont associés, aggravent le risque dans des proportions considérables.

Sachant que l'origine des maladies cardiovasculaires est multiple, estimer un risque de développer cette pathologie à partir d'un seul paramètre biologique peut paraître utopique. Aussi, est-il préférable de prendre en compte un risque global. C'est pourquoi depuis l'étude de Framingham, différents modèles de prédiction multifactorielle ont été développés afin d'évaluer un risque cardiovasculaire. Grâce à cette étude, il a été possible pour la première fois de mettre en équation un certain nombre de paramètres pour établir un indice de risque coronarien.
En Allemagne, l'étude PROCAM (*21,22*) a mis en équation différents facteurs de risque. En France, l'Etude Prospective Parisienne (*24*) a mis au point une équation permettant de déterminer un indice de risque. Laurier (*25,26*), en France, a quant à lui utilisé le modèle d'Anderson (*27,28*) tiré de l'étude de Framingham en l'adaptant à une population française.

Le consensus européen sur la prévention de la maladie coronarienne en pratique clinique, élaboré par le groupe de travail des sociétés européennes de cardiologie, d'hypertension artérielle et d'athérosclérose recommande également d'utiliser ces modèles dans le cadre d'une stratégie de prévention. Il précise même que si le risque d'un accident coronaire à 10

ans est supérieur à 20% ou le devient dans une projection à l'âge de 60 ans, une stratégie d'intervention est recommandée dans la prise en charge des facteurs de risque. Il est conseillé intervenir par des mesures hygiéno-diététiques lorsque le risque est inférieur à 20%, et au dessus il faut recourir à des thérapeutiques médicamenteuses.

Matériels et Méthodes

III. Matériels et Méthodes

III.1. Population d'étude

III.1.1. Présentation

La population étudiée correspond à un échantillon des consultants du Centre de Médecine Préventive issu de la cohorte STANISLAS (Suivi Temporaire Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés Sociaux).

La cohorte STANISLAS est une étude longitudinale sur 1006 familles dont le premier recrutement a eu lieu entre Janvier 1994 et Août 1995. (*1*) Ces familles doivent être revues tous les 5 ans pendant une période de 10 ans.

Cette étude comporte 3 grandes étapes :

- l'observation des modes de vie et des comportements individuels et familiaux au point de départ : loisirs, alimentation, activité physique, prise de médicaments
- l'étude de la ressemblance familiale d'un grand nombre de facteurs de risque cardiovasculaire : lipides et apolipoprotéines, pression artérielle, obésité, statut vitaminique, et l'évaluation de la part de la génétique et de l'environnement dans cette ressemblance,
- la description de ces indicateurs de risque au cours du temps et selon l'âge, et l'analyse des effets sur cette évolution des interactions entre génétique, environnement et comportement.

Les principaux indicateurs de risque sont :

- les lipides (cholestérol, triglycérides, HDL-cholestérol, Lp(a)) et les apolipoprotéines: taux plasmatiques et génotypes,
- le stress oxydatif et les systèmes de protection, en particulier les vitamines anti-oxydantes,
- la surcharge pondérale,
- la pression artérielle,

- la géométrie cardiaque.

Les critères d'inclusion sont :

- la composition de la famille : 2 parents et au moins 2 enfants âgés de plus de 6 ans,
- le fait que les parents soient les parents biologiques

Les critères d'exclusion sont :

- l'origine non-européenne (d'un des parents, des grands-parents),
- la présence d'une maladie aigüe et/ou chronique (cancer, cardiopathie ischémique, tuberculose, ...) déclarée par le patient.

L'adhésion a été librement consentie et attestée par un formulaire individuel donnant toute liberté de renonciation et garantissant la confidentialité des informations.

III.1.2. Données recueillies

Les données recueillies auprès de chacun des membres des familles sont de caractères biologiques, physiologiques ou concernant le comportement et l'environnement.

- Variables biologiques : leucocytes, plaquettes, hémoglobine, cholestérol, triglycérides, glycémie, TGO, TGP, GGT, Apolipoprotéine AI , Apolipoprotéine B, Apolipoprotéine E
- Données cliniques
  - mesures morphologiques : mesure du poids
    de la taille
  - mesure de la pression artérielle

la mesure de la pression artérielle au bras gauche en position couchée, après 5 minutes de repos, répétée 3 fois est effectuée avec un tensiomètre à mercure. Les brassards de taille différente sont utilisés en fonction de la morphologie du sujet.

- réalisation d'un électrocardiogramme.

III.1.3. Questionnaires

- antécédents familiaux cardiovasculaires

L'histoire familiale a été centrée sur les antécédents familiaux cardiovasculaires : coronaropathie (angor, infarctus du myocarde, artériopathie des membres, accidents ischémiques cérébraux, mort subite), l'obésité, l'hyperlipémie, l'hypertension artérielle et le diabète.

- autres données :

Habitude de vie et santé :

- consommation d'alcool et de tabac,
- la prise de médicaments.

III.2. Recueil des échantillons

III.2.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur tubes vacutainers par ponction veineuse entre 8 et 9 heures ou entre 11h30 et 12h30 après une nuit de jeûne.

Les spécimens sont conditionnés en paillettes de 250 µL.
Puis, les échantillons sont conservés en azote liquide (-196°C).

III.2.2. Echantillons destinés au dosage de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde

La technique de dosage utilisé est une technique immunonéphélémétrque sur le BN II (Dade Behring)
Les dosages ont été réalisés par séries à partir de sérums fraîchement décongelés.

III.3. Réalisation des dosages sur le BN II

Le BN II (Dade Behring) se compose

- de l'analyseur
- du micro-ordinateur

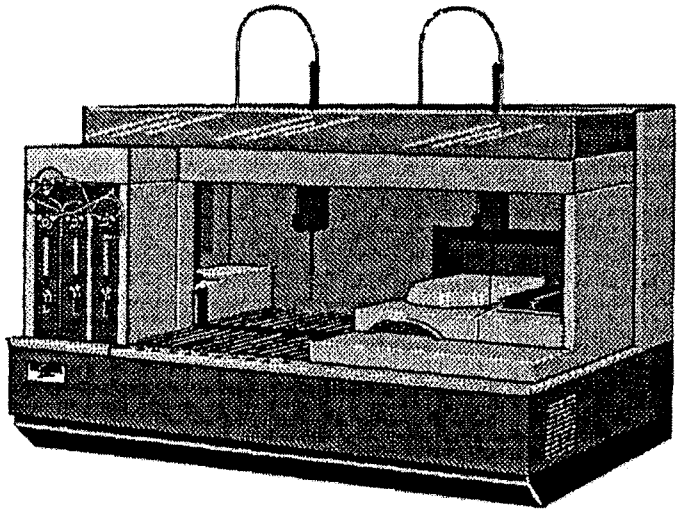

Figure 4. Le BN II (Dade Behring)

III.3.1. Principe général de la méthode de dosage

Le BN II analyse le taux de protéines dans les différents liquides du corps humain, par exemple, urine, LCR, sérum. L'analyse néphélémétrique est quantitative et entièrement automatique.

L'immunonéphélométrie consiste à mesurer à un certain angle par rapport à une lumière incidente, la lumière dispersée par des complexes immuns en suspension dans un milieu liquide

La lumière incidente est une diode laser qui émet une lumière de longueur d'onde égale à 840 nm. Le faisceau lumineux est pratiquement cohérent et traverse la cuvette.
- la lumière est dispersée par les particules dans la cuvette de mesure.
- cette dispersion est mesurée par un détecteur pour un angle compris entre 13 et 24°.
- le faisceau primaire est éliminée par filtrage.

La lumière dispersée détectée est transformée en un signal électrique qui est proportionnel à la concentration des particules dispersantes. Les signaux sont digitalisés, comparés avec les valeurs du dosage correspondant de la courbe de calibration et convertis en concentration de protéines.
Dans ce procédé, la lumière mesurée est celle dispersée par les complexes antigènes-anticorps. L'intensité de cette lumière dispersée est sous certaines conditions proportionnelle au total des complexes antigènes-anticorps dans l'échantillon.

Si un antigène contenu dans un échantillon et son antisérum associé sont mis dans une cuvette, les complexes antigènes-anticorps sont formés.
L'intensité de la lumière dispersée dépend de la relation entre la taille des particules des complexes antigènes-anticorps et la longueur d'onde émise.

- Si le diamètre de la particule est petit par rapport à la longueur d'onde de la lumière, une dispersion de la lumière de type Rayleigh se produit. La lumière est dispersée à peu près symétriquement de tout côtés.
- Si le diamètre des particules est grand par rapport à la longueur d'onde, une dispersion de type Mie se produit. Plus la taille de la particule est grande, plus la lumière est dispersée vers l'avant.

Dans notre procédé, les particules sont plus grandes que la longueur d'onde. Pour cette raison, une dispersion de type Mie a lieu.

La lumière dispersée par les complexes antigènes-anticorps est mesurée continuellement durant la réaction : mesure cinétique ou mesure en temps fixé (différence entre les signaux à deux instants fixés dans le temps).

III.3.2. Principe du dosage des 3 protéines de l'inflammation sur le BN II

Les volumes de sérum nécessaire au dosage sont de 40 µL pour la CRP, 40 µL pour l'haptoglobine et de 30 µL pour l'orosomucoïde.

III.3.2.1. CRP

Le réactif utilisé est le N Latex CRP mono de Dade Behring (code OQIY21).
Les particules de polystyrène recouvertes d'un anticorps monoclonal anti-CRP s'agglutinent en présence d'un échantillon contenant de la CRP. L'anticorps anti-CRP est un anticorps monoclonal de souris à la différence de l'ancien réactif qui était polyclonal : N Latex CRP
L'intensité de la lumière diffusée par le néphélomètre est fonction du taux de CRP de l'échantillon et est comparée avec l'intensité d'une gamme de calibration.

III.3.2.2. Haptoglobine et Orosomucoïde

Les réactifs utilisés sont le N Antisérum anti-haptoglobine humaine (code OSAV) et le N Antisérum anti-orosomucoïde humaine (code OSAW).

Les N antisérums sont des sérums liquides d'origine animale, obtenus par immunisation de lapins avec soit de l'haptoglobine humaine hautement purifiée soit de l'orosomucoïde humaine hautement purifiée.
L'intensité de la lumière diffusée par le néphélomètre est fonction du taux d'haptoglobine ou d'orosomucoïde contenue dans l'échantillon.

III.4. Modèle de prédiction multifactoriel

Le modèle de prédiction de maladie coronarienne utilisé est celui de Laurier. Il correspond au modèle de Framingham modifié par Anderson et adapté à une population française.

Le modèle d'Anderson est basé sur les résultats de la cohorte de Framingham et de sa descendance.

L'étude Framingham a débuté dans les années 50 dans la ville de Framingham (Etats-Unis) et a consisté à partir d'une très large cohorte d'individus à mesurer différents facteurs de risque cardiovasculaire et à recenser les événements cardiovasculaire survenus durant l'étude. A partir de ces données, différents modèles de prédiction de risque ont été développé. Puis une autre étude sur la descendance de la population de Framingham a été conduite dans les années 60-70, qui a permis entre autres, d'élargir les modèles de prédiction a une plus large tranche d'âge et d'inclure de nouveaux paramètres comme le HDL-cholestérol.

Le modèle de Laurier permet d'estimer le risque de morbidité coronarienne à partir de 7 facteurs : sexe, âge à l'entrée, ratio cholestérol/HDL-cholestérol, pression artérielle systolique, tabagisme (fumeur/non-fumeur), présence d'un diabète (oui/non), présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche (détectée à l'électrocardiogramme, oui/non).

Il a été appliqué chez les hommes et les femmes d'un âge supérieur ou égale à 40 ans pour une estimation du risque à 8 ans.

Equations permettant le calcul du risque à partir de la PAS :

$$a = \lambda - 0{,}9119 \times \log(PAS) - 0{,}2767 \times cigarettes - 0{,}7181 \times \log(cholestérol/HDL) - 0{,}5865 \times HVG$$

avec $\lambda = 11{,}1122$

(PAS : pression artérielle systolique en mmHg, cigarettes : nombre de cigarettes fumées par jour, diabète défini par Laurier : glycémie >8 mmol/L ou par la consommation d'anti-diabétiques, cholestérol et HDL-cholestérol en g/L, HVG : présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche, celle-ci est révélée à l'électrocardiogramme)

- Pour les hommes

$$m = a - 1{,}4792 \times \log(\text{âge}) - 0{,}1759 \times \text{Diabète}$$

- Pour les femmes

$$m = a - 5{,}8549 + 1{,}8515 \times (\log(\text{âge}/74)^2) - 0{,}3758 \times \text{Diabète}$$

- Puis pour les 2 sexes :

$$\mu = 4{,}4181 + m$$

$$\text{et } \sigma = e^{(-0{,}3155 - 0{,}2784 \times m)}$$

- Déterminer à combien d'années t, on veut estimer le risque (dans notre travail, les indices ont été calculés pour t = 8 ans)

$$u = \frac{\log(t) - \mu}{\sigma}$$

La probabilité de survenue d'une maladie coronarienne pour t=8 ans est :

$$\mathbf{p = 1 - \exp(-e^{u})}$$

A partir de la distribution des indices de risque des individus de 40 à 49 ans, nous avons utilisé la valeur correspondant au dernier quintile comme seuil pour séparer les individus à haut risque cardiovasculaire des individus à risque modéré. Il s'agit d'une méthode utilisé par Laurier *(25)* pour identifier des sujets à risque élevé de morbidité coronarienne dans une population française dite saine.

Nous avons ensuite comparé ensuite la concentration en CRP de la population à haut risque avec celle de la population à risque modéré.

III.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel BMDP® (Cork, Irlande).

Les valeurs de référence des 3 protéines ont été produites par des analyses de régression multiple pas à pas.

Dans un premier temps en raison de la distribution non gaussienne des 3 protéines, les valeurs de ces dernières ont été transformées en logarithme.

A partir des paramètres susceptibles de modifier la CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde, une régression multiple a été réalisée pour chaque protéine. Seuls les paramètres significatifs au seuil de $p<0,01$ et $p<0,001$ ont été retenus. Les paramètres biologiques ont été considérés comme des variables quantitatives, de même que l'âge (années), le tabac (nombre de cigarettes/j), BMI (Body Mass Index)(kg/m^2), la consommation d'alcool (g/j) alors que la consommation de médicaments est considérée comme une variable qualitative (oui/non).

Puis, nous avons exprimé en pourcentage les variations des 3 protéines en fonction des paramètres modifiant de façon significative leurs valeurs. Pour cette analyse, les valeurs des protéines n'ont pas été transformées en logarithme et les paramètres ont tous été considérés comme des variables qualitatives.

Résultats

IV. Résultats :

IV.1. Description de la population

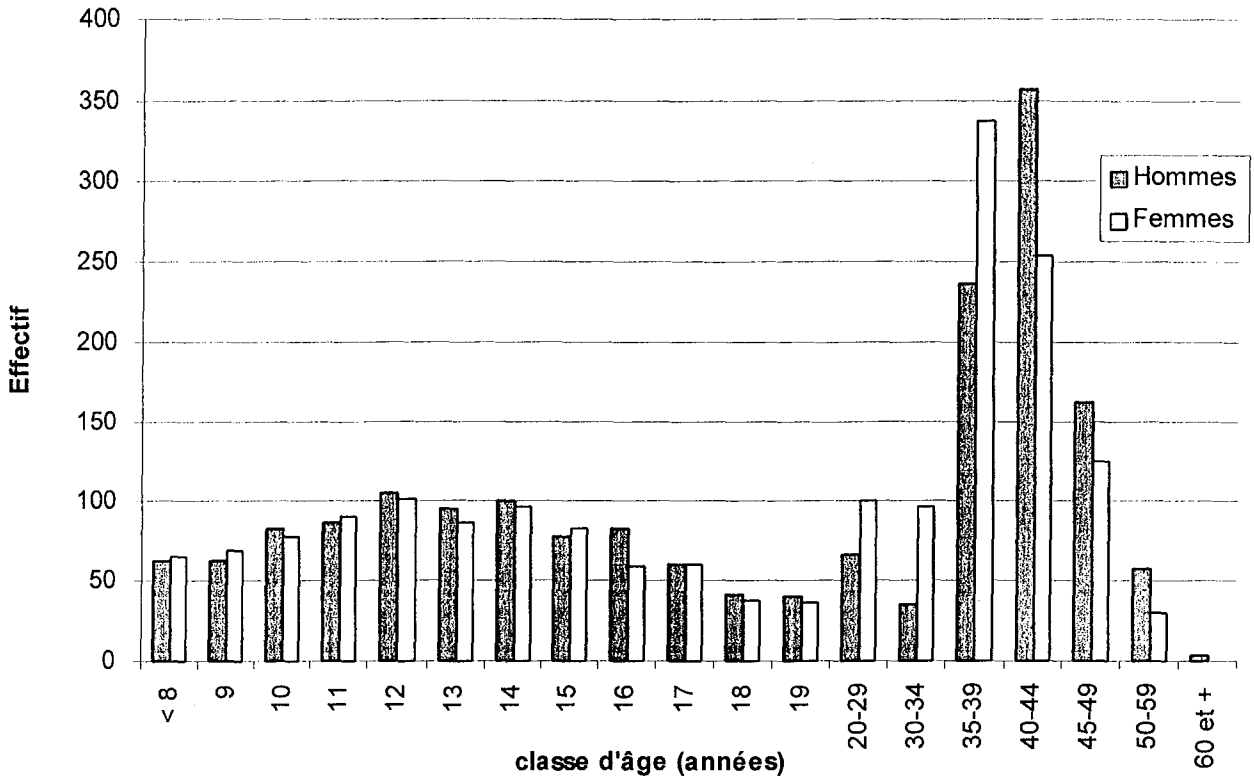

Figure 5. Répartition des individus selon leur âge

La population de notre étude comporte 3605 personnes : 1805 hommes (50,06%) et 1800 femmes (49,94%). 50,03% des individus ont moins de 18 ans.

La figure 4 nous montre la répartition des hommes et des femmes de la cohorte. Ce sont les classes d'âge des 35-39, 40-44 et 45-49 ans qui comportent le plus d'individus. Par contre, c'est dans les classes extrêmes des 60-75 ans et des 18 et 19 ans que l'on rencontre le moins d'individus.

Tableau 4. Répartition des individus de notre population selon le sexe et l'âge.

	5-14 ans	15-28 ans	29-75 ans	Total
Hommes	591	367	847	1805
Femmes	585	371	844	1800

IV.2. Description des paramètres physiologiques, biologiques et des habitudes comportementales.

Nous avons retenu des paramètres associés au risque cardiovasculaire ou connu pour être associés à un état inflammatoire ou infectieux (tableaux 5 et 6).

Nous avons également pris en compte la consommation de médicaments utilisés dans les pathologies cardiovasculaires et inflammatoires. La prise de médicaments est exprimée en pourcentage d'individus consommant la classe médicamenteuse au moment de l'interrogatoire.
La consommation de tabac est exprimée en nombre de cigarettes fumées par jour.
La consommation d'alcool est exprimée en grammes par jour.
Nous avons également tenu compte de la saison au cours de laquelle les consultants sont venus au CMP.

Le nombre d'individus par classe d'âge apparaît être proche entre les hommes et les femmes.

De plus, les moyennes d'âge sont sensiblement les mêmes. Poids, indice de masse corporelle, pression artérielle systolique et diastolique augmentent avec l'âge. Pour ces mêmes paramètres, les valeurs correspondant à celles des hommes sont plus élevées que celles des femmes, hormis l'indice de masse corporelle et beaucoup plus discrètement le poids où les filles de 5 à 14 ans ont des valeurs plus élevées que les garçons.
Seul 1,34% des femmes sont ménopausées.

En ce qui concerne les paramètres biologiques sériques, les valeurs obtenues sont tout à fait conformes à une population d'individus sains (*17*). Par exemple, le taux de cholestérol est toujours compris dans les valeurs habituelles : 4,1-6,2 mmol/L quel que soit l'âge. Dans l'ensemble des individus de la cohorte, les valeurs moyennes des paramètres associés habituellement à un risque cardiovasculaire comme la PAD (Pression artérielle Diastolique), le taux de cholestérol, l'Apo AI ou bien encore la consommation de tabac sont tout à fait habituelles. La consommation d'alcool ou de tabac est modérée.
Environ 2/3 des individus de la cohorte ont consulté le Centre de Médecine Préventive en hiver et au printemps.

La prise de certaines familles de médicaments est variable suivant l'âge. Certaines familles sont prises à tout âge, comme les anti-inflammatoires ou les antipyrétiques. Par contre d'autres familles sont prises uniquement dans certaines classes d'âge comme les anti-hypertenseurs ou bien les anti-arythmiques chez les plus de 29 ans.
En ce qui concerne les médicaments à visée respiratoire, les enfants de 5-14 ans en consomment plus que les adultes. Le groupe des 15-28 ans et plus particulièrement les femmes (6%) sont le plus souvent traités par des antibiotiques.

L'aspect des sérums a également été relevé : lactescent, opalescent, présence de chylomicrons, paramètres pouvant être à l'origine de perturbations d'un dosage immunonéphélométrique et donc susceptibles de modifier la qualité du dosage des protéines de l'inflammation.

Tableau 5. Description récapitulative des paramètres biologiques, physiologiques et des habitudes comportementales des hommes.

Classes d'âge	*5-14 ans* *n=591*	*15-28 ans* *n=367*	*29-75 ans* *n=847*
Age (années)	11,4 (2,04)*	17,4 (2,27)*	41,9 (4,9)*
Poids (kg)	41,0(12,2)	64,7(10,7)	77,1(11,4)
Indice de masse corporelle (kg/m^2)	17,96 (2,78)	21,2 (2,88)	25,43 (3,36)
Pression artérielle systolique (mmHg)	111,6 (11,2)	125,7 (11,3)	127,8 (12,7)
Pression artérielle diastolique (mmHg)	55,7 (10,1)	65,7 (10,8)	78,1 (9,8)
Paramètres biologiques			
Leucocytes (10^9/L)	6,81 (1,62)	6,72 (1,64)	7,05 (1,91)
Plaquettes (10^9/L)	300,6 (59,3)	264,2 (55,5)	264,5 (55,7)
Hémoglobine (g/L)	13,5 (8,8)	153,0 (10,05)	152,8 (8,6)
Cholestérol (mmol/L)	4,65 (0,76)	4,46 (0,89)	6,01 (1,12)
Triglycérides (mmol/L)	0,58 (1,54)	0,73 (1,58)	1,16 (1,77)
Glycémie (mmol/L)	4,91 (0,36)	4,96 (0,38)	5,24 (0,68)
TGO (UI/L)	26,44 (7,40)	27,73 (95,54)	24,78 (12,06)
TGP (UI/L)	20,34 (12,42)	22,85 (22,05)	35,29 (21,53)
Gamma GT (UI/L)	12,22 (3,43)	15,64 (8,27)	38,04 (38,26)
Apolipoprotéine AI (g/L)	1,53 (0,22)	1,40 (0,19)	1,54 (0,24)
Apolipoprotéine B (g/L)	0,78 (0,17)	0,81 (0,21)	1,15(0,27)
Apolipoprotéine E (mg/L)	46,25 (11,37)	41,71 (9,82)	50,15 (19,61)
Saison de la consultation			
Consultation en Hiver (%)	31,9	35,9	30,8
Consultation au Printemps (%)	35,5	29,5	34,2
Consultation en Eté (%)	17,4	18,7	19,3
Consultation en Automne (%)	15,2	15,9	15,6
Tabac actuel (cigarettes/j)	0	1,36	5,63
Tabac passé (cigarettes/j)	0	0,19	6,61
Alcool (g/j)	0	1,85	23,52
Médicaments			
Anti-inflammatoires (%)	1,9	2,24	4,0
Antibiotiques (%)	1,9	4,4	1,44
Anti-hypertenseurs (%)	0	0	3,2
Anti-arythmiques (%)	0	0	2,4
Analeptiques cardiaques (%)	0	0	0,12
Hypolipémiants (%)	0,19	1,12	6,5
Antipyrétiques (%)	1,54	2,48	3,83
Antihistaminiques (%)	0,03	0,02	0,01
Thérapeutiques respiratoires (%)	4,11	3,86	2,2
Aspects des sérums			
Sérums lactescents (%)	0	0	0,3
Sérums opalescents (%)	0,38	0,8	0,02
Chylomicrons (%)	0	0,2	0,2

* moyenne (écart-type)

Tableau 6. Description récapitulative des paramètres biologiques, physiologiques et des habitudes comportementales des femmes.

Classes d'âge	*5-14 ans* *n=585*	*15-28 ans* *n=371*	*29-75 ans* *n=844*
Age (années)	11,4 (2,04)*	17,8 (2,55)*	39,8 (4,8)*
Indice de masse corporelle (kg/m^2)	18,44 (3,07)	21,3 (2,89)	23,83 (4,14)
Poids (kg)	41,1(11,8)	56,8(8,5)	61,8(10,88)
Pression artérielle systolique (mmHg)	109,7 (9,80)	115,9 (10,01)	119,4 (13,4)
Pression artérielle diastolique (mmHg)	56,5 (10,58)	63,6 (10,1)	72,4 (10,3)
Ménopause (%)	0	0	1,34
Paramètres biologiques			
Leucocytes (10^9/L)	6,97 (1,65)	7,43 (1,89)	7,16(1,85)
Plaquettes (10^9/L)	308,0 (62,61)	288,3 (61,6)	281,3 (65,4)
Hémoglobine (g/L)	135,6 (7,5)	136,7 (7,81)	135,5 (9,6)
Cholestérol (mmol/L)	4,85 (0,80)	4,90 (0,84)	5,52 (0,90)
Triglycérides (mmol/L)	0,68 (1,58)	0,76 (1,49)	0,79 (1,57)
Glycémie (mmol/L)	4,87 (0,38)	4,76 (0,40)	4,93 (0,69)
TGO (UI/L)	23,01 (6,33)	1798 (6,79)	17,7 (7,90)
TGP (UI/L)	17,91(6,16)	17,65 (10,14)	20,10 (14,84)
Gamma GT (UI/L)	10,64 (2,53)	12,34 (5,19)	18,70 (18,07)
Apolipoprotéine AI (g/L)	1,50 (0,20)	1,55 (0,24)	1,69 (0,26)
Apolipoprotéine B (g/L)	0,83 (0,18)	0,87 (0,19)	0,97 (0,22)
Apolipoprotéine E (mg/L)	49,43 (11,17)	44,69 (11,54)	44,96 (11,92)
Saison de la consultation			
Consultation en Hiver	31,1	32,7	30,8
Consultation au Printemps	34	34,3	34,3
Consultation en Eté	18,5	19,8	19,4
Consultation en Automne	16,4	13,2	15,1
Tabac actuel (cigarettes/j)	0	1,93	2,73
Tabac passé (cigarettes/j)	0	1,60	2,34
Alcool (g/j)	0	0,43	4,49
Médicaments			
Anti-inflammatoires (%)	2,01	2,79	2,40
Antibiotiques (%)	4,10	6,04	1,58
Anti-hypertenseurs (%)	0	0	1,71
Anti-arythmiques (%)	0	0	3,17
Analeptiques cardiaques (%)	0	0.2	0,7
Hypolipémiants (%)	0,4	0.5	2,1
Antipyrétiques (%)	2,92	3,50	4,68
Antihistaminiques (%)	0,02	0,02	0,01
Thérapeutiques respiratoires (%)	4,81	3,29	2,1
Contraceptifs (%)	0,2	32,9	21,8
Stérilet (%)	0	0	34,4
Aspect des sérums			
Sérums lactescents (%)	0	0	0,3
Sérums opalescents (%)	0,8	0	-
Chylomicrons (%)	0,2	0	0,2

* moyenne(écart-type)

IV.3. Dosages de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde

IV.3.1. Validation des techniques de dosage

Nous devions réaliser le dosage de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde sur environ 3700 échantillons de sérums, aussi il nous fallait disposer d'une technique de dosage simple, rapide, reproductible, automatisable, sensible et spécifique. C'est pourquoi nous avons réalisé des essais de répétabilité, de reproductibilité, d'exactitude et des essais de linéarité.

Quelques définitions :

- Précision : "Qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions déterminées. La précision est également appelée "fidélité". Elle n'a pas de valeur numérique. "

- Répétabilité: "Expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur, applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyse."

- Reproductibilité : "Expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée dans diverses conditions qui doivent être définies. La reproductibilité intralaboratoire est calculée dans un même laboratoire, à partir des résultats d'un aliquot d'un même spécimen, distribuées au hasard dans les séries d'analyse de spécimens de patients (reproductibilité intra sérielle) soit "dans la journée", soit "jour après jour", soit en fonction des séries pendant plusieurs jours consécutifs (reproductibilité intersérielle) ".

- Détectabilité : "Capacité d'une technique à détecter un analyte présent dans le milieu. Elle est évaluée par l'étude de la limite de détection."

- Limite de détection : "plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée avec une probabilité connue d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à K fois l'écart-type de précision mesuré sur le blanc-réactif (K est calculé en fonction des risques α et β, α étant le risque de considérer une grandeur comme différente de zéro alors

qu'elle est nulle, β celui de considérer une grandeur comme nulle alors qu'elle n'est pas nulle)."

- Exactitude : "l'exactitude (ou justesse) d'une méthode représente la qualité de l'accord entre l'estimation d'une quantité mesurable (valeur mesurée) et la meilleure estimée de la valeur vraie, en dehors des erreurs aléatoires."

IV.1.1. Essai de répétabilité

Afin d'étudier la répétabilité de nos techniques de dosage, nous avons préparé 3 pools de sérums à partir de sérums de consultants du CMP et correspondant à 3 concentrations différentes de CRP : A<1mg/L, B proche de 5 mg/L et C>10mg/L.

Les dosages de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde ont été répétés 20 fois sur chaque pool.

Tableau 7. Etude de répétabilité du dosage de la CRP (n=20)

CRP	Pool A	Pool B	Pool C
Moyenne (mg/L)	0,61	5,02	12,26
Ecart-type (mg/L)	0,02	0,16	0,41
Coefficient de variation (%)	**3,4**	**3,2**	**3,3**

Tableau 8. Etude de répétabilité du dosage de l'haptoglobine (n=20)

Haptoglobine	Pool A	Pool B	Pool C
Moyenne (g/L)	1,18	1,50	2,17
Ecart-type (g/L)	0,036	0,078	0,086
Coefficient de variation (%)	**3,0**	**5,2**	**4,0**

Tableau 9. Etude de répétabilité du dosage de l'orosomucoïde (n=20)

Orosomucoïde	Pool A	Pool B	Pool C
Moyenne (g/L)	0,51	0,94	1,31
Ecart-type (g/L)	0,015	0,041	0,046
Coefficient de variation (%)	**3,0**	**4,4**	**3,5**

Le coefficient de variation des 3 protéines et des 3 pools est toujours inférieur à 5,2%.
La répétabilité est donc satisfaisante.

IV.3.1.2. Essai de reproductibilité

Les essais de reproductibilité ont été réalisés à partir d'un sérum contrôle du commerce de concentration connue dosé une fois par jour pendant 10 jours.

Pour la CRP, le contrôle est le N/T Contrôle Rhumatologie SL/1 (lot 199414).
Pour l'haptoglobine et l'orosomucoïde, il s'agit du N/T Contrôle protéine SL/M (lot 084701).

Tableau 10. Essai de reproductibilité du dosage de la CRP (n=10)

Rhuma Cont.1	**CRP**
Valeur cible (mg/l)	12,40
Moyenne (mg/l)	12,82
Ecart-type (mg/l)	0,70
Coefficient de variation (%)	**5,0**

Tableau 11. Essai de reproductibilité du dosage de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde (n=10)

N/T Contrôles protéine SL/M	**Haptoglobine**	**Orosomucoïde**
Valeur cible (g/l)	1,19	0,86
Moyenne (g/l)	1,29	0,92
Ecart-type (g/l)	0,076	0,045
Coefficient de variation (%)	**6,0**	**5,0**

Pour le dosage de la CRP, la valeur moyenne obtenue est de 12,82 mg/L pour une valeur cible de 12,40 mg/L.
Le coefficient de variation est de 5,0%, ce qui est dans les limites acceptables.

En ce qui concerne l'haptoglobine et l'orosomucoïde, les valeurs moyennes mesurées sont respectivement de 1,29 g/L et de 0,92 g/L avec des valeurs cibles de 1,19 g/L et de 0,86 g/L.
Ici encore, les coefficients de variation de jour à jour sont dans les limites acceptables : 6% et 5%.

La reproductibilité de nos techniques de dosage est donc tout à fait satisfaisante.

IV.3.1.3. Sensibilité des techniques de dosage

La sensibilité des dosages est donnée par la limite inférieure de la courbe d'étalonnage et dépend de la concentration du standard.
La réalisation d'une gamme de calibration pour chaque protéine avec des standards de 21,5 mg/L pour la CRP, de 1,16 g/L d'haptoglobine et de 0,775 g/L d'orosomucoïde, a permis de déterminer la limite de sensibilité de chaque dosage :

- 0,175 mg/L pour la CRP
- 0,08 g/L pour l'haptoglobine
- 0,20 g/L pour l'orosomucoïde

IV.3.1.4. Exactitude des résultats

L'exactitude de nos techniques de dosage a été déterminée en mesurant la concentration de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde dans un standard international : BCR CRM n°3750 dont les valeurs cibles sont établies avec des techniques de référence (tableau 13).

Nous avons réalisé 6 dosages successifs.

Tableau 13. Essai d'exactitude des dosages de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde (n=6)

BCR CRM n°3750	Moyenne	Ecart-type	Valeur cible	Ecart (%)
CRP (mg/l)	38,45	0,836	39,2 ± 1,9	1,9
Haptoglobine (g/l)	0,910	0,058	0,893 ± 0,009	1,9
Orosomucoïde (g/l)	0,655	0,0138	0,656 ± 0,005	0,1

Les résultats de la CRP et de l'orosomucoïde sont dans les limites admises alors que pour l'haptoglobine, la différence par rapport à la limite haute est de 0,008 g/L

Les techniques de dosage utilisées peuvent être considérées comme exactes.

IV.3.1.5. Essai de linéarité

Afin d'étudier la linéarité de notre technique de dosage de la CRP, un sérum à concentration élevée (46,9 mg/L) en CRP a été dilué dans de l'eau physiologique.

Tableau 14. Essai de linéarité de la technique de dosage de la CRP.

Dilution (%)	Pur	50	33	25	22	20	17	15	12,5	10	7,5	5	2,5	1	0,5
Concentration attendue (mg/L)	46,9	23,4	15,4	11,7	10,3	9,38	7,9	7,03	5,86	4,69	3,51	2,34	1,10	0,46	0,23
Concentration mesurée (mg/L)	46,9	24,9	15,1	12,0	10,3	9,44	8,35	7,39	6,41	4,99	3,73	2,56	1,08	0,40	0,26

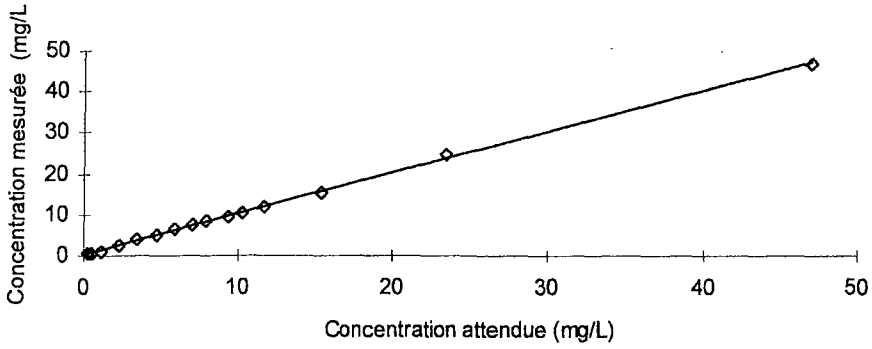

Figure 6 . Linéarité du dosage de la CRP

Concentration mesurée et concentration attendue sont toujours très proches comme en atteste la figure 2 qui met en évidence une relation quasi linéaire entre 0,23 et 47 mg/L. ($R^2 = 0,99$)
L'équation de la droite de régression est y= 1,0052x + 0,1887

La technique de dosage de la CRP apparaît donc linéaire entre 0,23 et 47 mg/L.

D'après le fabricant, le coffret N Latex CRP mono est conçu, avec des dilutions variant de 1/20 à 1/2000, pour mesurer des concentrations de CRP couvrant un domaine global de mesure d'environ 0,175 à 1100 mg/L (*74*).
Le domaine de mesure pour une dilution initiale de 1/400 est de 3,5 - 220 mg/L (*75*).

IV.3.2. Distribution du nombre d'individus en fonction de la concentration des 3 protéines

Les figures 7, 8 et 9 montrent la distribution des concentrations des 3 protéines dans la population étudiée.

Il apparaît que la distribution n'est gaussienne pour aucune des protéines et notamment pour la CRP. Les coefficients de déviation et de Kurtosis sont de 10,8 et 194, 9 pour la CRP, de 1,01 et de 2,29 pour l'haptoglobine et de 1,51 et 6,13 pour l'orosomucoïde.

La concentration en CRP des individus de la cohorte est comprise entre 0,175 mg/L (valeur correspondante à notre limite de sensibilité) et 100 mg/L. Neuf cents individus ont une concentration inférieure à 0,17 mg/L soit près de 1 individu sur 4 et 93,35% de la population à une concentration inférieure à 5 mg/L.
En ce qui concerne la distribution de l'haptoglobine, les résultats sont compris entre 0,2 et 5 g/L. C'est entre 0,8 et 1 g/L que l'on dénombre le plus d'individus : 678.
Quant à l'orosomucoïde, les individus de la cohorte ont des concentrations qui s'échelonnent entre 0,2 et 2,8 g/L et 1620 individus ont une concentration comprise entre 0,6 et 0,8 g/L

Dans la suite de notre étude, nous avons transformé en valeur logarithmique les valeurs des 3 protéines pour normaliser leur distribution.

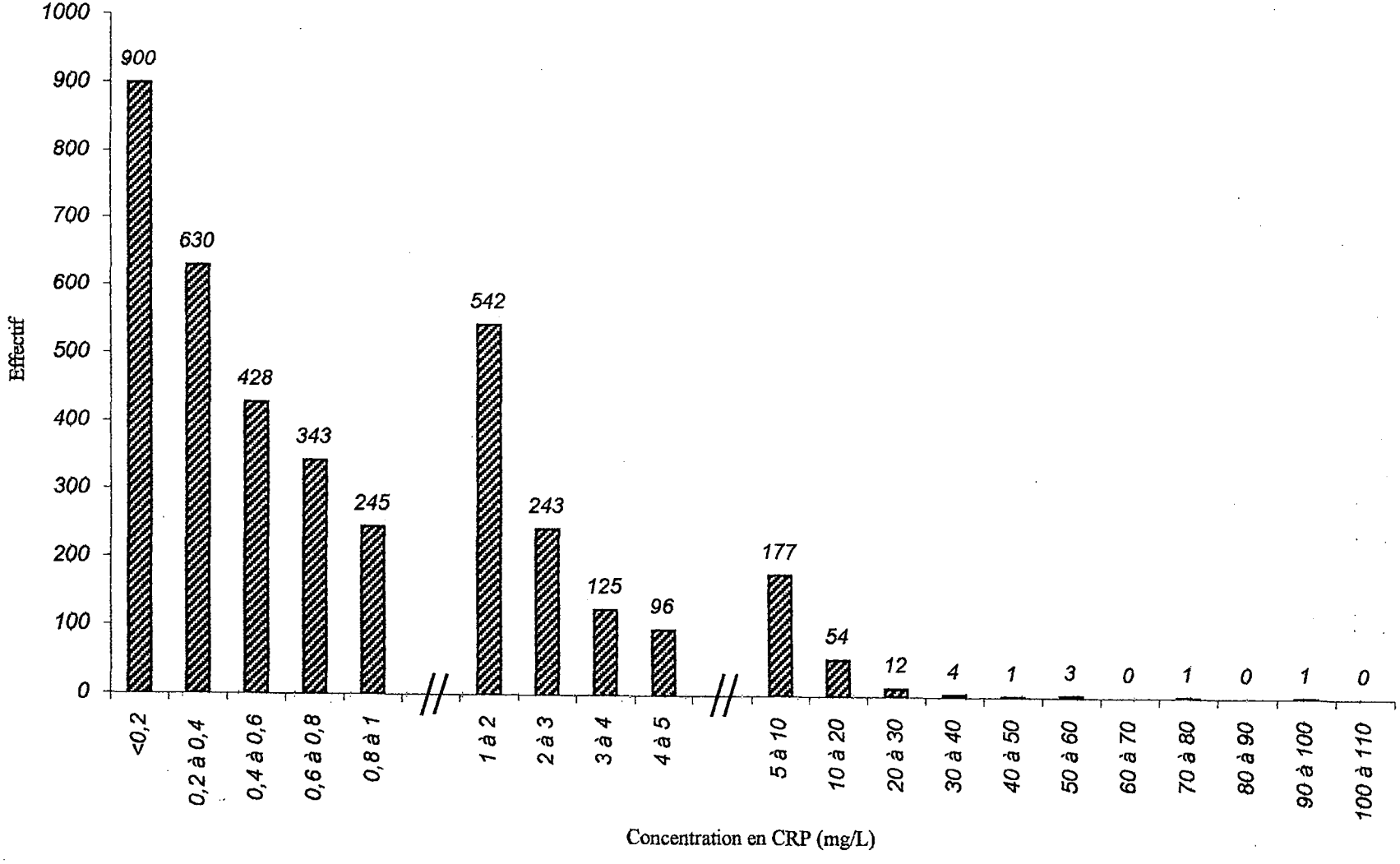

Figure 7. Distribution de la CRP de l'ensemble de la population

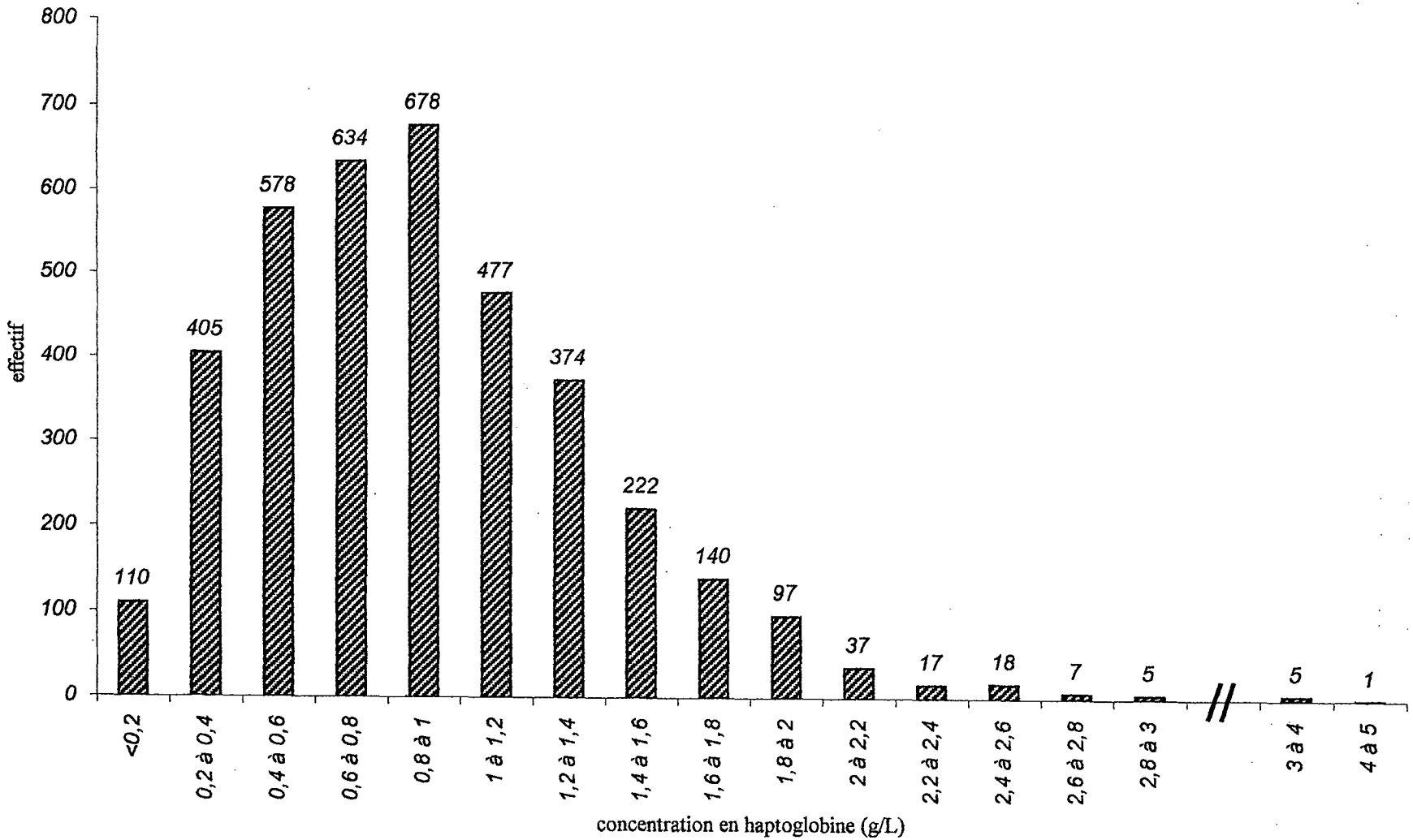

Figure 8. Distribution de l'haptoglobine de l'ensemble de la population

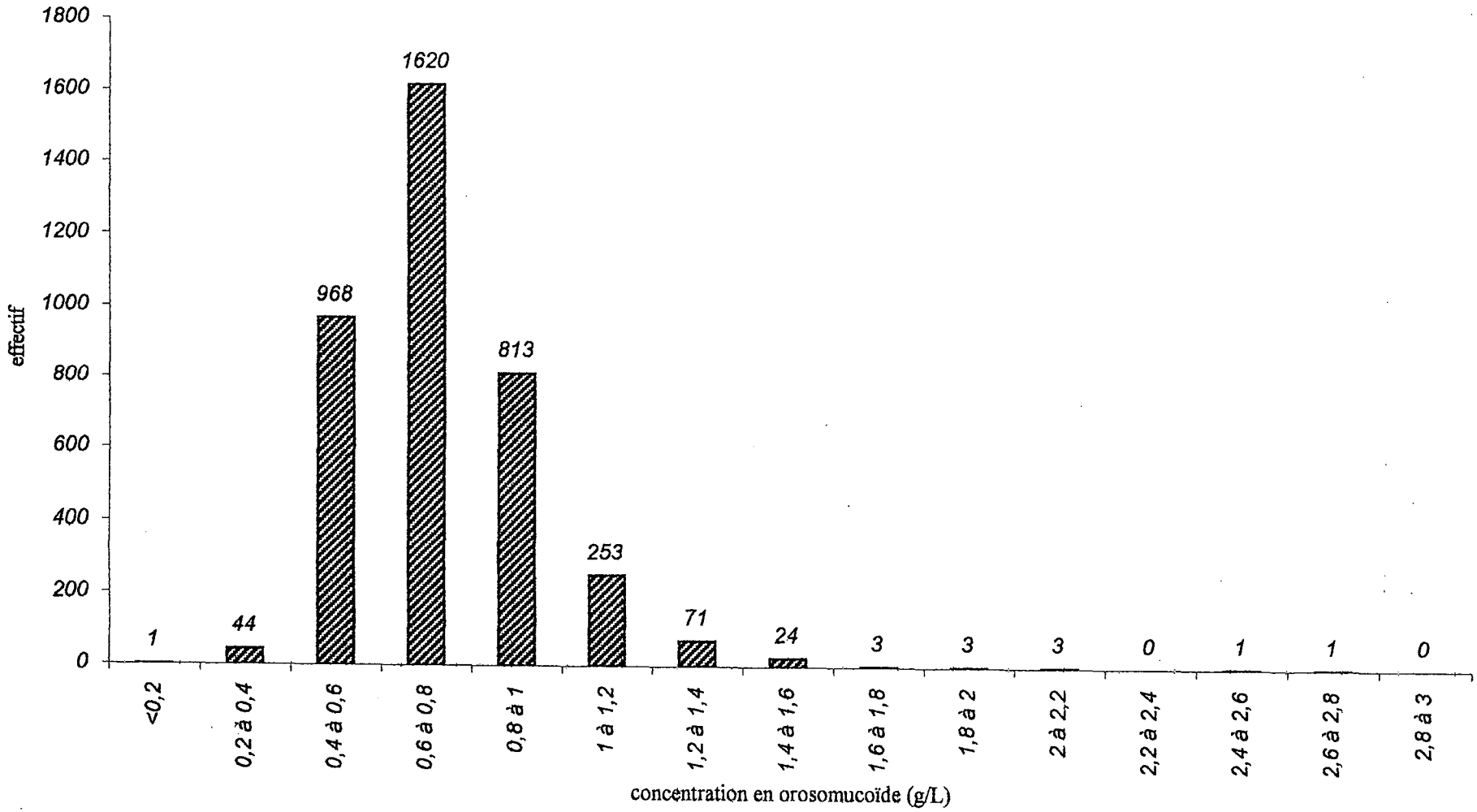

Figure 9. Distribution de l'orosomucoïde de l'ensemble de la population

IV.3.3. Evolution de la concentration des 3 protéines en fonction de l'âge et du sexe.

IV.3.3.1. Selon 3 classes d'âge

Dans les tableaux 16 et 17 figurent les moyennes arithmétiques et géométriques des concentrations des 3 protéines. Nous avons déterminé les moyennes géométriques (calculées à partir de la moyenne logarithmique des concentrations) en raison de la distribution non-gaussienne de ces protéines.

Tableau 16. Moyennes arithmétiques et géométriques de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde chez les hommes de la cohorte

	5-14 ans (n= 591)	15-28 ans (n= 367)	29-75 ans (n= 847)
CRP (mg/L)			
Moyenne arithmétique[1]	1,04(3,29)	1,05(3,43)	1,87(4,02)
Moyenne géométrique[2]	0,37(0,17-1,07)	0,47(0,17-1,38)	0,98(0,34-2,85)
Haptoglobine (g/L)			
Moyenne arithmétique	0,56(0,34)	0,81(0,41)	1,08(0,49)
Moyenne géométrique	0,47(0,38-1,28)	0,70(0,25-0,89)	0,97(0,42-1,15)
Orosomucoïde (g/L)			
Moyenne arithmétique	0,72(0,22)	0,70(0,18)	0,79(0,19)
Moyenne géométrique	0,69(0,53-0,88)	0,68(0,53-0,91)	0,77(0,61-0,97)

[1] moyenne (σ), [2] moyenne ((m–σ)-(m+σ)) calculée à partir de la moyenne logarithmique

Tableau 17. Moyennes arithmétiques et géométriques de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde chez les femmes de la cohorte

	5-14 ans (n= 585)	15-28 ans (n= 371)	29-75 ans (n= 844)
CRP (mg/L)			
Moyenne arithmétique[1]	1,02(3,64)	1,24(1,92)	2,02(3,37)
Moyenne géométrique[2]	0,38(0,17-1,10)	0,62(0,20-1,90)	0,98(0,31-3,13)
Haptoglobine (g/L)			
Moyenne arithmétique	0,73(0,40)	0,99(0,41)	1,07(0,42)
Moyenne géométrique	0,63(0,36-1,13)	0,91(0,59-1,42)	0,99(0,60-1,36)
Orosomucoïde (g/L)			
Moyenne arithmétique	0,73(0,22)	0,69(0,19)	0,71(0,18)
Moyenne géométrique	0,70(0,67-0,74)	0,66(0,51-0,87)	0,69(0,53-0,89)

[1] moyenne (σ), [2] moyenne ((m–σ)-(m+σ)) calculée à partir de la moyenne logarithmique

Les concentrations en CRP et en haptoglobine augmentent avec l'âge.

Pour la CRP, elle augmente de 1,04 à 1,87 mg/L chez les hommes ($p<0,001$) et de 1,02 à 2,02 mg/L chez les femmes ($p<0,001$). Les concentrations en CRP chez les enfants garçons et filles sont très proches : 1,02 et 1,04 mg/L avec des écarts-types sensiblement égaux : 3,29 et 3,64 mg/L.

La concentration moyenne en CRP des femmes est supérieure à celle des hommes à partir de la classe d'âge des 15-28 ans.

Pour l'haptoglobine, La concentration moyenne est plus élevée chez les femmes que chez les hommes dans la classe d'âge des 5-14 ans et des 15-28 ans ; dans la classe d'âge des 29-75 ans, il n'existe plus de différence entre les 2 sexes.

La concentration en haptoglobine augmente de 0,56 g/L à 1,08g/L chez les hommes et de 0,73 g/L à 1,07g/L chez les femmes soit une augmentation respective de 93% et 46%.

A la différence des 2 précédentes protéines, la concentration en orosomucoïde semble plus stable avec l'âge. Chez les hommes, elle varie avec l'âge de 0,72 à 0,79 g/L (+10%) et chez les femmes de 0,73 à 0,71 g/L (-3%).

Les variations inter-individuelles (s/m x 100) par classe d'âge sont également très différentes selon les protéines. Elles varient selon la classe d'âge entre 160 et 350% pour la CRP, entre 40 et 60% pour l'haptoglobine et entre 25 et 30% pour l'orosomucoïde.

IV.3.3.2. Valeurs fréquentes des 3 protéines de l'ensemble de la population en fonction de l'âge et du sexe

Nous avons représenté sur les figures 10 à 15 les valeurs fréquentes des 3 protéines dans l'ensemble de la population en fonction de l'âge et du sexe.
Ces résultats complètent ceux obtenus dans les tableaux précédents. Ils nous permettent de confirmer la relative stabilité avec l'âge des concentrations en orosomucoïde par rapport aux 2 autres protéines.

Ils illustrent également la dispersion des centiles de la CRP. Les centiles 97,5 sont très variables alors qu'ils sont plus stables pour les 2 autres protéines.
La courbe illustrant l'évolution du centile 97,5 en fonction de l'âge chez les femmes présente 2 pics, l'un dans la classe d'âge des 9 ans (15,8 mg/L) et l'autre dans la classe d'âge des 40-44 ans (15,9 mg/L).
Chez les hommes, la concentration maximale correspondant au centile est atteinte dans la classe d'âge des 14 ans (14,1 mg/L).

Les résultats des protéines pour la classe d'âge des 50-75 ans sont à nuancer compte tenu de son effectif : 58 hommes et 30 femmes.

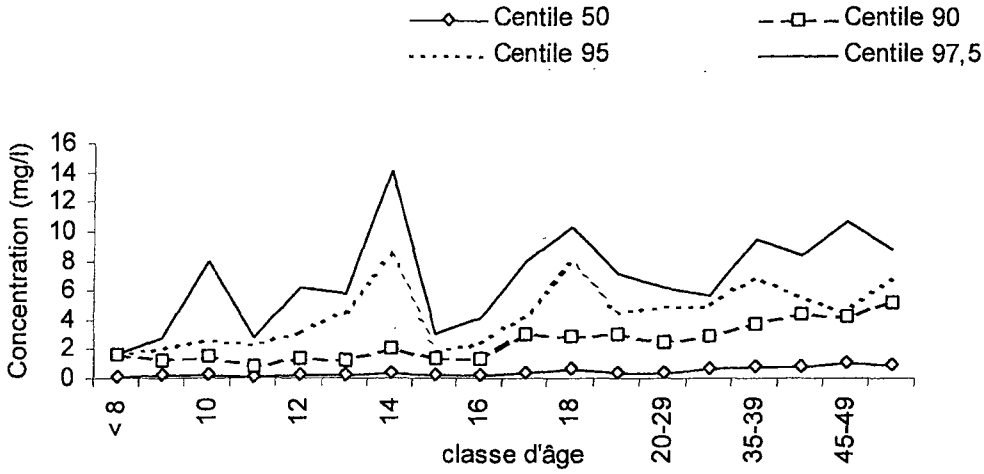

Figure 10. Valeurs fréquentes de la CRP en fonction de l'âge chez les hommes dans l'ensemble de la population

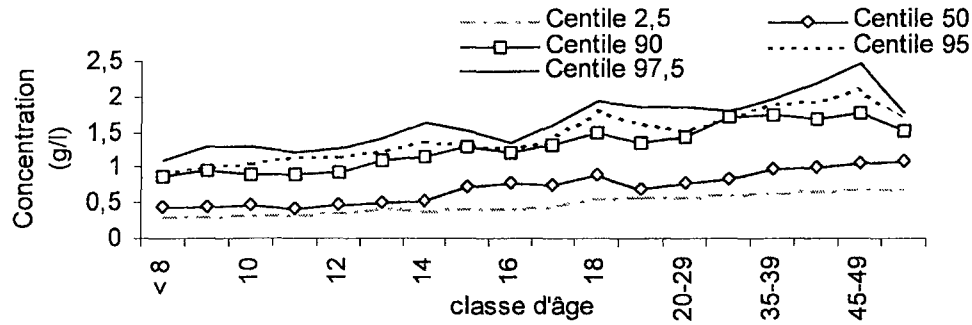

Figure 11. Valeurs fréquentes de l'haptoglobine en fonction de l'âge chez les hommes dans l'ensemble de la population

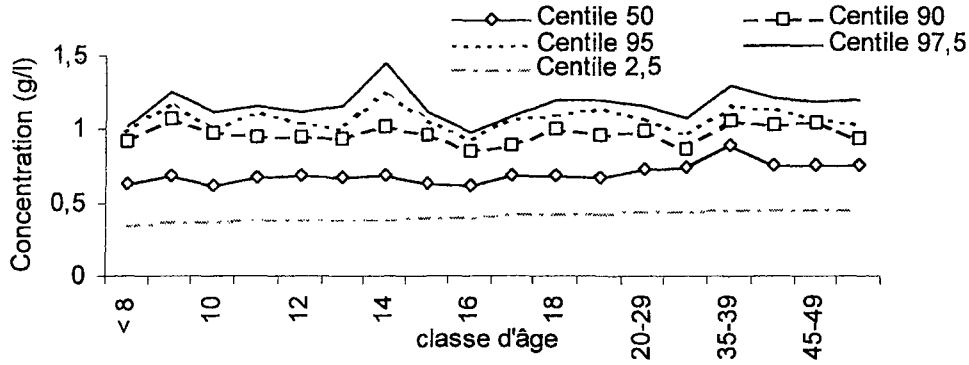

Figure 12. Valeurs fréquentes de l'orosomucoïde en fonction de l'âge chez les hommes dans l'ensemble de la population

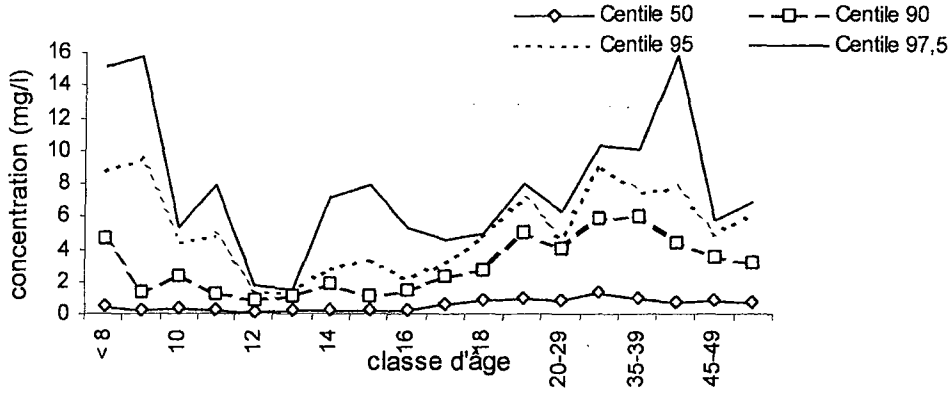

Figure 13. Valeurs fréquentes de la CRP en fonction de l'âge chez les femmes dans l'ensemble de la population

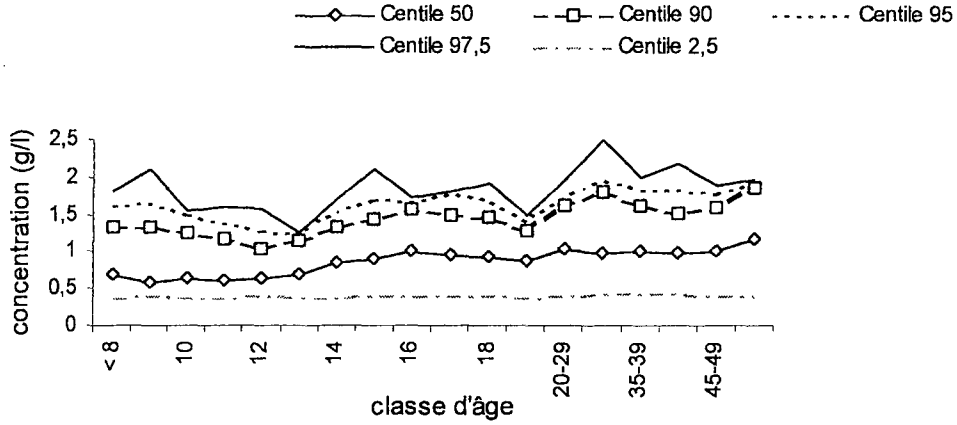

Figure 14. Valeurs fréquentes de l'haptoglobine en fonction de l'âge chez les femmes dans l'ensemble de la population

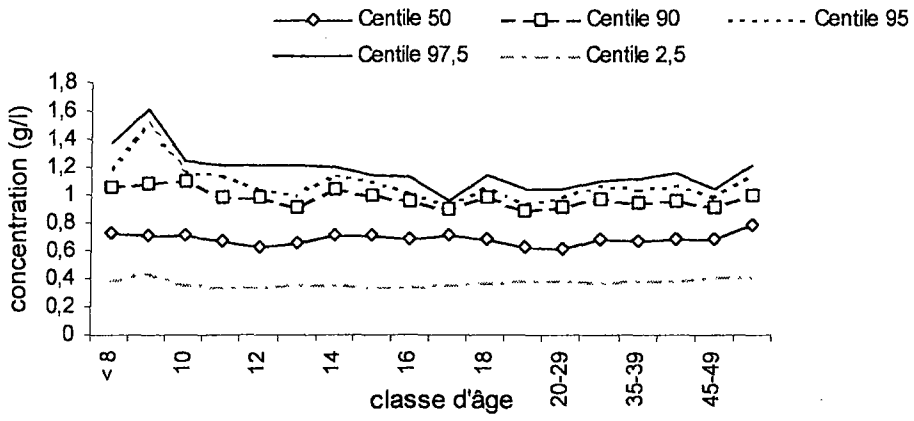

Figure 15. Valeurs fréquentes de l'orosomucoïde en fonction de l'âge chez les femmes dans l'ensemble de la population

IV.4. Analyse de régression multiple

L'analyse de régression multiple permet de mettre en évidence les facteurs (décrits dans les tableaux 5 et 6) susceptibles de modifier significativement les concentrations de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde.
Ces facteurs seront ensuite utilisés ensuite pour sélectionner une population de référence.

L'analyse de régression donne les renseignements suivants :

- Elle met en évidence des paramètres influençant significativement les variations de chaque protéine.
- Le coefficient de régression précise le sens positif ou négatif de l'effet du paramètre considéré sur la protéine étudiée ainsi que la variation de chaque protéine par unité de paramètre considéré.
- Elle permet la quantification de la part de la variance de la protéine expliquée par le facteur R^2.

L'analyse de régression a été réalisée pour chaque protéine séparément selon 3 classes d'âge et selon le sexe.
Les tableaux 18,19, 20, 21, 22 ,23 illustrent les résultats des différentes analyses.

IV.4.1. CRP (tableaux 18 et 19)

Les paramètres influençant significativement la CRP sont au nombre de 8 chez les hommes et 9 chez les femmes dont 3 communs : l'âge, le BMI et les leucocytes.
Ils sont soit associés à un état inflammatoire, à un risque cardiovasculaire ou sont dus à l'environnement.
Globalement, ils expliquent de 13 à 40 % (R^2 global) de la variance de la CRP.
Les paramètres dont l'influence est la plus grande sont chez les hommes les leucocytes et le BMI et chez les femmes les leucocytes et les contraceptifs oraux.

Les leucocytes sont associés aux variations de la CRP dans toutes les classes d'âge hommes et de femmes exception faite de celle des femmes de 15-28 ans et ils expliquent jusqu'à 11,5 % des variations de la CRP

Les contraceptifs oraux chez les filles de plus de 15 ans expliquent entre 17 et 22 % des variations de la CRP.

L'influence de ces paramètres est variable selon l'âge. Pour certains paramètres comme les anti-inflammatoires, ils se retrouvent uniquement chez les femmes de 15-28 ans alors que le BMI influence la CRP à tous les âges.

Le BMI influence positivement les variations de la CRP quel que soit l'âge et le sexe : jusqu'à 18 % chez les femmes adultes

Les antihistaminiques chez les hommes de plus de 28 ans, l'hémoglobine et l'âge chez les filles de moins de 14 ans influencent de façon négative les variations de la CRP.

IV.4.2. Haptoglobine (20 et 21)

Comme pour la CRP, de nombreux paramètres sont associés à des variations de l'haptoglobine. Certains paramètres, comme les leucocytes, le BMI, l'hémoglobine se retrouvent aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Par contre d'autres paramètres sont plutôt sexe-dépendant comme l'apolipoprotéine AI, la GGT, la TGO chez les femmes et la glycémie, l'apolipoprotéine B, les anti-histaminiques, les antalgiques chez les hommes.

L'âge des individus semble également intervenir sur l'influence de certains paramètres, ainsi le BMI, les antalgiques modifient de façon significative les variations de l'haptoglobine uniquement chez les garçons. Par contre, la glycémie et la GGT sont des paramètres uniquement rencontrés chez les adultes.

L'ensemble de ces paramètres expliquent de 15 à 25% des variations de l'haptoglobine.

Si nous classons ces paramètres selon leur poids respectif dans la variance globale, ce sont les leucocytes et le BMI qui ont l'influence la plus importante (respectivement R^2= 0,137 et 0,098) puis le tabac, les apopoliprotéines, les plaquettes, les antalgiques, l'hémoglobine, les anti-inflammatoires et la PAD. Les autres paramètres ont une variance inférieure à 2%.

Certains paramètres sont associés à des coefficients de régression négatif : hémoglobine, apolipoprotéine AI, TGO, printemps et les anti-histaminiques.

IV.4.3.Orosomucoïde (tableaux 22 et 23)

L'analyse de régression multiple portant sur l'orosomucoïde montre qu'il existe plus de paramètres associés à des variations significatives de l'orosomucoïde chez les femmes que chez les hommes (13 pour 8). L'ensemble des paramètres explique 8 à 35% des variations de l'orosomucoïde.

C'est à nouveau les leucocytes, le BMI mais également le Log triglycérides qui expliquent les plus grandes variations.
Les paramètres uniquement significatifs chez les hommes sont la TGO, les antalgiques, l'alcool, ceux uniquement significatifs chez les femmes sont l'hémoglobine, les plaquettes, l'apolipoprotéine AI, l'apolipoprotéine B et l'apolipoprotéine E. De la même façon que pour les 2 autre protéines, certains paramètres sont significatifs uniquement dans certaines classes d'âge : l'hiver chez les garçons ou bien les thérapeutiques respiratoires chez les femmes de 15-28 ans.

Tableau 18. Principaux déterminants associés à la CRP chez les hommes
Analyse de régression multiple à 9 variables explicatives

	Hommes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression[d]	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]
Age (en années)					0,013(0,003)**	0,013
Leucocytes (10^{12}/l)	0,040(0,011)**	0,021	0,056(0,014)**	0,058	0,066(0,008)**	0,115
TGO (UI/L)					0,003(0,001)*	0,008
Tabac (cigarettes/j)					0,006(0,001)**	0,014
BMI[b] (kg/m^2)	0,043(0,006)**	0,083	0,031(0,008)**	0,036	0,038(0,004)**	0,076
Saison Hiver	0,150(0,040)**	0,022				
Anti-histaminiques[a]					-0,345(0,120)*	0,006
Antalgiques Fébrifuges[a]	0,643(0,43)**	0,034	0,568(0,147)**	0,037		
Thérapeutiques respiratoires[a]					0,3481(0,096)**	0,012
R^2 global		0,158		0,131		0,244

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] oui=1, non=0 ; [b] body mass index, [c] Part de la variance expliquée, [d] moyenne(écart-type)

Tableau 19. Principaux déterminants associés à la CRP chez les femmes
Analyse de régression multiple à 9 variables explicatives

	Femmes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression[d]	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]
Age (en années)	-0,047(0,010)**	0,035				
Log triglycérides					0,3337(0,080)**	0,013
Leucocytes (10^{12}/l)	0,054(0,011)**	0,069			0,040(0,007)**	0,030
BMI [b] (kg/m^2)	0,073(0,012)**	0,020	0,044(0,007)**	0,068	0,043(0,003)**	0,179
Hémoglobine (g/dl)	-0,008(0,002)*	0,021				
Contraceptifs oraux [a]			0,493(0,045)**	0,217	0,429(0,034)**	0,168
Anti-inflammatoires[a]			0,414(0,129)*	0,020		
Antalgiques Fébrifuges[a]	0,461(0,103)**	0,030				
Antibiotiques[a]					0,334(0,110)*	0,007
R^2 global		0,179		0,305		0,398

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] oui=1, non=0 ; [b] body mass index, [c] Part de la variance expliquée, [d] moyenne(écart-type)

Tableau 20. Principaux déterminants associés à l'haptoglobine chez les hommes
Analyse de régression multiple à 13 variables explicatives

	Hommes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression[e]	R^2 [d]	Coefficient de régression	R^2 [d]	Coefficient de régression	R^2 [d]
Log triglycérides			0,169(0,064)*	0,018		
leucocytes (10^6/l)					0,030(0,004)**	0,137
Plaquettes (10^6/l)	0,737 (0,189)**	0,025			0,380(0,128)*	0,008
BMI [b] (kg/m^2)	0,028(0,004)**	0,079				
Tabac (cigarettes/j)					0,004(0,0007)**	0,026
Activité physique			-0,056(0,016)**	0,035		
PAD [c](mm Hg)					0,002(0,0007)*	0,007
Hémoglobine (g/l)					-0,003(0,0007)**	0,022
Apolipoprotéine B (g/l)					0,119(0,025)**	0,029
Glycémie (mmol/l)					0,033(0,010)**	0,016
Saison Printemps	-0,073(0,023)*	0,016	-0,112(0,029)**	0,049		
Anti-histaminiques[a]					-0,162(0,055)*	0,008
Antalgiques fébrifuges[a]	0,374(0,090)**	0,027				
R^2 global		0,149		0,102		0,256

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] oui=1, non=0 ; [b] body mass index ; [c] Pression artérielle diastolique, [d] Part de la variance expliquée, [e] moyenne(écart-type)

Tableau 21. Principaux déterminants associés à l'haptoglobine chez les femmes
Analyse de régression multiple à 12 variables explicatives.

	Femmes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression[e]	R^2 [d]	Coefficient de régression	R^2 [d]	Coefficient de régression	R^2 [d]
Log triglycérides	0,140(0,052)*	0,018				
leucocytes (10^6/l)	0,033(0,006)**	0,074	0,020(0,005)**	0,031	0,015(0,003)**	0,039
Plaquettes (10^6/l)	0,499(0,180)*	0,013				
Tabac					0,003(0,0008)**	0,018
BMI[b] (kg/m^2)			0,014(0,003)**	0,081	0,012(0,001)**	0,098
PAD[c] (mm Hg) [b]			0,003(0,0009)*	0,020		
Hémoglobine (g/l)	-0,006(0,001)**	0,024				
Apolipoprotéine A1 (g/l)			-0,139(0,038)**	0,027		
Gamma GT (UI/l)					0,002(0,0003)**	0,016
TGO (UI/l)					-0,002(0,0007)**	0,013
Anti-inflammatoires[a]			0,184(0,056)* *	0,022		
Antibiotiques[a]	0,149(0,051)*	0,013				
R^2 global		0,142		0,182		0,185

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] oui=1, non=0; [b] body mass index ; [c] Pression artérielle diastolique [d] Part de la variance expliquée, [e]moyenne (écart-type)

Tableau 22. Principaux déterminants associés à l'orosomucoïde chez les hommes
Analyse de régression multiple à 8 variables explicatives

	Hommes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression[d]	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]
Log triglycérides			0,088(0,026)**	0,027	0,089(0,013)**	0,120
leucocytes (10^6/l)	0,009(0,003)*	0,017	0,010(0,003)**	0,042	0,013(0,001)**	0,065
Sérum lactescent[a]					0,239(0,054)**	0,017
Alcool (g/j)					0,0005(0,0001)**	0,016
BMI[b] (kg/m^2)	0,008(0,001)**	0,047	0,007(0,002)**	0,051	0,003(0,001)*	0,009
TGO (UI/l)			-0,203 (0,0564)**	0,030		
Saison Hiver	0,031(0,010)*	0,015				
Antalgiques-Fébrifuges[a]			0,103(0,034)*	0,028		
R^2 global		0,080		0,178		0,229

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] oui=1, non=0 ; [b] body mass index, [c] Part de la variance expliquée, [d] moyenne(écart-type)

Tableau 23. Principaux déterminants associés à l'orosomucoïde chez les femmes
Analyse de régression multiple à 12 variables explicatives

	Femmes					
	5-14 ans		15-28 ans		28-75 ans	
	Coefficient de régression	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]	Coefficient de régression	R^2 [c]
Age (années)	-0,008(0,003)*	0,017				
Leucocytes (10^6/l)	0,016(0,003)**	0,104			0,006(0,002)**	0,007
Plaquettes(10^6/l)	0,324 (0,0856)**	0,028	0,227 (0,0854)*	0,013		
BMI [b](kg/m^2)	0,010(0,002)**	0,043	0,008(0,002)**	0,048	0,007 (0,0008)**	0,166
Hémoglobine (g/l)					0,001 (0,0003)**	0,025
Apolipoprotéine A1 (g/l)	-0,084(0,024)**	0,021			-0,070(0,012)**	0,018
Apolipoprotéine E (g/l)			0,001(0,0004)**	0,027	0,001(0,0003)**	0,008
Apolipoprotéine B (g/l)					0,041(0,015)*	0,006
Gamma GT (UI/l)					0,873 (0,193)**	0,008
TGP (UI/l)					-0,870 (0,240)**	0,009
Thérapeutiques respiratoires[a]			0,079(0,029)*	0,014		
Contraceptifs oraux[a]					-0,069(0,008)**	0,105
R^2 global		0,323		0,112		0,352

*p=0,01, **p=,001; [a] oui=1 , non=0 ; [b] body mass index, [c] Part de la variance expliquée, [d] moyenne(écart-type)

IV.5. Critères de sélection de l'échantillon de référence

Les facteurs significativement liés aux variations de concentration des protéines ont été utilisés comme facteur de sélection de l'échantillon de référence.

Les critères de sélection sont détaillés dans le tableau 24.

Tableau 24. Critères de sélection des individus de la population de référence

Paramètres	*Critères d'exclusion*	*Protéines considérées*
associés à un risque cardiovasculaire		
- métaboliques		
BMI (kg/m^2)	>30 pour les adultes >26 entre 15 et 27 ans >24 pour les moins de 14 ans	CRP, Hapto, Oroso
PAD (mmHg)	>160	Hapto
- environnementaux		
Tabac	Présence	CRP, Hapto
Alcool (g/j)	>22	Oroso
Contraceptifs oraux	Présence	CRP, Oroso
- biologiques		
Triglycérides (mmol/L)	>1,80	CRP, Hapto, Oroso
Apolipoprotéine AI (g/L)	<1,10	Hapto,Oroso
Apolipoprotéine B (g/L)	>1,40	Hapto,Oroso
Glycémie (mmol/L)	<4,1 et >6,1 pour les hommes <4,1 et > 5,9 pour les femmes	Hapto
associés à une inflammation ou une infection		
-biologiques		
Leucocytes (10^6/L)	>10 chez les adultes >12 chez les moins de 8 ans	CRP, Hapto, Oroso
Plaquettes (10^6/L)	<150 et >500	Oroso
Hémoglobine (g/L)	femmes <120 hommes <130	CRP, Hapto, Oroso
-médicaments		
Anti-inflammatoires	Présence	CRP, Hapto
Antalgiques fébrifuges	Présence	CRP, Hapto, Oroso
Antibiotiques	Présence	CRP, Hapto
Thérapeutiques respiratoires	Présence	CRP, Oroso
Anti-histaminiques	Présence	CRP, Hapto
autres		
- biologiques		
TGO (UI/L)	>70	Hapto,Oroso
TGP (UI/L)	>70	Oroso
Gamma GT (UI/L)	>100	Hapto,Oroso
- aspect des sérums		
Sérum opalescent	Présence	Oroso

Les seuils de décision sont qualitatifs et quantitatifs. Ils sont choisis soit en fonction de critères définis par l'OMS (ex : hypertension artérielle définie pour une PAD >160mmHg), soit des critères reconnus comme anormaux (leucocytes $>10.10^6$/L chez les adultes) ou comme pathologique, soit l'absence du paramètre (médicaments).

Après cette première sélection, 5 sujets avaient encore des taux de CRP > 20 mg/L, seuil habituellement considéré comme pathologique aussi nous les avons exclus de la population de référence.
Dans un souci de simplification, nous avons appliqué la même sélection aux 3 protéines.

Tableau 25. Hommes : Effectif avant et après sélection par tranche d'âge

Classe d'âge (années)	*5-13*	*14-18*	*19-39*	*40-49*	*50-75*	*5-75*
Effectif avant sélection	491	361	377	518	58	1805
Effectif après sélection	388	255	150	156	12	961

Tableau 26. Femmes : Effectif avant et après sélection par tranche d'âge

Classe d'âge (années)	*5-13*	*14-18*	*19-39*	*40-49*	*50-75*	*5-75*
Effectif avant sélection	486	335	570	379	30	1800
Effectif après sélection	370	196	175	163	14	918

Les paramètres associés à des variations de la concentration des protéines nous ont conduit à exclure de la population de référence un grand nombre d'individus. Ainsi chez les hommes, 844 hommes ont été exclus de l'ensemble de la population soit 46%.
Chez les femmes, elles sont 882 à avoir été exclues de l'ensemble de la population soit 48%.

Nous avons également précisé les effectifs par tranche d'âge pour montrer que le pourcentage d'exclusion est variable. Il apparaît que chez les femmes, c'est dans la tranche d'âge de 50-75 ans que l'exclusion a été la plus importante : 79% des femmes ont été exclues.
Par contre chez les hommes, c'est dans la tranche d'âge 19-39 ans que l'exclusion a été la plus importante : 69% des hommes ont été exclus.

IV.6. Valeurs de référence

IV.6.1. Valeurs de référence de la CRP

Les tableaux 27 et 28 décrivent les résultats des valeurs de référence de la CRP chez les hommes et les femmes de la population de référence. En raison d'un effectif insuffisant, les centiles 95 et 97,5 de la classe d'âge des 50-75 ans n'ont pas été calculés (12 hommes et 14 femmes).

Tableaux 27. Valeurs de référence de la CRP (mg/L) chez les hommes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 388)	14-18 (n= 255)	19-39 (n= 150)	40-49 (n= 156)	50-75 (n= 12)
Centile 50	0,21	0,28	0,54	0,61	0,68
Centile 90	0,86	1,40	1,68	2,76	1,50
Centile 95	1,45	2,13	2,68	4,80	-
Centile 97,5	2,40	3,55	4,08	6,40	-

L'asymétrie de la distribution rend impossible la détermination du centile 2,5.

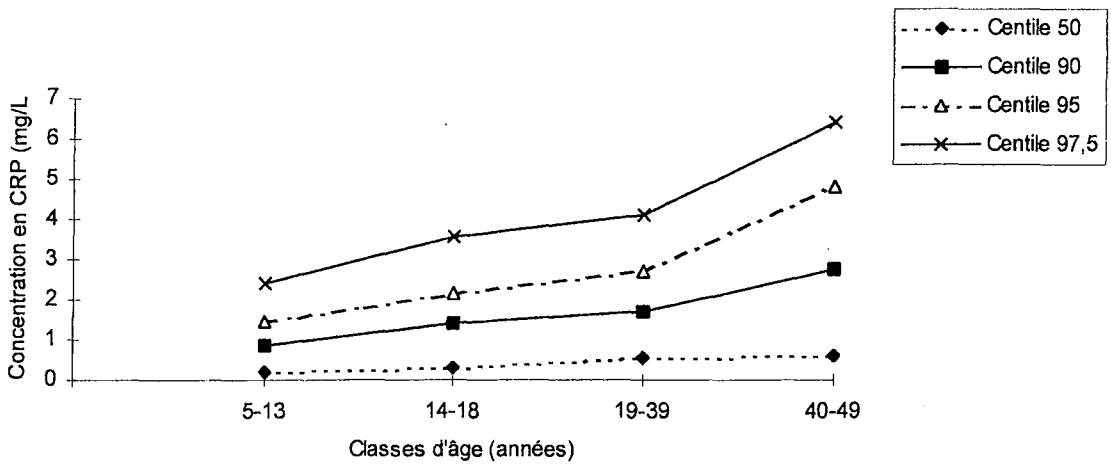

Figure 16. Médiane et dispersion des valeurs de référence de la CRP chez les hommes

Tableaux 28. Valeurs de référence de la CRP (mg/L) chez les femmes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 370)	14-18 (n= 196)	19-39 (n= 175)	40-49 (n= 163)	50-75 (n= 14)
Centile 50	0,20	0,22	0,56	0,54	0,78
Centile 90	1,07	1,10	2,30	2,14	1,90
Centile 95	1,35	1,50	3,34	3,15	-
Centile 97,5	2,07	2,50	4,37	4,14	-

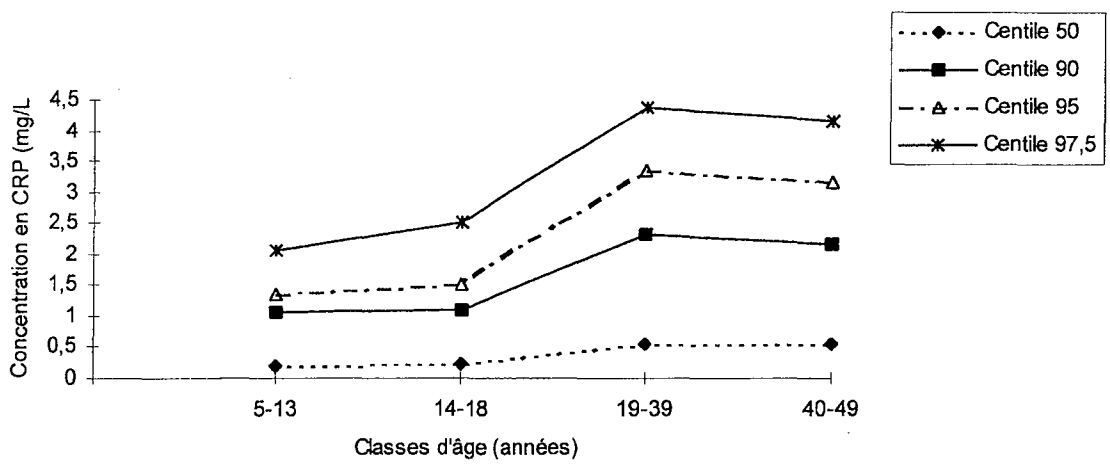

Figure 17. Médiane et dispersion des valeurs de référence de la CRP chez les femmes

Il apparaît clairement que la médiane de la CRP augmente avec l'âge. La concentration maximale (centile 97,5) est atteinte dans la classe d'âge des 40-49 ans chez les hommes (6,40 mg/L) et dans la classe d'âge des 19-39 ans chez les femmes (4,37 mg/L).

Les médianes des hommes et des femmes sont très proches. Le centile 97,5 des hommes est supérieur à celui des femmes dans les classes d'âge des 5-13 ans, 14-18 ans et des 40-49 ans.

IV.6.2. Valeurs de référence de l'haptoglobine

Tableaux 29. Valeurs de référence de l'haptoglobine (g/L) chez les hommes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 388)	14-18 (n= 255)	19-39 (n= 150)	40-49 (n= 156)	50-75 (n= 12)
Centile 2,5	0,08	0,08	0,36	0,30	<0,58
Centile 50	0,43	0,63	0,82	0,85	0,92
Centile 90	0,87	1,20	1,43	1,36	1,44
Centile 95	0,99	1,35	1,68	1,53	-
Centile 97,5	1,08	1,50	1,81	1,60	-

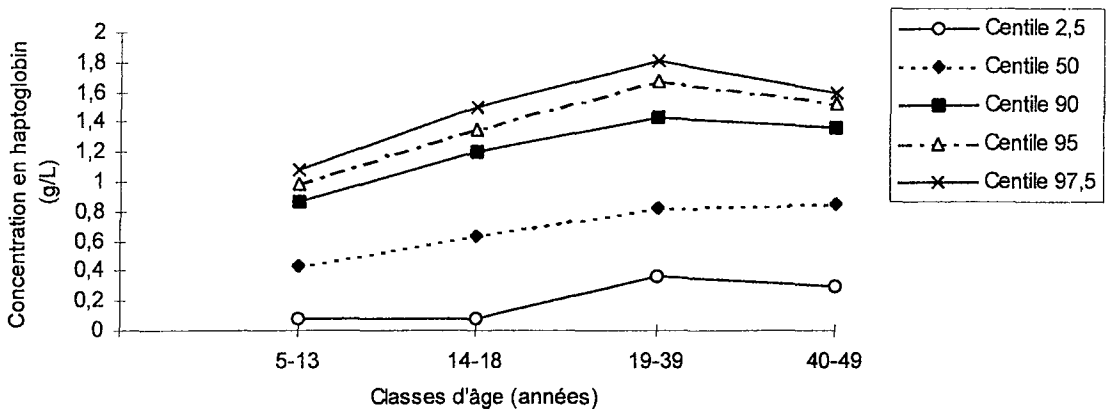

Figure 18. Médiane et dispersion des valeurs de référence de l'haptoglobine chez les hommes

Tableaux 30. Valeurs de référence de l'haptoglobine (g/L) chez les femmes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 370)	14-18 (n= 196)	19-39 (n= 175)	40-49 (n= 163)	50-75 (n= 14)
Centile 2,5	0,10	0,30	0,35	0,39	<0,40
Centile 50	0,61	0,83	0,90	0,95	1,17
Centile 90	1,10	1,29	1,40	1,39	1,70
Centile 95	1,25	1,44	1,56	1,48	-
Centile 97,5	1,31	1,50	1,73	1,62	-

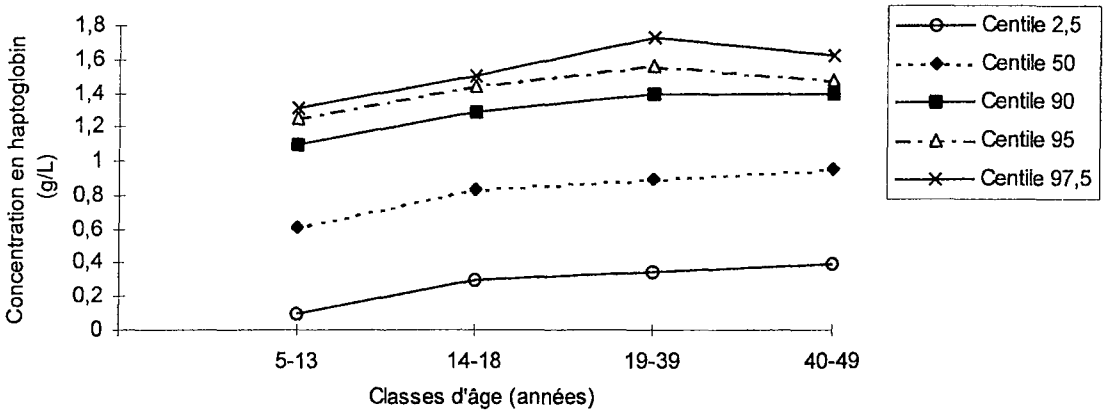

Figure 19. Médiane et dispersion des valeurs de référence de l'haptoglobine chez les femmes

Comme pour la CRP, la médiane de l'haptoglobine augmente avec l'âge dans les 2 sexes : de 0,43 à 0,92 g/L chez les hommes et de 0,61 à 1,17 g/L chez les femmes. Mais contrairement à la CRP, les médianes sont toujours plus élevées chez les femmes.

La dispersion des centiles présente un maximum chez les hommes et chez les femmes dans la classe d'âge des 19-39 ans. Le centile 97,5, à ce pic, est chez les hommes de 1,81 g/L et chez les femmes de 1,73 g/L.

IV.6.3. Valeurs de référence de l'orosomucoïde

Tableaux 31. Valeurs de référence de l'orosomucoïde (g/L) chez les hommes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 388)	14-18 (n= 255)	19-39 (n= 150)	40-49 (n= 156)	50-75 (n= 12)
Centile 2,5	0,46	0,43	0,48	0,43	<0,45
Centile 50	0,67	0,63	0,71	0,71	0,70
Centile 90	0,94	0,90	0,92	0,91	0,86
Centile 95	1,00	0,99	1,04	0,99	-
Centile 97,5	1,08	1,12	1,16	1,05	-

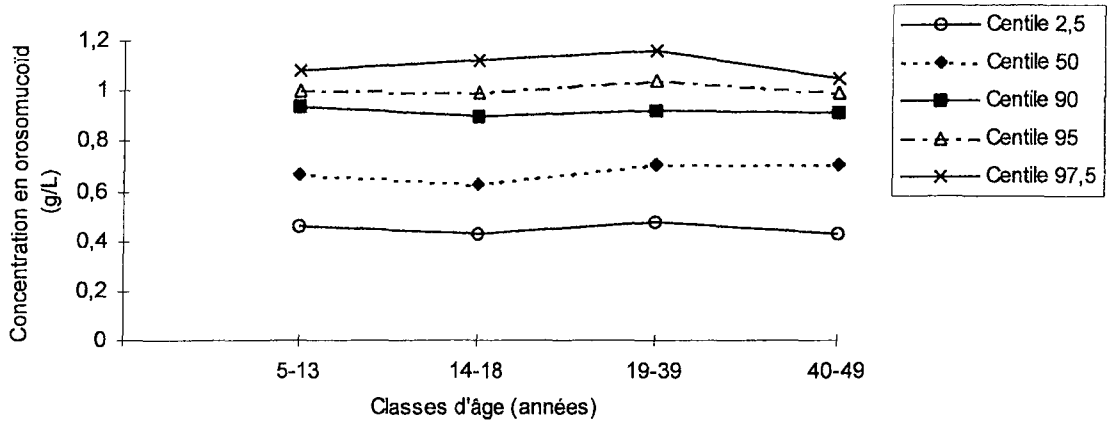

Figure 20. Médiane et dispersion des valeurs de référence de l'orosomucoïde chez les hommes

Tableaux 32. Valeurs de référence de l'orosomucoïde(g/L) chez les femmes

Classe d'âge(années)	5-13 (n= 370)	14-18 (n= 196)	19-39 (n= 175)	40-49 (n= 163)	50-75 (n= 14)
Centile 2,5	0,41	0,44	0,42	0,45	<0,50
Centile 50	0,65	0,71	0,67	0,69	0,74
Centile 90	0,92	0,91	0,91	0,92	0,90
Centile 95	1,07	1,02	0,99	0,99	-
Centile 97,5	1,16	1,09	1,05	1,07	-

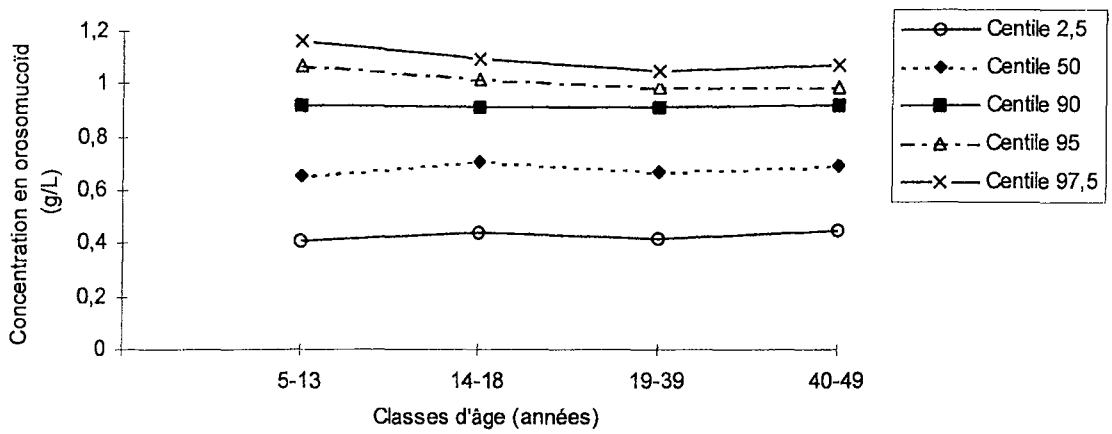

Figure 21. Médiane et dispersion des valeurs de référence de l'orosomucoïde chez les femmes

Contrairement aux 2 autres protéines, l'augmentation des médianes avec l'âge est beaucoup moins nette. L'orosomucoïde augmente de 0,67 à 0,71 g/L chez les hommes et de 0,65 à 0,74 g/L chez les femmes. La dispersion des centiles semble stable avec l'âge chez les hommes alors que chez les femmes. Elle est plus importante dans la classe d'âge des 5-13 ans avec un centile 97,5 à son maximum : 1,16 g/L puis semble diminuer avec l'âge.

IV.7. Limites de référence

A partir des valeurs de référence, nous avons déterminé les limites de référence des 3 protéines.

Tableau 33. Limites de référence (Centile 95) de la CRP (mg/L)

Classe d'âge (années)	5 à 13	14 à 18	19 à 39	40 à 49
Hommes	<1,45	<2,10	<2,70	<4,80
Femmes	<1,35	<1,50	<3,30	<3,25

Tableau 34. Limites de référence [Centile 5-Centile 95] de l'haptoglobine (g/L)

Classe d'âge (années)	5-13	14-18	19-39	40-49
Hommes	[0,12-1,00]	[0,17-1,35]	[0,36-1,70]	[0,33-1,50]
Femmes	[0,18-1,25]	[0,36-1,40]	[0,44-1,50]	[0,50-1,50]

Tableau 35. Limites de référence [Centile 5-Centile 95] de l'orosomucoïde (g/L)

Classe d'âge (années)	5-13	14-18	19-39	40-49
Hommes	[0,50-1,00]	[0,46-1,00]	[0,53-1,00]	[0,45-1,00]
Femmes	[0,45-1,10]	[0,48-1,00]	[0,48-1,00]	[0,48-1,00]

IV.8. Facteurs de variation de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde

Dans les tableaux 36 à 41 figurent les résultats des principaux paramètres influençant les variations de concentration des 3 protéines. Nous avons repris uniquement les paramètres dont les variations sont supérieures aux variations analytiques.
Nous avons repris les mêmes critères d'exclusion que ceux utilisés pour sélectionner la population de référence.

Nous avons déterminé l'amplitude de la variation observée en comparant les moyennes de chaque protéine calculées sur 2 populations définies comme ci-dessous :
selon que le facteur est quantitatif ou qualitatif,

- population dont le facteur est supérieur au seuil considéré versus population dont le facteur est inférieur au seuil considéré
- population pour laquelle le facteur étudié est présent versus population ne présentant pas le facteur étudié.

IV.8.1. CRP

Tableaux 36. Facteurs de variation de la CRP chez les hommes

Facteurs de variation	Variations observées
Leucocytes $>10.10^9$/L	+117 à +140%[1]
Consommation de tabac	+16% à +52%[1]
BMI >30 kg/m^2 chez les adultes >26 kg/m^2 chez les 15-27 ans >24 kg/m^2 chez les enfants de 5-14 ans	+90% à +121%
Prise d'antipyrétiques	+400%
Prise de médicaments à visée respiratoire	+331%

[1] selon l'âge

Tableaux 37. Facteurs de variation de la CRP chez les femmes

Facteurs de variation	Variations observées
Leucocytes >10.10^9/L	+137% à +270%[1]
BMI >30 kg/m^2 chez les adultes >26 kg/m^2 chez les 15-27 ans >24 kg/m^2 chez les enfants de 5-14 ans	+80% à +171%
Prise de contraceptifs oraux	+88%
Prise d'anti-inflammatoires	+390%
Prise d'antibiotiques	+365%
Glycémie > 6,1 mmol/L	+32%
Hémoglobine < 120 g/L	+156%
Prise de médicaments à visée respiratoire	+190%

[1] selon l'âge

IV.8.2. Haptoglobine

Tableaux 38. Facteurs de variation de l'haptoglobine chez les hommes.

Facteurs de variation	Variations observées
Leucocytes >10.10^9/L	+3% à +50%[1]
Plaquettes <150.10^9/L	+60%
Consommation de tabac	+25% à +36%[1]
Apo B >1,40 g/L	+23%
Glycémie >6,1 mmol/L	+6%
Printemps	-19%
Prise d'anti-histaminiques	-30%
Prise d'antalgiques	+124%
Triglycérides >1,8 mmol/L	+10%

[1]selon l'âge

Tableaux 39.Facteurs de variation de l'haptoglobine chez les femmes.

Facterurs de variation	Variations observées
Leucocytes >10.10^9/L	+19% à +36%[1]
Plaquettes <150.10^9/L	+12% à +18%[1]
BMI >30 kg/m^2 chez les adultes >26 kg/m^2 chez les 15-27 ans >24 kg/m^2 chez les enfants de 5-14 ans	+10 à +36%[1]
Apo AI <1,10 g/L	+25%
GGT >100 UI/L	+22%
Consommation de tabac	+9% à +21%[1]
Prise de cardiotoniques	+38%
Prise d'antibiotiques	+41%
Prise d'anti-inflammatoires	+46%

[1]selon l'âge

IV.8.3 Orosomucoïde

Tableaux 40. Facteurs de variation de l'orosomucoïde chez les hommes.

Facteurs de variation	Variations observées
Leucocytes >10.10^9/L	+23%
BMI >30 kg/m^2 chez les adultes >26 kg/m^2 chez les 15-27 ans >24 kg/m^2 chez les enfants de 5-14 ans	+5 à +17%[1]
Plaquettes <150.10^9/L	+25%
Triglycérides >1,8 mmol/L	+24%
PAD >160 mmHg	+27%
Prise d'antalgiques	+38%

Tableaux 41. Facteurs de variation de l'orosomucoïde chez les femmes.

Facteurs de variation	Variations observées
Leucocytes>10.10^9/L	+3% à +30%[1]
Plaquettes <150.10^9/L	+5% à +19%[1]
BMI >30 kg/m^2 chez les adultes	
>26 kg/m^2 chez les 15-27 ans	+7%
>24 kg/m^2 chez les enfants de 5-14 ans	
Apo AI <1,10 g/L	+26%
GGT >100 UI/L	+10%
TGP >70 UI/L	+10%
Hémoglobine <120 g/L	+10% à +16%[1]
Prise de contraceptifs oraux	-14%
Prise de médicaments à visée respiratoire	+24%

[1] selon l'âge

Ainsi, l'influence d'une hyperleucocytose (>10.10^9/L) sur la concentration de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde est variable selon le sexe et l'âge. L'augmentation de la CRP par rapport à une normocytose varie entre 117% chez les hommes et 270% chez les femmes. Pour l'haptoglobine, l'augmentation est comprise entre 3 et 36% et pour l'orosomucoïde entre 3 et 30%.

C'est bien sûr avec la CRP que les augmentations sont les plus importantes en raison de sa plus grande sensibilité à l'inflammation.

Les paramètres associés aux plus grandes augmentations des protéines sont les médicaments avec notamment les anti-pyrétiques et les anti-inflammatoires dont la présence peut-être associée à une augmentation de la concentration en CRP de près de 400%.

L'apolipoprotéine B est associée à des variations de l'haptoglobine chez les hommes. L'apolipoprotéine AI est associée à des variations de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde chez les femmes. Dans un cas, l'augmentation de l'apolipoprotéine B est associée à une augmentation de la concentration de l'haptoglobine, dans un autre cas, la baisse de l'apolipoprotéine AI est associée à une augmentation de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde.

IV.9. Synthèse des variations analytiques et biologiques des 3 protéines

A partir des résultats des tableaux 36 à 41 sur les principales sources de variations des protéines de l'inflammation et des données issues de la littérature, nous avons rassemblé les principaux facteurs préanalytiques, analytiques et biologiques agissant sur la concentration des 3 protéines.

Nous n'avons pas fait figurer les variations dues à des pathologies inflammatoires ou infectieuses.

IV.9.1. CRP (tableau 36 et 37)

-Variations préanalytiques et analytiques

Macy et coll (*29*) ont montré que la CRP était stable au cours de cycle de congélation/décongélation que l'échantillon soit du sérum ou du plasma.

Par contre, la concentration en CRP peut être modifiée selon la nature de l'échantillon. Ainsi, pour des concentrations de CRP inférieures à 1 mg/L, la concentration mesurée dans un plasma citraté est plus faible de 10% et celle EDTA plus forte de 7% par rapport au sérum (29).

La concentration de CRP avec le réactif N latex CRP mono n'est influencée ni par la bilirubine jusqu'à une concentration de 205 mg/L, ni par l'hémoglobine jusqu'à une concentration de 36 g/L, ni par les triglycérides jusqu'à une concentration de 26 g/L, ni par le facteur rhumatoïde jusqu'à 2050 UI/ml et ni par la paraprotéine Ig M jusqu'à 76 g/L.(*30*).

Bruguerolle et coll *(31)* dans une étude sur les rythmes circadiens des protéines de l'inflammation chez les sujets sains n'ont pas mis en évidence de rythme circadien de la CRP. Ces résultats doivent , selon les auteurs, toutefois être nuancés en raison de la sensibilité de la technique de dosage utilisée, de la saison au cours de laquelle a été effectuée l'étude et également de l'absence de détection dans les valeurs basses correspondant à la limite inférieure de sensibilité.

Le coefficient de variation analytique est inférieure à 3,5% avec le réactif N latex CRP mono sur le BN II.

-Variations biologiques

-Age

Les résultats que nous avons obtenus figurent dans les tableaux 27 et 28. Nous avons clairement mis en évidence l'augmentation des valeurs de référence avec l'âge. Nous ne disposons pas de valeurs avant 5 ans, mais Malvy et coll (*32*) ont étudié les valeurs de la CRP chez des enfants et notamment avant l'âge de 5 ans . Chez 31 enfants âgés de 3 à 5 ans, la médiane de la CRP est de 3 mg/L avec un intervalle de 3 à 15 mg/L, là encore les résultats doivent être nuancés compte tenu de la technique de dosage utilisé qui n'est pas une technique dite ultrasensible.

La CRP peut être détectée et mesurée dans le sang fœtal (*33*). Chez des fœtus dont la mère n'a pas subi de rupture prématuré des membranes, la concentration moyenne en CRP est inférieure à 6 mg/L

-Sexe

Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la médiane de la distribution de la CRP est pratiquement la même entre les 2 sexes jusqu'à 39 ans, ensuite elle augmente de 10% chez les hommes (+10%) de 40-49 ans et de 14% chez les 50-75ans.

-Variabilité intra-individuelle

Macy et coll (*29*) ont dosé la CRP chez 26 individus en bonne santé toutes les 3 semaines pendant 6 mois. Ils ont montré que la concentration en CRP était stable chez chaque individu. Ainsi, lorsque la concentration est supérieure aux valeurs habituelles (mais inférieure à 10 mg/L) au départ de l'étude, celle-ci n'évolue pas de façon significative pendant les 6 mois.

-Glucose et hémoglobine

Ces 2 paramètres biologiques sont associés à des variations de la concentration en CRP.
Dans notre étude, une diminution de l'hémoglobine en dessous de 120 g/L peut être associée à une augmentation de la CRP de 156%, par contre une augmentation de la glycémie (>5,5 mmol/L) est associée à une augmentation de la CRP (+132%)

Mendall et coll (*34*) ont étudié la relation qu'il pouvait exister entre la CRP et quelques facteurs de risque cardiovasculaire. Parmi ces facteurs, ils ont inclu la glycémie et il est apparu que la concentration en CRP est significativement liée à la glycémie. ($p<0,01$). De même, l'étude de Schalkwik (*35*) a montré que la médiane de la CRP est significativement plus élevée chez des patients atteints de diabète de type I que chez des sujets témoins (respectivement 1,20 et 0,51 mg/L). Les auteurs expliquent cette augmentation par un dysfonctionnement des cellules endothéliales.

-Contraceptifs oraux et traitement hormonal de la ménopause

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de la CRP chez les femmes traitées par des contraceptifs oraux (+88%). Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Ricoux et coll (*36*). Leur travail a consisté à étudier la concentration plasmatique de la CRP chez des patientes en situation de forte imprégnation estrogénique et dans ces conditions, il n'a pas été mis en évidence d'augmentation de la concentration plasmatique en CRP.
Il n'apparaît pas d'explication claire à cette contradiction. Cependant dans un cas, les oestrogènes sont utilisés seuls ou associés à des progestatifs dans un but anticonceptionnel et à long terme. Dans un autre cas, le traitement estrogénique est utilisé dans le cadre d'une fécondation in-vitro dont la durée ne dépasse pas 15 jours.
Dès lors, nous pouvons penser que l'augmentation de la concentration en CRP est dépendante de la durée du traitement à base d'estrogènes.

Ridker (*37*) a mis en évidence que la médiane de la CRP est doublée chez les femmes prenant un traitement hormonal de la ménopause par rapport à des femmes de même âge n'en prenant

pas. (respectivement 2,7 et 1,4 mg/L, p<0,001). De plus, la médiane de la CRP est plus élevée chez les femmes prenant des oestrogènes seuls (p=0,003) par rapport à des femmes prenant des oestrogènes associés à des progestatifs (p=0,03). Le mécanisme par lequel le traitement hormonal de la ménopause modifie les paramètres de l'inflammation n'est pas encore déterminé.

Ici encore, il est légitime de penser que l'augmentation de la concentration en CRP peut-être associée à la durée du traitement, mais aussi que cette augmentation est freinée quand un progestatif est associé.

Hak et coll (*38*) ont constaté une augmentation de la concentration en CRP de 15 % avec la ménopause. Après ajustement avec l'âge et le BMI, cette augmentation n'est plus que de 10%.

-Grossesse

Notre étude ne nous a pas permis d'étudier l'effet de la grossesse sur la concentration en CRP. Watts et coll *(30)* ont montré que la concentration en CRP est augmentée chez les femmes enceintes par rapport à des femmes non enceintes, que la concentration augmente durant la grossesse et qu'elle est encore plus élevée pendant l'accouchement. La médiane et le centile 95 de la CRP chez des femmes enceintes sont respectivement de 8 et 15 mg/L. Durant le travail, la médiane est de 13 mg/L et 32% des femmes ont une concentration supérieure à 15 mg/L (le centile 95 de la population contrôle est de 10 mg/L).

Dans une autre étude, Szpakowski et coll (*40*) ont également mis en évidence une augmentation de la concentration de la CRP (dosage immunoturbidimétrique) durant la grossesse et l'accouchement par rapport à des femmes non enceintes. La concentration en CRP des femmes enceintes (n=33) est comprise entre 1,5 et 15 mg/L avec une médiane de 2 mg/L et un centile 95 de 12 mg/L. Pendant l'accouchement, la concentration en CRP est comprise entre 1,5 et 27 mg/L avec une médiane de 8 mg/L et un centile 95 de 19 mg/L. La concentration en CRP est significativement plus élevée pendant le travail que pendant la grossesse (p<0,001).

Par contre, Nielsen et coll (*41*) ont montré que la grossesse et l'âge gestationnel ne sont pas associés à une augmentation de la concentration en CRP, ces résultats ont été obtenus à partir d'une étude longitudinale de 60 femmes enceintes sans complication obstétricale. Dans cette étude, le centile 95 est de 20 mg/L, valeur que les auteurs ont considérée comme limite haute de la normale.

Le choix de cette limite pourrait expliquer l'absence d'augmentation de la CRP pendant la grossesse constatée par ces auteurs.

-BMI

La CRP augmente jusqu'à 121% chez les hommes ayant une surcharge pondérale et jusqu'à +171% chez les femmes par rapport à des témoins (la limite du BMI est fixée à 30 kg/m^2 chez l'adulte, à 26 kg/m^2 chez les 14-18 ans et à 23 kg/m^2 chez les moins de 14 ans).
Les résultats de Yudkin (42) et Hak (38) vont également dans le même sens. Dans la première étude, il a été montré que chez des sujets sains la concentration en CRP était corrélée positivement avec l'obésité. Dans la seconde, la concentration en CRP a été mesurée chez des femmes d'âge moyen et il apparaît que sa concentration augmente avec le BMI, le tour de taille, les triglycérides, le HDL-cholestérol, la pression artérielle. Les auteurs de cette dernière publication ont suggéré que les adipocytes des individus ayant une surcharge pondérale produisent une grande quantité de TNF-α (Tumor Necrosis Factor). Le TNF-α induit la production d'IL-6 (Interleukine-6), cytokine à l'origine de la régulation de la synthèse de la CRP (*43,44,45*).

-Consommation de tabac

Le tabac est associé à une augmentation de la CRP. Les résultats de notre étude (augmentation de +16 à +52%) vont dans le même sens que ceux de Palosuo et coll. (*46*) qui observent une augmentation en CRP de 20% chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Par contre, Yudkin et coll (*42*), en fixant un seuil de 1,35 mg/L pour séparer les individus à forte et à basse concentration en CRP, n'ont pas mis en évidence de différence significative d'effectif entre les individus non-fumeurs, anciens fumeurs et fumeurs (p=0,17).

-Activité physique

L'activité physique et notamment les efforts sportifs intenses entraînent une augmentation de la CRP. Strachan et coll (*47*) ont mis en évidence des petites augmentations de la CRP après une course à pied de 21 km. Par contre après une course de 88 km, la concentration est multipliée par 45 ce que les auteurs comparent à un petit infarctus du myocarde.

IV.9.2. Haptoglobine (tableaux 38 et 39)

-Variations préanalytiques et analytiques

Bruguerolle et coll (*31*) ont mis en évidence une variation circadienne de l'haptoglobine, l'étude consistait à réaliser chez 14 sujets sains des prélèvements veineux toutes les 4 heures pendant 24 heures. L'acrophase de l'haptoglobine se situe à 8 heures ($p<0,06$) avec un mésor de 1,24±0,05 g/L.

Il faut éviter les sérums hémolysés car l'hémoglobine libre se fixe sur l'haptoglobine ce qui entraîne une chute de sa concentration.

Le coefficient de variation de la technique de dosage que nous avons utilisé est de 6%.

-Variations biologiques

-Age

L'étude de Kanakoudi et coll (*48*) s'est attachée, entre autres, à déterminer les concentrations de l'haptoglobine chez des nouveau-nés à terme et prématures. Les mesures ont été réalisées chez 395 nouveau-nés (âge gestationnel de 26 à 41 semaines) 24 heures après la naissance, à 1 mois (n=171), 3 mois (n=155), et 6 mois (90). Les concentrations mesurées chez 250 adultes sains ont été prises comme valeurs de référence. La concentration en haptoglobine est plus faible chez les nouveau-nés prématures que les nouveau-nés à terme. (A 1 mois chez les nouveau-né à terme, la médiane est de 0,48 g/L et le centile 95 est de 1,08 g/L. Toujours à 1 mois mais chez les prématures, la médiane est 0,45 g/L et le centile 95 est de 0,85 g/L. La concentration augmente progressivement jusqu'à 6 mois, âge où la concentration est la même que celle d'un adulte.

A partir de 6 ans, les résultats figurent dans les tableaux 31 et 32.

-Sexe

Dans notre étude, il apparaît en comparant les médianes des 2 sexes que les femmes ont une concentration en haptoglobine toujours plus élevée que les hommes. La différence est d'environ 35% de 5 à 18 ans, puis de 10% de 19 à 49 ans et ensuite de 23 % pour les 50-75 ans.

-Tabac

Le tabac est associé à une augmentation de l'haptoglobine chez les hommes (+25 à +36% selon l'âge) et chez les femmes (+12% à +18%).
Ce résultat est confirmé chez les enfants par l'étude de Shima *(49)* qui a mis en évidence une augmentation de leur concentration en haptoglobine s'ils vivent dans un environnement des fumeurs par rapport à des enfants dont les parents ne fument pas.
Toutefois, cette élévation de la concentration en haptoglobine chez les fumeurs ne semble pas toujours être mise en évidence. C'est ainsi que Das (*50*) n'a pas constaté d'augmentation de la concentration en haptoglobine chez les fumeurs par rapport à des non-fumeurs.

-Glycémie

Chez les hommes, l'hyperglycémie est associée à une augmentation de l'haptoglobine de +6% (en comparant la concentration des individus ayant une glycémie >5,5 mmol/L et ceux ayant une glycémie <5,5 mmol/L). Ces résultats sont confirmé par Mc Millian (*51*) qui a observé que de nombreux paramètres de l'inflammation sont augmentés et notamment l'haptoglobine.

-Saison de la consultation

Les résultats que nous avons trouvé serait en faveur d'une variation de la concentration en haptoglobine en fonction de la saison, elle serait plus faible de 19% au printemps par rapport aux autres saisons.
Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Frohlich et coll (*52*).

Dans leur étude sur les variations saisonnières des paramètres hémostatiques et rhéologiques et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, ils n'ont pas mis en évidence de variations significatives de l'haptoglobine selon la saison. Il est important de noter que le façon de mener cette étude est tout à fait différente de la notre car dans leur étude, les volontaires sains recrutés ont été revus pendant un an à raison d'une visite par mois.

-BMI

Nous avons mis en évidence, en prenant les mêmes valeurs-seuils de BMI que pour la CRP, une augmentation de +36% de l'haptoglobine chez les femmes par rapport à des témoins.

- Apolipoprotéines

La relation entre concentration en apolipoprotéines et haptoglobine est différente suivant le sexe. Ainsi chez les hommes, une augmentation des Apo B (>1,35 g/L) est associée à une augmentation de l'haptoglobine (+23%). Chez les femmes, il est observé une augmentation de +25% de l'haptoglobine quand la concentration en Apo A1 est inférieure à 1,10g/L.

-Plaquettes

Une numération plaquettaire supérieure à 500.10^6/L est associée à une augmentation de 12 à 18% en fonction de l'âge de l'haptoglobinémie chez les femmes et de 60% chez les hommes.

-Triglycérides

L'hypertriglycéridémie (>1,80 mmol/L) s'accompagne d'une augmentation de 10% de la concentration en haptoglobine chez les hommes.

-Déficit congénital

Il a été mis en évidence des cas de déficit en haptoglobine, cette affection touche notamment 3% des sujets de race noire.

IV.9.3. Orosomucoïde (tableaux 40 et 41)

-Variations analytiques et préanalytiques

Dans l'étude de Bruguerolle (*31*), il a été mis en évidence un rythme circadien de l'orosomucoïde ($p<0,001$). L'amplitude est de 6,4 (2,8 ; 10,4) g/L et l'acrophase se situe vers 11h30.

Les sérum hémolysés et hyperlipémiques sont à rejeter en raison d'une interférence possible avec les techniques de dosage néphélémétrique et turbidimétrique (*53, 17*).

Concernant les variations analytiques, nous avons mesuré un coefficient de variation de 5%.

-Variations biologiques

-Age

Dans l'étude de Kanakoudi et coll (*48*), de la naissance jusqu'à 6 mois, la concentration en orosomucoïde est plus faible chez les nouveau-nés prématures que les nouveau-nés à terme ($p<0,05$). La médiane de l'orosomucoïde à la naissance est plus faible de 14% chez les nouveau-nés prématuré par rapport aux nouveau-nés à terme. Cette différence est de 9% à 1 mois, de 16% à 3 mois et de 19% à 6 mois.

La concentration en orosomucoïde est plus faible chez les nouveau-nés que chez l'adulte de la naissance jusqu'à 3 mois ($p<0,001$). La différence entre les médianes est de 66 % à la naissance, 42 % à 1 mois, 19% à 3 mois et 15% à 6 mois.

Les résultats de l'étude de Malvy et coll (*32*) sur la concentration de l'orosomucoïde entre 3 et 5 ans donnent une médiane de 0,97 g/L et un intervalle de 0,63 à 2,59 g/L.

A partir de 5 ans, nous disposons des résultats de notre étude. Il apparaît que la concentration est relativement stable avec l'âge et aurait plutôt tendance à légèrement diminuer chez les femmes.(Centile 97,5 entre 5 et 13 ans : 1,19 g/L et entre 50 et 75 : 0,97 g/L).

-Sexe

Nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence une différence significative entre la concentration en orosomucoïde des hommes et des femmes. Ceci est en accord avec l'étude de Denko (*54*).

-BMI

Comme pour la CRP et l'haptoglobine, l'augmentation du BMI est associée à des concentrations plus élevées en orosomucoïde (+17% chez les hommes et +7% chez les femmes).

-Triglycérides

Des concentrations en triglycérides supérieures à 1,8 mmol/L sont associées à une augmentation de l'orosomucoïde de +24%.

-PAD

Une PAD supérieure à 160 mmHg est associée à une augmentation de +27% de l'orosomucoïde.

-Apolipoprotéine A1

La diminution de l'apoA1 (<1,10 g/L) est associée à une augmentation de 26% de l'orosomucoïde.

-Enzymes hépatiques et maladies hépatiques

L'orosomucoïdémie est augmentée de 10% en cas d'élévation des enzymes hépatiques : GGT>70 UI/L et TGP>70 UI/L.

Pour Perier et coll (*55*), l'orosomucoïde chez les alcooliques chroniques est un excellent marqueur du stade de déficience hépatique : la concentration en orosomucoïde augmente au stade inflammatoire de la réaction (+75%) alors qu'elle diminue durant l'insuffisance hépatique (-28%).

-Grossesse, prise de contraceptifs oraux

Au cours de la grossesse, la concentration de l'orosomucoïde diminue de 20 à 30% (*56, 57*). Cette baisse est liée à l'augmentation du volume de l'eau de rétention intracellulaire et du volume plasmatique, sans augmentation de synthèse hépatique.

Nous avons mis en évidence que la prise de contraceptifs oraux était associée à une diminution de l'orosomucoïdémie de 14% ce qui est en accord avec l'étude d'Herbeth et coll (*57*).

-Hémoglobine

A une diminution de l'hémoglobine (inférieure 120 g/L) est associée chez les femmes une augmentation de la concentration en orosomucoïde de 10 à 16% suivant l'âge.

IV.10. CRP et indice de risque cardiovasculaire

IV.10.1. Risque de morbidité coronarienne

A partir du modèle de risque multifactoriel de Laurier (*26*) dont les paramètres sont l'âge, le sexe, la PAS, la consommation de cigarettes, le diabète, le cholestérol, le HDL-cholestérol, et l'hypertrophie ventriculaire gauche, nous avons calculé un indice de risque cardiovasculaire chez les individus hommes et femmes âgés de 40 à 49 ans de notre population d'étude.
Nous avons exclu les individus traités par des antihypertenseurs et/ou des hypocholestérolémiants, soit 53 hommes et 19 femmes.

Le risque de morbidité coronarienne est estimé sur les 8 prochaines années et traduit le risque de survenu d'un événement coronarien. Les individus sont considérés à haut risque s'ils appartiennent au groupe supérieur au centile 80.

Tableau 42. Risque de morbidité coronarienne estimé à 8 ans par le modèle de Laurier des hommes et des femmes de 40 à 49 ans

	Risque estimé à 8 ans (%)	
	Hommes (n=465)	Femmes (n=360)
Moyenne	1,92	0,51
Médiane	1,57	0,33
Centile 80	**2,89**	**0,76**
Centile 95	4,72	1,39

Le risque correspondant au centile 80 est de 2,89 % chez les hommes et de 0,76 % chez les femmes sur 8 ans. En nombre d'évènements attendus, il se traduit par 13 chez les hommes et 3 chez les femmes.

Ce seuil nous a servi à partager notre population en individus à haut risque cardiovasculaire et individus à risque modéré.(*58*)

IV.10.2. Comparaison de la concentration en CRP entre population à haut risque et population à risque modéré

Après avoir séparé notre population suivant le risque cardiovasculaire, nous avons déterminé la concentration moyenne en CRP de chaque sous-population (tableau 42).
La distribution de la concentration en CRP étant non gaussienne, nous avons utilisé les moyennes géométriques calculées à partir des moyennes logarithmiques.

Tableau 42. Comparaison de la concentration en CRP entre sujets à haut risque et sujets à risque modéré

	CRP (mg/L)			
	Hommes		Femmes	
	Risque modéré (n=376)	Haut risque (n=89)	Risque modéré (n=292)	Haut risque (n=68)
Moyenne géométrique m (m-SD ; m+SD)	0,96(0,32-2,88)	1,33(0,51-3,48)	0,78(0,26-2,34)	1,20(0,41-3,52)

La concentration en CRP des individus à haut risque est supérieure à celle des individus à risque modéré ($p<0,001$).
La concentration moyenne en CRP des hommes à haut risque est supérieure à celle des femmes à haut risque: 1,33 et 1,20 mg/L.

Les résultats montrent qu'il existe un lien entre une concentration élevée en CRP et l'appartenance au groupe à haut risque. La CRP pourrait donc être considérée comme un élément de l'évaluation du risque cardiovasculaire. Il faut garder à l'esprit que la distribution des valeurs de la CRP pour les 2 groupes se chevauchent. Résultat qui d'un point de vue épidémiologique n'est pas contestable, en revanche d'un point de vue individuel, l'interprétation doit être examinée au cas par cas.

Discussion

V. Discussion

La réaction inflammatoire constitue un mécanisme de défense aspécifique de l'organisme à l'égard d'une agression tissulaire dont les origines peuvent être multiples : infectieuse principalement, mais aussi tumorale, immunitaire, traumatique, nécrotique (brûlures, irradiations, infarctus). Outre une réponse locale, dont le mécanisme est de mieux en mieux connu, une réaction générale se caractérise par une variation sensible de la concentration sanguine de certaines protéines d'origine hépatique.

La concentration des protéines de l'inflammation peut augmenter de façon significative en cas d'inflammation modérée donc le résultat des dosages est soumis à une grande variabilité. Pour interpréter un résultat, il est nécessaire de connaître les paramètres susceptibles de modifier les valeurs des concentrations mais également de connaître les valeurs de ces protéines en absence de toute source de variation. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à produire les valeurs de référence de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde.
Valeurs de référence, qui après revue de la littérature, n'avaient jamais été déterminées pour les 3 protéines réunies, sur une population saine d'un effectif aussi important et dont de nombreux paramètres biologiques, physiologiques ou les habitudes comportementales sont connus.
De plus, les valeurs de référence de la CRP ont été produites à partir d'une nouvelle technique de dosage immunonéphélémétrique ultrasensible.

V.1. Validation de la technique de dosage

La technique de dosage des 3 protéines est une technique immunonéphélémétrique largement utilisée en biologie clinique.
Nous avons vérifié les performances de celle-ci en réalisant des essais de répétabilité, de reproductibilité, d'exactitude et de linéarité.

L'essai de répétabilité a permis de déterminer un coefficient de variation inférieure à 3,4% pour la CRP, inférieure à 5,2% pour l'haptoglobine et inférieure à 4,4% pour l'orosomucoïde. Ces résultats sont proches de la littérature : Le Carrer (*59*) a obtenu un coefficient de moins de

5% pour la CRP (technique immunonéphélémétrique, Behring Néphélomètre Automatique). Clark (*60*) a mesuré un coefficient de variation de 4,1% pour la CRP, 2,6% pour l'haptoglobine et 2,0% pour l'orosomucoïde (technique immunoturbidimétrique, Cobas Fara, ROCHE).

Le coefficient de variation de l'essai de reproductibilité est toujours inférieure à 5% pour la CRP et orosomucoïde et inférieure à 6% pour l'haptoglobine. Nos résultats sont proches de ceux de la littérature : Le Carrer (*59*) a mesuré un coefficient de 4,5% pour la CRP, Macy et coll (*29*) 6,8% pour la CRP (technique ELISA).

La sensibilité du dosage de la CRP est donnée par la limite inférieure de la courbe d'étalonnage, et dépend de la concentration en CRP du standard (concentration habituelle voisine de 21,5 mg/L). Dans ces conditions conditions, le seuil de sensibilité type pour la CRP est de 0,175 mg/L pour une dilution au 1/20 des échantillons.
Les valeurs de la CRP inférieure au seuil de 0,175 mg/L ont été arbitrairement notées 0,17 mg/L.
Cette différence de seuil peut finalement être à l'origine de différence dans le calcul des moyennes.

La sensibilité de la technique de dosage de la CRP dépend essentiellement de la technique utilisée.
Dans l'étude de le Carrer (*59*), le seuil de détection est nettement supérieur au notre (0,6 pour 0,175 mg/L). Il faut noter que le dosage a été réalisé sur BNA par une technique immunonéphélémétrique (NA coffret latex CRP, référence OUSV). Cette technique n'est pas une technique dite ultra-sensible.
D'autres techniques permettent de descendre le seuil de détection à des valeurs plus basses comme la radioimmunologie ou des techniques ELISA. Macy et coll (*29*) ont développé une technique ELISA pour le dosage de la CRP. L'échantillon de leur étude est constitué de 143 donneurs de sang âgés de 18 à 67 ans (69 femmes et 74 hommes). La limite de détection de la technique a été estimée à 0,007 mg/L.

Ribeiro (*2*) a également utilisé une technique ELISA pour déterminer la concentration en CRP. La limite de détection par cette technique est de 0,0009 mg/L.

V.2. Critères de choix des paramètres étudiés sur la population

Les résultats des tableaux 5 et 6 concernant la description de l'ensemble des paramètres étudiés sur la population ne décèlent pas de pathologie particulière.
L'interrogatoire pratiqué lors du recrutement a permis également d'exclure les pathologies aiguës et/ou chroniques (tuberculose, cardiopathie ischémique,...).

Le but est de rechercher si ces paramètres sont à associés à des variations de concentration de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde afin de sélectionner une population de référence dont les paramètres ne sont pas liés à ces variations.
Sachant que ces 3 protéines sont des protéines de l'inflammation, il nous fallait pouvoir exclure les individus avec un état inflammatoire.

C'est pourquoi, nous avons étudié les paramètres biologiques connus pour être perturbés en cas d'inflammation (exemple : les leucocytes, les enzymes hépatiques) ou connus pour être associés à un risque cardiovasculaire (exemple : le cholestérol, les triglycérides, les apolipoprotéines).
La prise de certaines classes médicamenteuses peut renseigner sur la présence d'un état inflammatoire (exemple : les antibiotiques, les antipyrétiques, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires) ou sur la présence d'un risque cardiovasculaire sous-jacent (exemple : les anti-hypertenseurs, les hypolipémiants, les anti-arythmiques).
La consommation de tabac reste connue pour être associée à un état inflammatoire (*46*).
Nous nous sommes également intéressés à la saison pendant laquelle les individus de notre population ont été recrutés. En effet, le risque d'être malade et donc d'avoir un état inflammatoire est plus grand pendant les saisons froides.

Finalement, les facteurs de variation peuvent être classés en 3 grandes catégories

- ♦ facteurs témoins d'un risque cardiovasculaire
  - environnementaux : consommation de tabac, d'alcool, prise de contraceptifs oraux
  - métaboliques : poids, indice de masse corporelle, pression artérielle
  - biologiques : cholestérol, triglycérides, Apolipoprotéines AI et B, glucose
  - médicaments : anti-hypertenseurs, anti-arythmiques, analeptiques cardiaques, hypolipémiants
- ♦ facteurs témoins d'une infection et/ou d'un état inflammatoire
  - biologiques : leucocytes, plaquettes, hémoglobine
  - médicaments : anti-inflammatoires, antihistaminiques, thérapeutiques respiratoires, antipyrétiques, antibiotiques.
- ♦ Autres
  - ALAT, ASAT, GGT
  - Age, sexe
  - Saison

V.3. Validité des résultats des dosages de la CRP, de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde sur la population d'étude

V.3.1. CRP

Sur le graphique montrant la distribution du nombre d'individus en fonction de la concentration en CRP, nous avons dénombré 76 sujets avec une concentration supérieure à 10 mg/L (soit 2,01% de la population), seuil habituellement admis comme synonyme d'un état inflammatoire (*61,46*)(Nous verrons plus loin que ce seuil peut à la suite de nos résultats être reconsidéré). Cent cinquante six individus ont une concentration en CRP supérieure à 5 mg/L (soit 7,0 %).
Nous avons mis en évidence que la moyenne en CRP augmente avec l'âge, chez les hommes de 1,04 mg/L à 1,87 mg/L et chez les femmes de 1,02 mg/L à 2,02 mg/L. (différence significative selon les tranches d'âge sans tenir compte du sexe au seuil de $p<0,05$). En comparant avec les résultats de la littérature, cette augmentation de la concentration avec l'âge a également été montrée par le Carrer (*59*), Ribeiro (*2*), Kindmark (*62*).

Les résultats sont les résultats bruts, avant toute sélection. Si nous les comparons avec ceux obtenus par Le Carrer (*59*), la moyenne que nous avons obtenu est légèrement supérieure. La population utilisée est une population issu d'un centre de médecine préventive. Il s'agit d'adultes cliniquement sains, non fumeurs, et ne présentant pas d'anomalie évocatrice d'un syndrome inflammatoire préexistant (vitesse de sédimentation globulaire normale et absence d'anomalie de la numération formule sanguine). L'échantillon est composé de 228 sujets adultes de 20 à 70 ans : 113 hommes et 115 femmes. La méthode de dosage est également néphélémétrique et a permis de déterminer une moyenne de 0,95 mg/L pour les hommes et 1,25 mg/L pour les femmes. Tout comme notre étude, il trouve une concentration en CRP supérieure chez les femmes à celle des hommes.

Dans l'étude brésilienne de Ribeiro (*2*), l'échantillon est composé de 125 enfants de 1 à 14 ans et de 165 donneurs de sang . La moyenne et la médiane sont respectivement de 1,6 mg/L et de 0,45 mg/L chez les enfants et de 4,86 et 1,80 mg/L chez les adultes (technique ELISA). La moyenne des enfants et des adultes est à nouveau plus élevée que celle que nous avons

déterminé, laissant suggérer la présence d'infections subaiguës ou d'un état inflammatoire sous-jacent sans symptôme clinique évident par rapport à une population européenne. Il est également intéressant de noter que la CRP a été détectée dans tous les sérums analysés, c'est à dire que la limite de détection n'a jamais été atteinte.

Kindmark (*62*) dans une étude suédoise a mesuré des concentrations moyennes de 0,17 mg/L chez les enfants et de 0,47 mg/L chez les adultes (technique turbidimétrique), valeurs nettement inférieures à 1,65 mg/L chez les enfants et à 4,85 mg/L chez les adultes de l'étude de Ribeiro.

V.3.2. Haptoglobine

La distribution du nombre d'individus en fonction de la concentration en haptoglobine de notre population de départ est comprise entre 0,2 et 5 g/L. Si nous prenons comme seuil d'un état inflammatoire la concentration de 2,2 g/L (*63*), 53 individus ont un état inflammatoire sous-jacent soit 1,4%.

Avant sélection, la concentration moyenne de l'haptoglobine augmente avec l'âge de 0,56 g/L à 1,07 g/L chez les hommes et de 0,73 à 1,07 g/L chez les femmes. Clark (*60*) a déterminé une concentration moyenne en haptoglobine de 1,02 g/L à partir d'un échantillon de 19 volontaires sains : 9 hommes âgés de 24 à 76 ans et 10 femmes âgés de 20 à 46 ans. Dans la classe d'âge de notre étude qui serait équivalente à celle utilisée par Clark, la concentration mesurée est légèrement supérieure en raison probablement de l'absence de sélection et donc de la présence d'individus avec un état inflammatoire sous-jacent.

V.3.3. Orosomucoïde

La concentration de l'orosomucoïde dans l'ensemble de la population est comprise entre 0,2 et 2,8 g/L et est stable avec l'âge.
La valeur habituellement admise comme décisionnelle d'un état inflammatoire est de 1,4 g/L. Dans ces conditions, la population de notre étude comporte 35 individus avec des valeurs

pathologiques soit 0,9%. Les moyennes de notre étude sont proches de celles déterminées par Clark (*60*) : 0,796 g/L.
Herbeth et coll (*57*) n'ont pas mis en évidence de différence significative de la concentration en orosomucoïde entre 4 et 60 ans.

V.4. Analyse de régression multiple

L'analyse de régression multiple comporte de nombreux avantages pour la détermination des valeurs de référence :

- elle permet d'identifier les paramètres modifiant de façon significative les concentrations des protéines
- elle permet de classer ces paramètres selon leur poids respectif sur la variance totale

Parmi les paramètres que nous avons étudié, il faut distinguer ceux qui sont associés à un état infectieux : les antibiotiques, les leucocytes ; à un état inflammatoire : les antalgiques, la consommation de cigarettes et à un risque cardiovasculaire : le cholestérol, les triglycérides, la PAS ou bien la glycémie. Mais cette classification reste théorique car il est connu qu'il existe un désordre inflammatoire associé au risque cardiovasculaire et qu'un état infectieux entraîne une réaction inflammatoire.

Ces paramètres expliquent de 16 à 40 % des variations de la CRP, de 10 à 25% des variations de l'haptoglobine et de 8 à 35% des variations de l'orosomucoïde.
Si ces paramètres expliquent une part plus ou moins importante des variations des protéines, une autre partie de ces variations reste inexpliquée. Ils ne suffisent pas expliquer l'ensemble des variations des protéines, soit il en existe d'autres que nous n'avons pas étudié soit l'ensemble des variations n'est pas explicable par des paramètres connus.
De nombreux paramètres sont en commun avec les 3 protéines, comme le BMI, les leucocytes ou bien certaines classes médicamenteuses : les antalgiques.

La plupart des paramètres ont un coefficient de régression positif mais pour d'autres le coefficient est négatif. L'interprétation de leur effet est différente, ainsi les anti-histaminiques ont un coefficient de –0,345 dans l'analyse de régression de la CRP chez les hommes de 28 à

75 ans, c'est à dire la consommation d'anti-histaminiques est associée une diminution de la CRP. Par contre pour l'hémoglobine (coefficient de –0,008), toujours dans l'analyse de régression de la CRP, mais chez les femmes, une diminution de l'hémoglobine est associée une augmentation de la CRP. Une explication possible de ce constat serait qu'une anémie inflammatoire peut être associée à une augmentation de la concentration sérique en CRP.
Ce résultat est confirmé par Vaiopoulos (*64*). Dans cette étude portant sur des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, il a été mis en évidence une corrélation négative entre CRP et taux d'hémoglobine.

L'ensemble des facteurs que nous avons isolé ne doivent pas tous être considéré comme la cause de la variation de la concentration sérique de la protéine. En effet, pour certains facteurs comme le BMI (surcharge pondérale), l'âge ou le tabac, une augmentation de leur valeur ou leur présence entraîne une augmentation de la concentration en protéine. Par contre pour d'autres, la relation de cause à effet n'existe pas.
Ainsi, nous ne pouvons pas considérer que la prise de certaines classes médicamenteuses entraîne une augmentation de la concentration sérique de la protéine mais plutôt le contraire. Le fait de se soigner avec des antalgiques ou des antibiotiques n'a pas pour conséquence une augmentation de la concentration de la CRP. Au départ, il existe un état inflammatoire, la réponse de l'organisme est de se défendre, de produire des protéines de la phase aiguë et pour accélérer la guérison il peut être nécessaire d'utiliser des médicaments.
Ces paramètres ne sont donc pas tous à l'origine de variations biologiques, ce sont plutôt des facteurs de confusion qui servent essentiellement à sélectionner une population de référence.

V.5. Sélection de la population de référence :

Nous avons sélectionné une population de référence en excluant les individus dont les paramètres sont significativement liés aux variations des protéines.
Les critères d'exclusion et donc les valeurs seuils se sont appuyés sur des normes OMS (ex: PAS<160 mmHg) ou bien des valeurs reconnues comme associées à un état pathologique ou inflammatoire (ex : leucocytes chez l'adulte $<10.10^9$/L). Les paramètres qualitatifs ont été exclus (ex: médicaments).

Parmi les paramètres qui sont ressortis comme significatifs, il en est un que nous n'avons pas utilisé, il s'agit de la saison de consultation. Le paramètre –printemps- est significatif chez les hommes dans l'analyse de régression multiple de l'haptoglobine, ainsi que le paramètre -hiver- chez les hommes dans l'analyse de régression de la CRP et de l'orosomucoïde.
En utilisant ce paramètre, nous aurions d'emblée exclu près de 30% des individus hommes par tranche d'âge. De plus dans le tableau 38, parmi les paramètres associés aux variations de l'haptoglobine, il ne reste plus que le paramètre -printemps- et son influence est semble-t-il assez faible (-19%) par rapport aux autres paramètres.

Malgré cette sélection, cinq individus ont encore une concentration en CRP supérieure à 20 mg/L, mais aucun d'eux a une concentration supérieure à 2,2 g/L pour l'haptoglobine et 1,4 g/L. Les critères d'exclusion ne sont peut-être pas suffisants pour exclure ces individus. Plusieurs solutions sont envisageables pour résoudre ce problème. Il est possible d'augmenter le seuil de significativité des paramètres des analyses de régression multiple au seuil de $p<0,05$, mais nous allons multiplier le nombre de paramètres avec le risque que l'influence de ces nouveaux paramètres soit de l'ordre de la variation analytique de la technique de dosage. Une autre solution est de modifier les seuils de décision des critères de partition, mais le risque est alors d'exclure beaucoup trop d'individus. La dernière solution et c'est d'ailleurs celle que nous avons retenu est de considérer comme seuil pathologique une concentration en CRP supérieure à 20 mg/L (*65,61*). Les cinq individus ayant une CRP>20 mg/L ont

finalement été exclus. Il s'agit d'une méthode qui peut être pratiquée dans la production de valeurs de référence visant à exclure les "outliers".

Le pourcentage d'individus exclus pour les 3 protéines chez les hommes et les femmes varie selon les classes d'âge entre 21 et 79% et augmente avec l'âge. Nous avons montré que les tranches d'âge des femmes de 40-49 ans et 50-75 ans subissent la plus forte exclusion (respectivement 70 et 79%) pour la production des valeurs de référence. Ceci peut partiellement être expliqué par les 22% de femmes qui prennent la pilule, sachant que les contraceptifs oraux font parti des paramètres significativement associés à des modifications de la concentration des protéines. Pour les mêmes tranches d'âge, les pourcentages d'hommes exclus sont de 57 et 53%.

V.6. Valeurs de référence

En raison du faible effectif après sélection de la classe d'âge des 50-75 ans, les valeurs de référence de cette classe ne peuvent pas être retenues. En effet après sélection, il ne reste plus que 12 hommes et 14 femmes.
Nous avons exclu cette classe d'âge de notre population de référence.

V.5.1. CRP

La médiane de la CRP chez les hommes augmente avec l'âge de 0,21 à 0,61 mg/L, il en est de même pour le centile 95 qui augmente de 1,45 à 4,80 mg/L. Chez les femmes, la médiane augmente de 0,20 à 0,54 mg/L et le centile 95 de 1,35 à 3,15 mg/L. Ces valeurs sont proches de celles de Kindmark (*62*) (technique néphélémétrique) qui annonce un intervalle de référence jusqu'au centile 95 de 0,20-6,10 mg/L. De même, nos valeurs sont proches de l'étude de Macy (*29*) (technique ELISA) qui porte sur 143 donneurs de sang hommes et femmes âgés de 18 à 67 ans. La médiane y est de 0,64 mg/L chez les hommes à comparer à 0,54 mg/L pour les 19-39 et à 0,66 mg/L pour les 40-49 ans de notre étude . Chez les femmes, elle est de 0,63 mg/L à comparer avec 0,56 et 0,58 mg/L. Par contre, la dispersion des valeurs

de la CRP est plus petite dans l'étude de Macy avec un intervalle de 0,02-3,25 mg/L chez les hommes et un intervalle de 0,07-3,24 mg/L chez les femmes.

La production des valeurs de référence a permis de réduire la dispersion des valeurs de la CRP selon l'âge. En effet, si nous comparons les valeurs fréquentes des figures 10 et 13 avec les valeurs de référence des figures 16 et 17, il apparaît clairement que la distribution du centile 97,5 en fonction de l'âge est beaucoup moins sujette à des variations. Une hypothèse pour expliquer ce constat serait la présence d'un état infectieux latent.

V.5.2. Haptoglobine

Pour l'haptoglobine, la médiane et le centile 95 augmentent chez les hommes avec l'âge respectivement de 0,43 à 0,85 g/L et de 0,99 à 1,53 g/L. Il en est de même chez les femmes : la médiane augmente de 0,61 à 0,95 g/L et le centile 95 de 1,25 à 1,48 g/L. Dans l'étude de Clark (*60*), la concentration moyenne en haptoglobine déterminée chez des volontaires sains adultes hommes et femmes est de 1,02 g/L. Schrijver (65) dans une étude sur les valeurs de référence par une technique de immunodiffusion radiale a déterminé un intervalle de référence de 0,50-3,30 g/L, résultats à nuancer compte tenu de la précision de la technique de dosage.

V.5.3. Orosomucoïde

Pour l'orosomucoïde, la médiane et le centile 95 sont stables avec l'âge aussi bien chez les hommes que chez les femmes. La médiane est voisine de 0,70 g/L chez les hommes et de 0,68 g/L chez les femmes. Le centile 95 est proche de 1,00 g/L chez les hommes et les femmes.

Les valeurs que nous avons déterminé sont inférieures à celles de Herbeth et coll (*57*). Dans leur étude, la médiane et le centile 97,5 des individus âgés de 4 à 14 ans sont respectivement de 0,8 g/L, et de 1,5 g/L. Chez les individus 14 à 60 ans, la médiane et le centile 97,5 sont de 0,4 g/L et 1,4 g/L.(technique de dosage néphélémétrique) (dans notre étude, le centile 97,5 n'est jamais supérieure à 1,16 g/L âge et sexe confondus).
Cette différence peut être attribuée à la technique de dosage.

Pour affiner la production des valeurs de référence, il aurait pu être intéressant de fournir un questionnaire spécifique à l'inflammation et à l'infection aux individus de la cohorte STANISLAS lors de leur inclusion.

Ce questionnaire permettrait de savoir, entre autre, si certains individus viennent de subir une intervention chirurgicale, s'ils souffrent d'une rage de dents ou bien encore s'ils sont enrhumés.

Il apparaît donc (tableau 33) qu'une concentration en CRP supérieure à 4,80mg/L chez les hommes et supérieure à 3,25 mg/L chez les femmes est synonyme d'un état inflammatoire sous-jacent, argument qui remet en question le seuil habituellement admis de 10 mg/L.

V.6. CRP et risque de morbidité coronarienne

Notre population d'étude est une population saine et les individus ayant des antécédents de pathologie cardiovasculaire ont été exclus lors du recrutement.
La méthode classique pour étudier la relation entre concentration en CRP et le risque cardiovasculaire est de déterminer la concentration de la CRP dans une population ayant eu un événement cardiovasculaire et de comparer le résultat avec celle d'une population témoin, ce sont les études cas-témoins.

L'originalité de notre étude est d'utiliser un modèle prédictif multifactoriel (qui reprend des facteurs connus de risque cardiovasculaire) pour déterminer une concentration susceptible d'être associée à un risque cardiovasculaire.
Nous avons utilisé le modèle de Laurier, modèle qui fait intervenir différents paramètres: âge, sexe, PAS, cholestérol, HDL-cholestérol, hypertrophie ventriculaire gauche, consommation de cigarettes et diabète. L'intérêt d'un tel outil multifactoriel est de pouvoir dépister des sujets présentant plusieurs facteurs limites, mais aucun ne dépassant les seuils généralement utilisés.

Le centile 80 de la distribution des indices de risque a été choisi comme limite entre individus à haut risque et individus à risque faible ou modéré. Il a été utilisé dans l'étude de Framingham (*67*), dans celle de la British Regional Heart Study (*68*) et a été repris par Laurier. Cette définition est arbitraire, mais présente l'avantage de standardiser la définition de haut risque.

Nous avons ainsi déterminé que les individus hommes et femmes ayant un haut risque cardiovasculaire ont une concentration respective de 1,33 et 1,20 mg/L, alors que les individus ayant un risque modéré ont une concentration de 0,96 mg/L chez les hommes et de 0,78 mg/L chez les femmes.
Nos résultats sont tout à fait en accord avec ceux de Ridker (*19*) bien que la méthodologie pour les obtenir soit totalement différente.
Dans l'étude de Ridker (*19*), la concentration sérique en CRP (technique de dosage ELISA) des hommes ayant eu un infarctus du myocarde est plus élevée que la population témoin, respectivement 1,51 mg/L et 1,13 mg/L ($p<0,001$). Cette étude a également, mis en évidence

respectivement 1,51 mg/L et 1,13 mg/L ($p<0,001$). Cette étude a également, mis en évidence que les hommes appartenant au dernier quartile de la distribution de la CRP ont un risque multiplié par 3 de développer un infarctus du myocarde (intervalle de confiance [1,8-4,6] mg/L) par rapport aux individus dont la CRP appartient au premier quartile.
De plus, la CRP semble s'additionner aux autres facteurs de risque habituel dans la prédiction d'un événement cardiovasculaire. En effet, il est apparu que les modèles de prédiction utilisant la CRP en plus des autres facteurs (hyperlipémie, hypertension, diabète, antécédents de maladies coronariennes) offrent une meilleure prédiction (*69*).

Au sein d'une population supposée saine, la formule de Laurier permet donc d'identifier un groupe d'individus (hommes et femmes) dont la probabilité de survenue d'un événement cardiovasculaire à 8 ans est plus élevée que le reste de la population. Nous avons démontré que la population à haut risque cardiovasculaire présente une concentration moyenne en CRP plus élevée que le reste de la population aussi bien chez les hommes que chez les femmes.
Ce résultat est en faveur de l'intérêt de la mesure de la CRP dans l'évaluation précoce du risque cardiovasculaire. Il est en accord avec les observations cliniques qui ont montré que les lésions athérosclérotiques sont largement infiltrées par des éléments cellulaires liés à l'inflammation. L'inflammation joue donc un rôle déterminant dans le développement de l'athérosclérose. Notre observation vient compléter les travaux effectués précédemment qui démontraient l'intérêt de la CRP dans des situations cliniques avérées : risque d'infarctus du myocarde (*70*), risque d'accident vasculaire cérébral (*19*), risque de maladie vasculaire périphérique (71), risque d'événements cardiovasculaires chez des femmes apparemment saines (69), incidence de maladies coronariennes chez les personnes âgées (*72*), événements coronariens récurrents chez des individus coronariens connus (*9*).

Des travaux complémentaires devraient valider cette hypothèse, notamment en intégrant la CRP dans la formule de Laurier afin de vérifier si son pouvoir discriminant est augmenté.

Cependant, quelques bornes doivent être posées pour éviter des interprétations hasardeuses :

- la CRP est indubitablement liée aux phénomènes inflammatoires rencontrés au cours des maladies cardiovasculaires, mais n'est vraisemblablement pas un facteur de risque indépendant. L'augmentation de la CRP est en effet lié entre autre à la consommation tabagique qui intervient dans le calcul de la formule de Laurier.
- l'interprétation d'une valeur de CRP élevée doit tenir compte des facteurs de variation associés qui ne sont pas liés avec le risque cardiovasculaire (par exemple : les phénomènes infectieux ou inflammatoires aigus.

Une conclusion définitive pourrait être portée sur le pouvoir prédictif de la CRP par une étude longitudinale à long terme.

BIBLIOTHEQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Conclusion

VI. Conclusion

Dans ce travail, nous avons dosé la CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde dans un échantillon de référence sélectionnée à partir d'une population française présumée saine. Les dosages ont été réalisés par des techniques immunonéphélémétriques dont nous avons vérifié les qualités de sensibilité, de répétabilité, de reproductibilité et d'exactitude .
En particulier pour la CRP, la technique de dosage, le réactif N latex CRP mono et la limite de sensibilité nous ont permis de déterminer de nouvelles valeurs de référence dont la précision s'est trouvée considérablement améliorée par rapport aux méthodes habituellement utilisées. Il aurait été intéressant de pouvoir comparer nos valeurs avec celles produites par des techniques dont la limite de sensibilité est encore plus basse mais qui ne sont pas utilisables en routine : Elisa, Radio-immunologie.
Grâce aux analyses statistiques, nous avons isolé, quantifié les principaux facteurs de variation et déterminé les limites de référence des 3 protéines.

Il aurait été intéressant de disposer de renseignements complémentaires concernant l'état inflammatoire de la population étudiée afin d'améliorer encore les critères de sélection de la population de référence. Ceci pourrait faire l'objet d'une étude complémentaire.

Nous avons également montré que la concentration en CRP est plus élevée dans une population dans laquelle la probabilité de survenue d'un événement cardiovasculaire à 8 ans est grande par rapport au reste de la population. Ainsi, au même titre que les facteurs de risque habituellement utilisés, la CRP pourrait être intégrée dans les modèles de calcul de risque et pourrait contribuer à améliorer la prévention des maladies cardiovasculaires. Pour cela, il serait utile de suivre la population étudiée dans ce travail sur laquelle en plus des données biologiques, cliniques et sur les habitudes de vie seraient recueillies les causes de décès, notamment dans le domaine cardiovasculaire. Ainsi, nous pourrions prolonger notre recherche et proposer un nouveau modèle de calcul de risque cardiovasculaire.

Références bibliographiques

1. **Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Guegen R, Vincent-Viry M, Sass C, Beaud B, Lecomte E, Steinmetz J, Locuty J and Chevrier P.**
Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal, cohort for sutdying gene environment interaction in the field of cardiovascular risk : The Stanislas Cohort.
Clin Chem and Lab Med 1998 ; 36(1) : 35-42.

2. **Ribeiro MA.**
Levels of C-reactive protein in serum sample from healthy children and adults in Sao Paulo, Brazil.
Braz J Med Biol Res 1997; 30(9): 1055-59.

3. **Urdal P, Borch S, Landaas S, Krutnes MB, Gogstad G, Hjortdahl P.**
Rapid immunometric measurement of C-reactive protein in whole blood.
Clin Chem 1992; 38(4): 580-4.

4. **Rose PE, Johnson SA, Meakin M, Mackie PH, Stuart J.**
Serial study of C-reactive protein during infections in leukemia.
J Clin Pathol 1981; 34: 263-6.

5. **Hind CRK, Ng SC, Feng PH, Pepys MB.**
Serum C-reactive protein measurement in the detection of intercurrent infections in oriental patients with systemic lupus erythematosus.
Ann Rheum Dis 1985; 44: 260-1.

6. **Van Leuwen MA, Van Rijswijk MH, Manink J, Westra J, De Jang HJ.**
CRP measurements in rheumatic disorders.
Protides Biol Fluids Proc Colloq 1986 ; 34: 315-8.

7. **Kushner I, Broder ML, Karp D.**

Controle of the acute phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction.

J Clin Invest 1978; 61: 235-42.

8. **Tracy RP, Kuller LH, Psaty BM, Cuhman M, Meilahn EN, Smith N.**

C-reactive protein and incidence of cardiovascular disease in older women : The Rural Health Promotion Project and the Cardiovascular Health Study.

Circulation 1996 ; 93 : 622-28.

9. **Liuzzo g, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A.**

The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina.

N Engl J Med 1994 ; 331 : 417-24.

10. **Kuller LH, Eichner JE, Orchard TJ, Grandits GA, Mc Callum L, Tracy RP, for the MRFIT Research Group.**

The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the Multiple Risk Intervention Trial.

Am J Epidemiol 1991 ; 134 : 1266-77.

11. **Haverkate F, Thompson S, Duckert F.**

Haemostasis factors in angina pectoris, relation to gender, age and acute-phase reaction.

Thromb Haemostas 1995 ; 73 : 561-7.

12. **Tillet WS, Francis Jr T.**

Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction from pneumococcus.

J Exper Med 1930; 52: 561-571.

13. Mac Leod CM, Avery OT.

The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. Isolation and purification of the reactive protein.

J Exper Med 1941; 73: 183-190.

14. Oliveira EB, Gotschlich EC, Liu TY.

Primary structure of human C-reactive protein. Proceedings of hte National Academy of Sciences, USA 1977; 74: 3148-3151.

15. Buess T, Ludwig C.

Diagnostic value of C-reactive protein in comparaison with erythrocyte sedimentation as routine admission diagnostic test.

Schweiz Med Wochenschr. 1995; 125: 120-124.

16. Vital-Durand D.

Vitesse de sédimentation augmentée.

Rev Prat 1995; 45: 2583-2587.

17. Siest G, Henny J, Schiele F.

Références en Biologie Clinique.

Collection Option Bio. 679 pages Ed. Elsevier 1990.

18. International federation of Clinical Chemistry. Expert Panel on theory of references values. The Theory of references values. Part 2. Selection of individuals for the production of references values.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 1987 ; 22 : 203-8.

19. Ridker P M, Cushman M, Meier J, Stampfer M J, Tracy R P, Hennekens C H.

Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.

N Engl J Med 1997;336:973-9.

20. Kannel WB, Gee D, Gordon T.

A general cardiovascular risk profile: The Framingham Study.

Am J Cardiol 1976, 38: 46.

21. Assmann G, Schulte H.

Results and conclusions of the prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study.

In: AssmannG, ed Lipid Metabolism disorders and coronary heart disease. 2nd ed München: MMV Medizin Verlag, 1993, 19-68 H.

22.Assman G, Schulte H, Von Echarstein A.

Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factor for major coronary events in middle-aged men.

Am J Cardiol, 1996; 77: 1179-1184.

23. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. For the MRFIT research group.

Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from Coronary Heart Disease continous and graded ?

Findings in 356, 22 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). JAMA 1986; 256, 2823-2828.

24. Ducimetière P, Richard J.L, Claude JR, Warnet JM.

Les cardiopathies ischémiques: incidence et facteurs de risque: l'Etude Prospective Parisienne.

Paris: Ed INSERM; 1981.

25. Laurier D, Chau N P.

Identification des sujets à risque élevé de morbidité coronarienne dans une population active française à l'aide d'un modèle de prédiction.

Arch Mal Cœur 1995; 88: 1569-75.

26. Laurier D, Chau N P, Cazelles B, Segond P, and the PCV-METRA Group.

Estimation of CHD risk in a french working population using a modified framingham model.

J Clin Epidemiol 1994; 47/12: 1353-1364.

27. Anderson K, Wilson P.

An updated coronary risk profile- A statement for Health Professionnals.

Circulation, 1991; 83/1: 356-362.

28. Anderson K, Odell P, Wilson P, Kannel W.

Cardiovascular disease risk profile.

Am Heart J. 1990; 121:293-98.

29. Macy E, Hayes T E, Tracy R P.

Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications.

Clin Chem 1997; 43: 52-58.

30. Lammers M, Bienvenu J, Monneret G, Borque de Larea L, Gaona N, Schumann G et al.

Evaluation of an improved immunonephelemetric assay for C-reactive protein. Clin Chem 1996 ; 42 : S165.

31. Bruguerolle B, Bouvenot G, Arnaud c, Levy F, Mechkouri M, Bartolin R, Peronne R.

Rythmes circadiens des protéines dites del'inflammation chez les sujet sain.

Rev Rhum 1986; 53/5: 313-316.

32. Malvy D, Povéda J-D, Debruyne M, Montagnon B, Burtschy B, Herbert C, Cacès P, Houot O, Amédé-Manesme O.

Laser immunonephelometry reference intervals for eight serum protein in healthy children.

Clin Chem 1992, 38/3:394-399.

33. Thompson PJ, Greenough A, Davis E, Nicolaides KH.

Fetal C-reactive protein.

Early Hum Dev 1993; 32(2-3):81-5.

34. Mendall M A, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield T C.

C-reactive protein and its relation to cardiovascular risf factors: a population based cross sectional study.

British Medical Journal 1996; 312: 1061-5.

35. Schalkwijk CG, Poland DC, van Dijk W, Kok A, Emeis JJ, Drager AM, Doni A, van Hinsbergh VW, Stehouwer CD.

Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation.

Diabetologia 1999 ; 42/3 : 351-7.

36. Ricoux C, Pontet M, Tresca JP, Engle R.

Concentration plasmatique de la protéine C-réactive chez des patientes en situation de forte imprégnation estrogénique.

Ann Biol Clin 1994; 52: 125-128.

37. Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE.

Hormone replacement therapy and increased of C-reactive protein.

Circulation 1999 ; 100/7 : 713-716.

38. Hak AE, Stehouwer CD, Bots ML, Polderman KH, Schalkwijk CG, Westendorp IC, Hofman A, Witteman JC.

Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19/8 : 1986-1991.

39. Watts D H, Krohn M A, Wener M H, Eschenbach D A.

C-reactive protein in normal pregnancy.

Obstet Gynecol 77 :176,1991.

40. Szpakowski M, Nowak M, Oszukowski P, Wieczorek A, Skotnicka A.

C-reactive protein in normal pregnancy.

Ginekol Pol 1996 ; 67/1 :17-20.

41. Nielsen FR, Bek KM, Rasmussen PE, Qvist I, Tobiassen M.

C-reactive protein dureing normal pregnancy.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1990 ; 35/1 : 23-27.

42. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW.

C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999 ; 19/4 : 972-978.

43. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.

Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-α in human obesity and insulin resistance.

J Clin Invest 1995 ; 95 : 2409-2415.

44. Baumann H, Gauldie J.

The acute phase response.

Immunol Today 1994 ; 15 : 74-80.

45. Steel DM, Whitehead AS.

The major acute phase reactants : C-reactive Protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein.

Immunol Today 1994 ; 15 : 81-88.

46. Palosuo T, Husman T, Koistinen J, Aho K.

C-reactive protein in population samples.

Acta Med Scand 1986; 220: 175-9.

47. Strachan F, Noakes T D, Kotzenberg G, Nel A E, de Beer F C.

C-reactive protein concentrations during long distance running.

British Med J 1984; 289 : 1249-1251.

48. Kanakoudi F, Drossou V, Tzimouli V, Diamanti e, Konstantinidis T, Germenis A, Kremenopoulos G.

Serum concentration of 10 acute-phase proteins in healthy term and preterm infants from birth to age 6 months.

Clin Chem 1995; 41/4, 605-608.

49. Shima M, Adachi M.

Effects of environmental tobacco smoke on serum levels of acute phase proteins in schoolchildren.

Prev Med 1996; 25/5 : 617-624.

50. Das I.

Raised C-reactive protein levels in serum from smokers.

Clin Chim Acta 1985 ; 153/1: 9-13.

51. McMillan DE.

Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes.

Metabolism 1989 ; 38/11: 1042-1046.

52. Frohlich M, Sund M, Russ S, Hoffmeister A, Fischer HG, Hombach V, Koenig W.

Seasonal variations of rheological and hemostatic parameters and acute-phase reactants in young, healthy subjects.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17/11: 2692-7.

53.Demelier JF.

Valeurs usuelles en biochimie pédiatrique. Orosomucoïde sérique.

Inf Scient Biol 1988 ; 14 : 9-10.

54. Denko C, Gabriel P.

Age and sex related levels of albumin, ceruleoplasmin, alpha 1 anti-trypsin, alpha 1-acid glycoprotein and transferrin.

Ann Clin Lab Science 1981; 11: 63-6.

55. Perier C, Chamson A, Engler R and Frey J.

Evolutionnary changes in acute-phase proteins in alcoholic hepatocellular diseases.

Clin Chem 1983 ; 29(1) : 45-47.

56. Laurell C, Kullander S, Thorell J.

Plasma proteins changes induced by danazol, pregnancy and estrogens.

J Clin Endocrinol Metab 1979;49:719.

57. Herbeth B, Henny J, Siest G.

Variations biologiques et valeurs de référence de la transferrine, des immunoglobulines A et de l'orosomucoïde.

Ann Biol Clin 1983; 41: 23-32.

58. Chenillot O.

Place de l'apolipoprotéine E dans la définition des indices de risque de morbidité coronarienne.

Diplôme d'Etude Approfondie de Pharmacologie - Metabolisme et mécanisme d'action des médicaments - Pharmocologie Clinique 1998.

59. Le Carrer D, Giraud F, Siramy M, Bataille R.

Protéine C-réactive : Réevaluation des valeurs normales par une technique néphélémétrique sensibilisée.

Feuillets de Biologie 1995 ; 36(204) : 39-42.

60. Clark G H, Fraser C G.

Biological variation of acute phase proteins.

Ann Clin Biochem 1993; 3: 373-376.

61. Shine B, De Beer FC.

Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein.

Clin Chem Acta 1981 ; 117: 13-23.

62. Kindmark CO.

The concentration of C- reactive in sera from healthy individuals.

Scand J Clin Lab Invest 1972 ; 29 : 407-11.

63. Doré D.

Biochimie clinique.

Editions Maloine 878 pages 1994.

64. Vaiopoulos G, Boki K, Kapsimali V, Coulocheir S, Papadaki HA, Eiolopoulos GD.

Hemoglobin levels correlate with serum soluble CD23 and TNF-Rs concentrations in patients with rheumatoid arthritis.

Haemotologia 1998 ; 29/2 : 89-99.

65. Tietz WW.

Clinical guide to laboratory tests.

2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 166-7.

66. Schrijver J, Van Rijn JM, Schreurs WH.

Re-evaluation of the haptoglobin reference values with the radial immunodiffusion technique.

Clin Biochem 1984; 17/4: 258-262.

67.Gordon T, Kannel WB.

Multiple risk functions for predicting coronary heart disease : the concept, accuracy, and application.

Am Heart J 1982 ; 103: 1031-1039.

68. Shaper AG, Pocock SJ, Philipps AN, Walker M.

Identifying men at high risk of heart attacks: strategy for use in general practice.

Br Med J 1986; 293: 474-479.

69. Ridker P M, Buring J E, Shih J, Matias M, Hennekens C H.

Prospective study of c-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women.

Circulation 1998; 98:731-733.

70. Ridker P M, Glynn R J, Hennekens C H.

C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL-cholesterol in determining risk of myocardial infarction.

Circulation 1998; 97: 2007-2011.

71. Ridker P M, Cushman M, Stampfer M J, Tracy R P, Hennekens C H.

Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developping peripheral vascular disease.

Circulation 1998;97:425-428.

72. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BML, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH.

Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997 ; 17 : 1121-1127.

73. Ledue TB, Weiner DL, Sipe JD, Poulin SE, Collins MF, Rifai N.

Analytical evaluation of particle -enhanced immunonephelemetric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum.

Ann Clin Biochem 1998 ; 35 : 745-753.

74. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH.

Method evaluation of the C-reactive protein assay on the Behring Nephelometer II system and determination of an adult reference interval for C-reactive protein.

Scand J Clin Lab Invest 1998 ; 58 : Suppl 228.

75. Recommandations de la commission des valeurs de référence. Monographie. Société Française de Biologie Clinique.1988 - 68 p- Expansion Scientifique Française.

Annexe

C-Reactive Protein : Biological Variations and Reference Limits

Olivier Chenillot[1], Joseph Henny[1], Josiane Steinmetz[1], Bernard Herbeth[2] and Gerard Siest[1,3]

[1]Laboratoire de biologie clinique, Centre de Médecine Préventive, Vandoeuvre-lès-Nancy

[2]Département statistique, Centre de médecine Préventive, Vandoeuvre-lès-Nancy

[3]Address correspondence to this author at : Laboratoire du Centre de Médecine Préventive , 2 avenue du Doyen Jacques Parisot, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Fax 33 (0)3 83 44 87 21 ; e-mail Gerard.Siest@cmp.u-nancy.fr

Abstract

Serum CRP concentration was determined with an improved sensitibility immunonephelometric assay in 3605 subjects. Subjects were aged from 4 to 75 years and belonging to 1003 nuclear families recruited from the STANISLAS cohort Study between january 1994 and august 1995. In the overall sample, values for CRP ranged from 0.17 mg/L to 100 mg/L, geometric means (mean - sd ; mean + sd) were in men 0.37(0.17-1.07) mg/L for 5-14 age class, 0.47(0.17-1.38) mg/L for 15-28 age class, 0.98(0.34-2.85) mg/L for 29-75 age class and respectively in women 0.38(0.17-1.10) mg/L, 0.62(0.20-1.90) and 0.98(0.31-3.13). The interindividual variability varied from 138% to 759% among different age classes. We studied biological factors affecting CRP concentration and calculated that they explain up to 25% of the CRP variability in men and 40% in women. The main biological factors affecting CRP concentration were the following in men : drugs, leukocytes, BMI, tobacco consumption, age and in women : drugs, leukocytes, age, BMI and hemoglobin. These factors served us to define exclusion and partition criteria for obtaining the reference samples. Medians of reference values ranged from 0.21 to 0.68 mg/L between 4 to 75 years old in men and from 0.20 to 0.78 mg/L in women.

Key-words : C-reactive protein ; reference values ; immunonephelometric assay ; analytical and biological variation factors

Introduction

C-reactive protein (CRP) is an acute-phase serum component, present only in trace amounts in healthy people. CRP is secreted only by hepatocytes, where its synthesis is regulated by cytokines, of which IL-6 is the most important. Life-spend of CRP in the circulation (~19 h) is independant of the plasma concentration and is remarkably constant in all conditions. The molecular weight of the CRP is 120 Kda , it is a pentameric protein comprising five identifical , non convalently bound subunits arranged in cyclic symmetry on a single plane (1).
CRP is able to initiate several biological functions including immune complex precipitation, opsonization, capsular swelling and agglutination. Two major biological activities of CRP have been well defined: first, it has significant activation properties, in particular to activate the complement system and to bind to and modulate the function of phagocytic leukocytes. Second, it is able to bind several biological substrates that are widely distributed. All the functions support the concept that this protein may have a potentially central role in host defense mechanisms.

Its concentration in blood increases rapidly by as much 1000-fold upon exposure to various inflammation stimuli, decreasing rapidly, when the stimulus declines. CRP has been used successfully for clinical diagnosis and monitoring of a variety of infections and diseases, including infections caused by bacteria, fungi (2), intercurrent infections in leukemia (3) and sytemic lupus erythematosus (4), inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (5), and disease with cellular necrosis such as myocardial infarction (6)

Recent studies showed that CRP has an interest to predict coronary heart disease risks (7,8,9,10). The assessment of CRP concentration as a marker of cardiovascular risk requires the knowledge of its biological variations and of clearly defined reference limits.
The aims of this study are to identify the most important causes of biological variations in CRP concentration and to determine serum CRP reference limits on a well selected population sample belonging to the STANISLAS cohort study. We present the results obtained with an improved immunonephelometric assay for C-Reactive Protein.

We completed our results with results found in literature.

Material and methods

Studied population

Subjects were apparently healthy individuals subjects attending the Center for Preventive Medicine at Vandoeuvre-lès-Nancy (France) for a routine health examination that is repeated every five years. They have been recruited between January 1994 and August 1995 and correspond to 1003 nuclear families of Caucasian origin, including at least two children (4- to 26-years old). This large familial sample called the "STANISLAS cohort study" will be followed for 10 years (11). All subjects gave their written informed consent for participating in this study, which was approved by the local ethics committee of Nancy. Health screening included multiple tests : 22 blood constituents, life-style descriptions, socio-professional environment questionnaires (questionnaires on the medical history and living conditions of the family), functionnal tests, and physical examinations. For the work presented here, the sample correspond to 3605 fasting individuals (1805 men, 1800 women).

Collected parameters

The studied factors that could potentially affect the serum CRP concentration are age, body mass index (BMI calculated according the Quetelet's formula, weight (kg)/height^2 (m^2)), systolic blood pressure (SBP (mmHg), diastolic blood pressure (DBP (mmHg)), menopausal status, season of the examination, drugs, tobacco and alcohol consumption, serum turbidity and biological parameters including leukocytes (10^9/L), platelets (10^9/L), hemoglobin (g/L), total cholesterol (TC, mmol/L), triglycerides (TGs, mmol/L), glucose concentration (mmol/L), alanine aminotransferase (ALT, U/L), aspartate aminotransferase (AST, U/L), gamma-glutamyl transferase (GGT, U/L), apolipoproteine AI (Apo AI, g/L), apolipoproteine B (Apo B, g/L) and apolipoproteine E concentration (Apo E, mg/L).

Blood samples

Blood was collected by venipuncture after overnight fasting, in Vacutainer tubes containing a gel for serum separation (Becton Dickinson). Blood was centrifugated promptly at 1000g for 15 min at room temperature.

Analytical methods

CRP concentrations were determined on liquid nitrogen frozen sera with an automated nephelometer (BN II, DadeBehring) by using the N latex CRP mono assay (DadeBehring, Marburg). The principle of the method is based on polystyrene particles coated with monoclonal antibodies to CRP which are agglutinated when mixed with samples containing CRP. The necessary dilutions of the standard (N CRP Standard SY, code No OQIK) are prepared automatically with N diluent by the Behring Nephelometer. The patient samples are automatically diluted 1:400 with N diluent. The detection limit of the method is 0.175 mg/L. The assay is designed to measure CRP concentrations within an overall range of approximately 0.175 to 1100 mg/L. Control sera (N/T Rheumatology Controls SL/1 and 2 , code Nos. OQDB and OQDC) were included in each series of CRP measurements. The within series imprecision of CRP measurements was tested on three different serum pools freshly prepared and stored at 4°C, it varied from 3.2 to 3.4%. The day-to-day reproductibility was estimated, by the commercially available Behring control sera (stored at 4°C), to be 5.0% (one month).We also verified the accuracy of the method by using the IFCC/BCR/CAP (preparation (Lot No3750) (International Federation of Clinical Chemistry) (Community Bureau of Reference) (College of American Pathologists), the results are in the reference limits recommended by the standard.

All the other biological parameters were measured in fresh serum on AU5010 automated analyser (Olympus Merck), on BN II (DadeBehring), on Cobas Mira analyser (Roche Diagnostics). Blood count and differentials were determined on Max'm analyser (Coulter).

Statistics

Statistical analyses were performed using BMDP® statistical software (Cork, Ireland).

Distribution of CRP is non gaussian. Therefore a logarithmic transformation was performed and we calculated geometric mean of CRP concentration

We used a multiple regression analysis to assess the influence with their degree of significance of biological or physiological factors on serum CRP concentration. Parameters listed in table 1 and 2 were introduced in this analysis

The significant factors ($p > 0.01$) served to define exclusion and partition criteria for selection of the reference sample population.

Finally, we estimated the 50 th, 90 th, 95 th, 97.5 th percentiles of CRP distribution in 5-13, 14-19, 20-39, 40-49, 50-75 years classes in men and in women. The CRP variations due to statistically linked factors were quantified : median values in groups with factors were compared to medians values in groups without factors.

Population profile

Socio-demographic and biological characteristics of the overall sample are presented in table 1 for men and in table 2 for women. Most of the parents were of middle age, with an average of 41.9±4.9 years for fathers and 39.8±4.8 for mothers. The 5-14 age classes were an average of 11.4±2.04 for the boys, and 11.2±2.01 for the girls and the 15-28 age class 17.4±2.27 for men and 17.8±2.55 for women. Concentrations of the biological variables were almost within references ranges (12). Consumption of alcohol, tobacco and drugs was moderate. These life-style characteristics were in accordance with the familial recruitment of apparently healthy subjects. 67.4% for men and 65% for women came in winter and spring to the center for medicine preventive for their health periodic examination.

Results and discussion

Concentration and distribution of CRP

In the overall sample, serum concentration of CRP ranged from 0.175 to 100 mg/L. The distribution of CRP is shown in figure 1.

Serum CRP geometric mean increases with age in men from 0.37 mg/L for the 5-14 age class to 0.98 mg/L for the 29-75 age class ($p<0.001$) and in women from 0.38 mg/L for the 5-14 age class to 0.98 mg/L for the 29-75 age class ($p<0.001$). This increase with age was of 163% for men and 98% for women. Women had a serum CRP concentration higher than men in teenagers (+18%) and in adults (+8%).

Total interindividual variations (sd/m x 100) of serum CRP concentration were 215% in adults women, 167% in adults men, 326% and 155% in boys and girls teenagers, and 225% and 356% in boys and girls children.

Analytical and biological variations of CRP

Preanalytical variations

Anticoagulant can modify CRP values (13): by taking serum as reference and for low CRP concentration, Macy and coll measured an increase of 7% with EDTA plasma, a decrease of 6% with SCAT-1 plasma (containing aprotinin , D-phenylalanyl-prolyl-arginyl-chloromethyl ketone (PPACK) and EDTA) and 11% for citrate plasma. There is no modification for SCAT-2 plasma (PPACK and citrate)

CRP is stable to multiple freeze/thaw cycles (13) CRP has been measured after four freeze/thaw cycles in serum, in EDTA plasma, in SCAT-1 plasma, in SCAT-2 plasma, in EDTA plasma from five individuals. No significant difference in mean values was found for any individual or any anticoagulant type.

Analytical variations

There is no interference by the following potentially interfering substances : triglycerides up to 26 g/L, cholesterol up to 9.9 g/L, icteric specimens up to 205 mg/L bilirubin, rheumatoid factors up to 2050 IU/mL and Ig M paraproteins up to 76 g/L (14).

Linearity of CRP assay has been tested and yield good results (14). Linear regression analysis of 24 dilution series of samples with CRP concentrations in the range of 96 to 405 mg/L yield a median slope of measured versus expected concentration of 1.00 (range 0.96 to 1.07). This results are in agreement with our own results. All Pearson correlation coefficients were > 0.99. Comparison of N latex CRP Mono to several commercially available CRP assays (Rate immunonephelemetry, immunoturbidimetric assay, immuno-rate assay) yield a reasonably good agreement : correlation coefficient range from 0.87 to 1.19.

The precision of others methods are described in annals of french quality control (15). When all methods are considered, inter-laboratory variation coefficient is 28% for a serum A with target value of 14 mg/L and 18% for a serum B with target value of 34 mg/L. The precision depends on the assay. For nephelemetric assays (n=440), inter-laboratory variation coefficient is always lower than 10% for serum B and lower than 21% for serum A. For turbidimetric assays (n=2636), inter-laboratory variation coefficients are respectively 18% and 29%. For agglutination assays(n=209), inter-laboratory variation is 33%.

Moreover, discrepancies appeared between results obtained with reagents of the same manufacturer according to their use in nephelometry or in turbidimetry. The difference varies from -19.1 mg/L to + 6.4 mg/L for serum B and from -6.7 mg/L to + 4.4 mg/L for serum A.

Finally, the precision depends on assays, reagents and target values.

Biological variation factors

Multiple regression analysis

Results of multiple regression analysis obtained in our population are represented in table 3 and 4.

Biological factors that significantly modify serum CRP concentration are in decreasing order of importance in women: drugs (oral contraceptives, antiinflammatory, antipyretics, antibiotics), leukocytes, age, BMI and hemoglobin In men, they are in decreasing of importance : drugs (antipyretics, respiratory drugs, antihistaminics), leukocytes, BMI, tobacco consumption and age.

These factors explained 13 to 25% of CRP variability in men and 17 to 40% in women. The variation factors present in all groups were leukocytes and BMI. CRP concentration decreases with antihistaminics in men adults ($p<0.01$), with age and hemoglobin in girls ($p<0.001$ and $p<0.01$). The others biological factors tented to increase CRP concentration. In women, oral contraceptives was the most important factor known to modify CRP concentration and explained 22% of the CRP variability in women teenagers. In men, antipyretics appeared to be the most important factor associated with CRP variability.

In contrast, menopausal status, platelets, total cholesterol, glucose, ALAT, GGT, spring, autumn, summer, alcohol consumption, antihypertensive drugs, antiarhythmics, lipid-lowering drugs, intra-uterine device, serum turbidity had no effect on CRP concentration in our healthy population ($p>0.01$).

Age

Age influence serum CRP concentration. We found lower CRP values in children than in adults. We found that CRP median values that increased from 0.21 mg/L for the 5-13 years of age to 0.86 mg/L for the 50-75 years of age in males and 0.75 mg/L in females

Gender

From 5 to 39 years of age, men and women have similarly CRP values and after 39 years of age, men have higher values than women. Our results are in agreement with those obtained by Ribeiro (16) and Kindmark (17). In fact, they found low CRP values in children than in adults. But our results are opposed to those obtained by Le Carrer and al (18), they found low CRP values in men adults than in women adults. We can explain this difference by the precision of the assay and the studied population

Intra-individual variation

Intra-individual variation of CRP has been tested in a 6-month longitudinal study for 26 individuals (13). It appeared that subjects tended to have relatively stable CRP values during this period.

BMI

In our population, BMI explained from 3.6% to 8.3% of the variance of CRP in men and from 2% to 18% in women. These results agree with Hak (19). BMI explained 29.7% of the variance of CRP in middle-aged women. The results of this population based-study indicate that adiposity associated with CRP in healthy, middle-aged women. Yudkin (20) found a significant correlation coefficient between CRP and BMI ($p<0.001$)). This study demonstrated that CRP, cytokines concentration and anthropometric measures of obesity are significantly correlated and this relation was compatible with an adipose tissue origin of TNF-α (Tumor Necrosis Factor) and IL-6 (Interleukine).

Physical activity

CRP concentration has been studied during long distance running (21). Strachan and al showed that after an 88 km ultramarathon CRP concentrations were comparable to those found in patients with small myocardial infarctions.

Pregnancy

CRP values are modified during normal pregnancy. Watts and al (22) observed higher median CRP values during normal pregnancy (+600%) compared to values in non-pregnant women. Median CRP for women before labor ranged from 7-9 mg/L, depending on gestational age and in labor at term, it was 13 mg/L. For Szpakowski (23), CRP values for pregnant women ranged from 1.5 to 15 mg/L with median value 2 mg/L and were significantly higher than non-pregnant women ($p<0.001$). In labour, median values increased significantly ($p<0.001$) to 8 mg/L (range 1.5-2.7 mg/L).

Hormonal treatment

- Hormone Replacement Therapy (HRT)

Median CRP levels were 2 times higher among women taking HRT than among women didn't take HRT (2.7 versus 1.4 mg/L ; $p=0.001$) (24). Moreover, compared with non-users of HRT, median CRP levels were significantly higher among women using estrogen alone and associated with progesterone.

-Oral Contraceptives (OC)

Oral contraceptives treatment explained up to 22% of the variance of CRP in women. The results have to be compared with those obtained by Ricoux (25). The monitoring of inflammation activity in patients with a high level of estrogen is controversial because the significance of a raised estradiol level on CRP concentration is debated question. They observed the absence of estradiol effect on CRP level.

Environment

- Smoking

In our population, smoking appeared to explain 16 to 52% of CRP variation in men 28-75 years old. Probably a major determinant in this respect was the chronic inflammation caused by many years of smoking. This association with smoking correspond to that observed by Palosuo (26) in a population of smokers and non-smokers.

- Alcohol consumption

We didn't show any correlation between alcohol consumption and CRP variation.

Anemia

Hemoglobin decrease explained 2.1% of the CRP variation in women.

We summarized in table 7 and 8 the most important significant biological factors of CRP variation.

Reference limits of serum CRP concentration

Taking into account the regression analysis results, we excluded from general population, subjects presenting factors which influence CRP concentration : leukocytes > 10^9/L, TGs > 1.8 mmol/L, hemoglobin < 120 g/L for women and <130 g/L for men, BMI values >30 for adults, >23 for children and > 26 for teenagers. Therefore, we excluded subjects who were treated with antibiotics, antihistaminics, antipyretics, drugs acting on respiratory system, antiinflammatory drugs, oral contraceptives and subjects who had declared smoking and drinking more than 44g pur alcohol per day. We also excluded subjects with CRP concentration upper than 20 mg/L. References values for Log CRP were then converted to references values of CRP by exponential transformation.

The reference sample represented 1879 subjects, i.e., 52.1% of the overall sample.
Reference limits for CRP concentration by age in men and in women are summarized in table 5 and 6. Males and females exhibited quite the same median values until 40. In contrast, in adults older than 40, men had higher CRP limits than women. CRP concentration increased with age, in men, from 0,21 mg/L in 5-13 years class to 0.54 mg/L in 20-39 years class and more than 0.66 mg/L after 40. The range of the results are larger with age, principally in men after 40 years old.

Conclusion

The measurement of serum CRP concentration is very often used in clinical chemistry and have a very large number of indications. The effect of inflammation on the concentration of CRP is well documented. However, no references values that include a large number of subjects and biological factors influencing CRP concentration have been established. Here we

report a detailed description and quantification of CRP biological variations and we provide references intervals for the CRP concentration in caucasian individuals belonging to a large population-based study. The population sample was selected a posteriori, according to IFCC recommandations (27) and taking into account the main biological factors that have been shown to affect the CRP concentration..

More than 45% of the selected population have a CRP concentration lower than 0.175 mg/L and 97 % lower than 5 mg/L. CRP concentration >10 mg/L have been taken to imply an ongoing pathological process (28) and a concentration of 20 mg/L has been used as a cut-off point for the differenciations of, for example viral and bacterial infections of the central nervous system (29). So, we excluded 5 outliers with CRP values >20 mg/L. This selection has been done to select subjects without intercurrent illnesses.

The meaning of CRP concentrations in the range of 3-10 mg/L is not well understood at this time (13). Values in this area could represent chronic inflammatory activity in some or all subjects. It is also interesting to know if values in this area or in the higher proportion could represent slight but important cardiovascular disease(CVD)-associated inflammation and could be associated with any additional risk of CVD.

We have shown that CRP concentration is affected by age, gender, BMI, leukocytes, hemoglobin, tobacco consumption, drugs including antipyretics, antibiotics, OCs and drugs acting on respiratory system. The most important sources of variation in the studied population were leukocytes and drugs. The large number of subjects and the amount of information collected in the STANISLAS cohort study allowed us to produce references values for CRP concentration and to quantify the different observed variations.

Acknowledgments

We are grateful to the staff of the Centre for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy, France, for their contribution in recruitment and the collection data of the STANISLAS cohort. The SANISLAS cohort study was supported by Beckman Instruments, Biomérieux, Johnson & Johnson, and Merck. This work was supported partly by Dade Behring (Germany).

Table 1. Socio-demographic and biological characteristics of the men in the cohort

	5-14 years old n=591	15-28 years old n=367	29-75 years old n=847
CRP, mg/l arithmetic mean	1.04 (3.29)[a]	1.05 (3.43)[a]	1.87 (4.02)[a]
geometric mean	0.37 (0.17-1.07)[b]	0.47 (0.17-1.38)[b]	0.98 (0.34-2.85)[b]
Age, years	11.4 (2.04)	17.4 (2.27)	41.9 (4.9)
BMI, kg/m^2	17.96 (2.78)	21.2 (2.88)	25.43 (3.36)
Weight, kg	41.0 (12.2)	64.7 (10.7)	77.1 (11.4)
SBP, mmHg	111.6 (11.2)	125.7 (11.3)	127.8 (12.7)
DBP, mmHg	55.7 (10.1)	65.7 (10.8)	78.1 (9.8)
Biological parameters			
Leukocytes, $10^9/L$	6.81 (1.62)	6.72 (1.64)	7.05 (1.91)
Platelets, $10^9/L$	300.6 (59.3)	264.2 (55.5)	264.5 (55.7)
Hemoglobin, g/L	135.6 (8.8)	153.0 (10.05)	152.8 (8.6)
Cholesterol, mmol/L	4.65 (0.76)	4.46 (0.89)	6.01 (1.12)
Triglycerides, mmol/L	0.65 (0.35)	0.52 (0.45)	1.35 (0.90)
Glucose, mmol/L	4.91 (0.36)	4.96 (0.38)	5.24 (0.68)
ASAT, U/L[b]	26.44 (7.40)	27.73 (95.54)	24.78 (12.06)
ALAT, U/L	20.34 (12.42)	22,85 (22.05)	35.29 (21.53)
GGT, U/L	12.22 (3.43)	15.64 (8.27)	38.04 (38.26)
Apo AI, g/L	1.53 (0.22)	1.40 (0.19)	1.54 (0.24)
Apo B, g/L	0.78 (0.17)	0.81 (0.21)	1.15 (0.27)
Apo E, mg/L	46.25 (11.37)	41.71 (9.82)	50.15 (19.61)
Season of the examination			
Winter, %	31.9	35.9	30.8
Spring, %	35.5	29.5	34.2
Summer, %	17.4	18.7	19.3
Autumn, %	15.2	15.9	15.6
Tobacco and alcohol consumption			
Actual, cigarettes/day	-	1.36	5.63
Past, cigarettes/day	-	0.19	6.61
Alcohol, g/day	0	1.89	23.62
Drugs			
Antiinflammatory drugs, %	1.9	2.24	4.0
Antibiotics, %	2.05	4.69	1.44
Antihypertensives, %	-	-	3.2
Antiarhythmics, %	-	-	2.4
Cardiac analeptics drugs, %	-	-	0,12
Lipid-lowering drugs, %	0.19	1.12	6.5
Antipyretics, %	1.54	2.48	3.83
Antihistaminics	0.03	0.02	0.01
Drugs acting on respiratory system, %	4.11	3.86	2.2
serums turbidity			
lactescent, %	-	-	0.3
opalescent, %	0.38	0.8	0.02
chylomicron, %	-	0.2	0.2

[a]Values are means and (SD), [b] means (mean - SD ; mean + SD)

[b]ASAT, aspartate aminotransferase, ALAT, alanine aminotransferase, GGT, gamma glutamyl transferase

Table 2. Socio-demographic and biological characteristics of the women in the cohort

	5-14 years n=585	15-28 years n=371	29-75 years n=844
CRP, mg/l arithmetic mean	1.02 (3.64)[a]	1.24 (1.92)[a]	2.02 (3.37)[a]
geometric mean	0.38 (0.17-1.10)[b]	0.62 (0.20-1.90)[b]	0.98 (0.31-3.13)
Age, years	11.2 (2.01)	17.8 (2.55)	39.8 (4.8)
BMI, kg/m^2	18.44 (3.07)	21.3 (2.89)	23.83 (4.14)
Weight, kg	41.1(11.8)	56.8(8.5)	61.8(10.88)
SBP, mmHg	109.7 (9.80)	115.9 (10.01)	119.4 (13.4)
DBP, mmHg	56.5 (10.58)	63.6 (10.1)	72.4 (10.3)
Menopausal status, %	-	-	1.34
Biological parameters			
Leukocytes, $10^9/L$	6.97 (1.65)	7.43 (1.89)	7.16 (1.85)
Platelets, $10^9/L$	308.0 (62.61)	288.3 (61.6)	281.3 (65.3)
Hemoglobin, g/L	135.6 (7.5)	136.7 (7.81)	135.5 (9.6)
Cholesterol, mmol/L	4.85 (0.80)	4.90 (0.84)	5.52 (0.90)
Triglycerides, mmol/L	0.68 (1.58)	0.76 (1.49)	0.79 (1.57)
Glucose, mmol/L	4.87 (0.38)	4.76 (0.40)	7.93 (0.69)
ASAT, U/L[c]	23.01 (6.33)	17.98 (6.79)	17.70 (7.90)
ALAT, U/L	17.91(6.16)	17,65 (10.14)	20.10 (14.84)
GGT, U/L	10.64 (2.53)	12.34 (5.19)	18.70 (18.07)
Apo AI, g/L	1.50 (0.20)	1.55 (0.24)	1.369 (0.26)
Apo B, g/L	0.83 (0.18)	0.87 (0.19)	0.97 (0.22)
Apo E, mg/L	49.43 (11.17)	44.69 (11.54)	44.96 (11.92)
Season of the examination			
Winter, %	31.1	32.7	30.8
Spring, %	34	34.3	34.3
Summer, %	18.5	19.8	19.4
Autumn, %	16.4	13.2.	15.1
Tobacco and alcohol consumption			
Actual, cigarettes/day	-	1.93	2.73
Past, cigarettes/day	-	1.60	2.34
Alcohol, g/day	0	0.43	4.46
Drugs			
Antiinflammatory drugs, %	2.01	2.79	2.40
Antibiotics, %	4.10	6.04	1.58
Antihypertensives, %	-	-	1.71
Antiarhythmics, %	-	-	3.17
Cardiac analeptics drugs, %	-	0.2	0.7
Lipids-lowering drugs, %	0.4	0.5	2.1
Antipyretics, %	2.92	3.50	4.68
Drugs acting on respiratory system, %	4.81	3.29	2.1
Antihistaminics, %	0.02	0.02	0.01
Oral contraceptives, %	0.2	32.9	21.8
Intra-uterine device, %	-	-	34.4
serums turbidity			
Lactescent, %	-	-	0.3
Opalescent, %	0.8	-	-
Chylomicron, %	0.2	-	0.2

[a]Values are means and (SD), [b] mean (mean -SD ; mean + SD)

[c]ASAT, aspartate aminotransferase, ALAT, alanine aminotransferase, GGT, gamma glutamyl transferase

Figure 1. CRP Distribution in the overall population

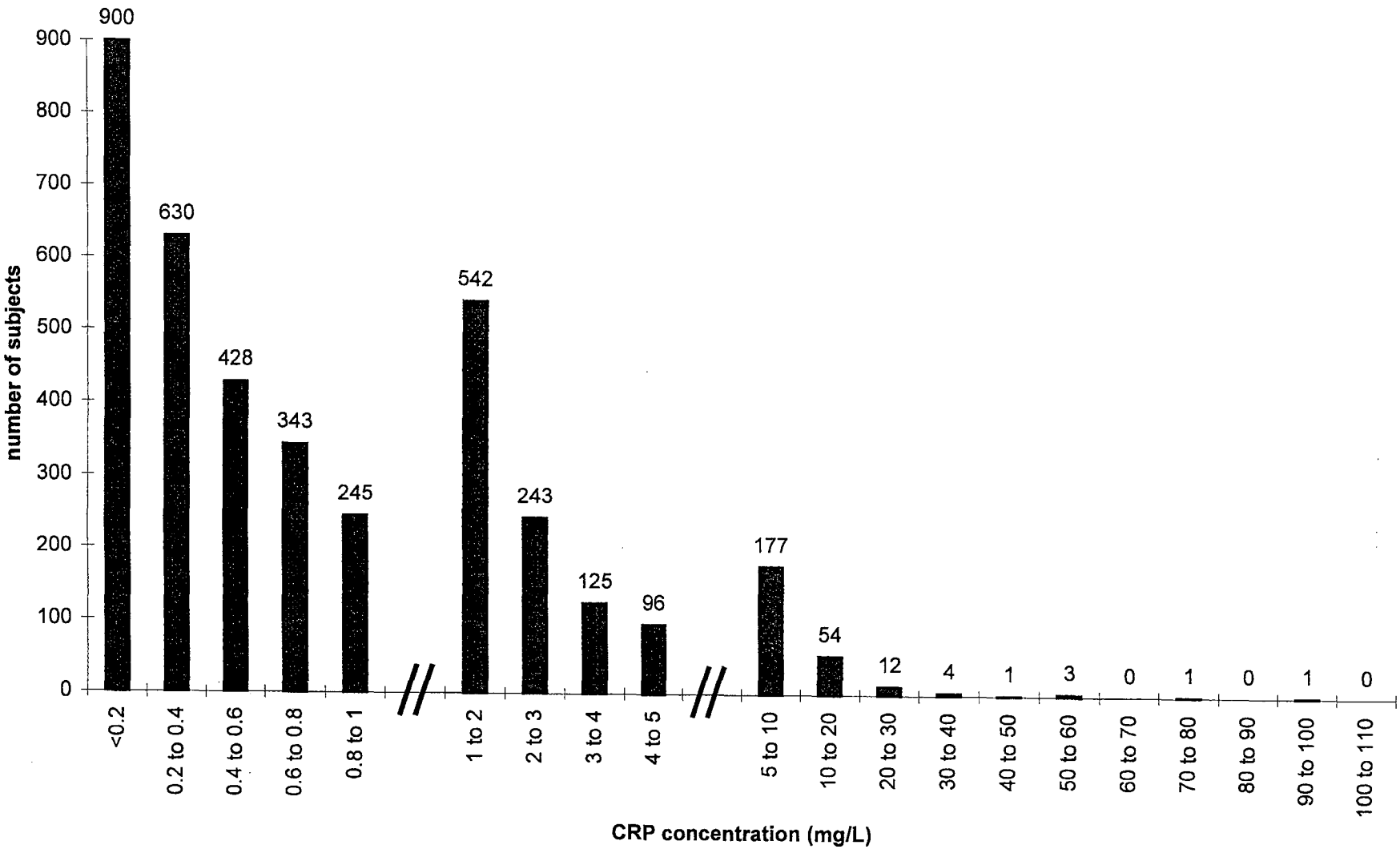

Table 3. Multiple regression analysis with regression coefficients (and SD) obtained for factors influencing CRP concentration

	Men					
	5-14 years		15-28 years		29-75 years	
	Regression coefficient	R^2 [c]	Regression coefficient	R^2 [c]	Regression coefficient	R^2 [c]
Age, years					0.013(0.003)**	0.013
Leukocytes, 10^9/L	0.040(0.011)**	0.021	0.056(0.014)**	0.058	0.066(0.008)**	0.115
AST, U/L					0.003(0.001)*	0.006
Tobacco, cigarettes/day					0.006(0.001)**	0.014
Weight, Kg					0.011(0.001)**	0.006
BMI[b], kg/m^2	0.043(0.006)**	0.083	0.031(0.008)**	0.036	0.038(0.004)**	0.076
Winter, %	0.153(0.040)**	0.022				
Antihistaminics[a], %					-0.345(0.120)*	0.006
Antipyretics, %	0.643(0.143)**	0.034	0.568(0.147)**	0.037		
drugs acting on respiratory system[a], %					0.481(0.096)**	0.012
global R^2		0.160		0.131		0.248

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] yes=1, no=0 ; [b] body mass index, [c] Part of the explicative variance

Table 4. Multiple regression analysis with regression coefficients (and SD) obtained for factors influencing Log CRP concentration

	Women					
	5-14 years		15-28 years		29-75 years	
	regression coefficient	R^2 [c]	regression coefficient	R^2 [c]	regression coefficient	R^2 [c]
Log triglycerides					0.337(0.080)**	0.013
Leukocytes, 10^9/L	0.054(0.011)**	0.069			0.040(0.007)**	0.030
BMI [b], kg/m^2	0.073(0.012)**	0.020	0.044(0,007)**	0.068	0.043(0.003)**	0.179
Hemoglobin, g/dL	-0.008(0.002)*	0.021				
Oral contraceptives, % [a]			0.493(0,045)**	0.217	0.427(0.034)**	0.168
Antiinflammatory drugs, % [a]			0.414(0,129)*	0.020		
Antipyretics,% [a]	0.461(0.103)**	0.030				
Antibiotics,% [a]					0.332(0.110)*	0.007
Global R^2		0.175		0.305		0.397

*p=0,01, **p=0,001 ; [a] yes=1, no=0 ; [b] body mass index, [c] Part of the explicative variance

Table 5. Reference limits for serum CRP concentrations (mg/L) by age in men

Age (years)	5-13	14-19	20-39	40-49	50-75
N	403	274	187	261	26
Percentiles 50	0.21	0.28	0.54	0.66	0.68
Percentiles 75	0.47	0.61	0.85	1.42	1.45
Percentiles 90	0.86	1.40	1.68	2.76	1.50
Percentiles 95	1.45	2.13	2.68	4.80	-
Percentiles 97.5	2.40	3.55	4.08	6.40	-

Table 6. Reference limits for serum CRP concentrations (mg/L) by age in women

Age (years)	5-13	14-19	20-39	40-49	50-75
N	386	205	195	191	19
Percentiles 50	0.20	0.22	0.56	0.54	0.78
Percentiles 75	0.54	0.54	0.95	1.05	1.17
Percentiles 90	1.07	1.10	2.30	2.14	1.90
Percentiles 95	1.35	1.50	3.34	3.15	-
Percentiles 97.5	2.07	2.50	4.37	4.14	-

Table 7. Mains variation factors of CRP concentration in men.

Variation factors	observed variations
Leukocytes, > 10.10^6/L	+117% to +140%
BMI, >30 in adults >26 in teenagers, >24 kg/m^2 in children	+90% to +121%
Tobacco consumption	+16% to +52%
Antipyretics	+400%
Drugs acting on respiratory system	+331%

Table 8 Mains variation factors of CRP concentration in women.

Variation factors	Observed variations
Leukocytes, > 10.10^6/L	+137% to +270%
BMI, >30 in adults >26 in teenagers, >24 kg/m^2 in children	+171%
Haemoglobin, <120 g/L	+156%
Oral contraceptives	+88%
Antibiotics	+365%
Drugs acting in respiratory system	+190%

References

1. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE. C-reactive protein : Structural and host defense function. Clin Chem Lab Med 1999 ; 37 : 265-270.
2. Urdal P, Borch S, Landaas S, Krutnes MB, Gogstad G, Hjortdahl P. Rapid immunometric measurement of C-reactive protein in whole blood. Clin Chem 1992; 38 : 580-4.
3. Rose PE, Johnson SA, Meakin M, Mackie PH, Stuart J. Serial study of C-reactive protein during infections in leukemia. J Clin Pathol 1981; 34: 263-6.
4. Hind CRK, Ng SC, Feng PH, Pepys MB. Serum C-reactive protein measurement in the detection of intercurrent infections in oriental patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1985; 44: 260-1.
5. Van Leuwen MA, Van Rijswijk MH, Manink J, Westra J, De Jang HJ. CRP measurements in rheumatic disorders. Protides Biol Fluids Proc Colloq 1986 ; 34: 315-8
6. Kushner I, Broder ML, Karp D. Controle of the acute phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. J Clin Invest 1978; 61: 235-42.
7. Tracy RP, Kuller LH, Psaty BM, Cuhman M, Meilahn EN, Smith N. C-reactive protein and incidence of cardiovascular disease in older women : The Rural Health Promotion Project and the Cardiovascular Health Study. Circulation 1996 ; 93 : 622-28..
8. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB *et al.* The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. N Engl J Med 1994 ; 331 : 417-24.
9. Kuller LH, Eichner JE, Orchard TJ, Grandits GA, Mc Callum L, Tracy RP, for the MRFIT Research Group. The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the Multiple Risk Intervention Trial. Am J Epidemiol 1991 ; 134 : 1266-77
10. Haverkate F, Thompson S, Duckert F. Haemostasis factors in angina pectoris, relation to gender, age and acute-phase reaction. Thromb Haemostas 1995 ; 73 : 561-7.
11. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Guegen R, Vincent-Viry M, Sass C *et al.* Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal, cohort for studying gene environment interaction in the field of cardiovascular risk : The Stanislas Cohort. Clin. Chem Lab Med 1998 ; 36 : 35-42
12. Siest G, Henny J, Schiele F. Références en Biologie Clinique. Collection Option Bio. Ed. Elsevier

13.Macy E, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. Clin Chem 1997; 43: 52-58.

14.Lammers M, Bienvenu J, Monneret G, Borque de Larea L, Gaona N, Schumann G *et al.* Evaluation of an improved immunonephelemetric assay for C-reactive protein. Clin Chem 1996 ; 42 : S165.

15.Agence du Médicament. Annales du contrôle national de qualité n°14 Novembre 1998.

16.Ribeiro MA. Levels of C-reactive protein in serum sample from healthy children and adults in Sao Paulo, Brazil. Braz J Med Biol Res 1997; 30 : 1055-59.

17.Kindmark CO. The concentration of C-reactive in sera from healthy individuals. Scan J Clin Lab Invest 1972 ; 29 : 407-11.

18.Le Carrer D, Giraud F, Siramy M, Bataille R. Protéine C-réactive : Réevaluation des valeurs normales par une technique néphélémétrique sensibilisée. Feuil Biol 1995 ; 36 : 39-42.

19.Hak AE, Stehouwer CD, Bots ML, Polderman KH, Schalkwijk CG, Westendorp IC *et al.* Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19 : 1986-1991.

20.Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue ? Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999 ; 19 : 972-978.

21.Strachan F, Noakes TD, Kotzenberg G, Nel AE, De Beer FC. C-reactive protein concentrations during long distance running. British Med J 1984; 289 : 1249-1251.

22.Watts DH, Krohn MA, Wener MH, Eschenbach DA. C-reactive protein in normal pregnancy. Obstet Gynecol 1991 ; 77 : 176-180.

23.Szpakowski M, Nowak M, Oszukowski P, Wieczorek A, Skotnicka A. C-reactive protein in normal pregancy. Ginekol Pol 1996 ; 67 : 17-20.

24.Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE. Hormone replacement therapy and increased of C-reactive protein. Circulation 1999 ; 100 : 713-716.

25.Ricoux C, Pontet M, Tresca JP, Engle R. Concentration plasmatique de la protéine C-réactive chez des patientes en situation de forte imprégnation estrogénique. Ann Biol Clin 1994; 52: 125-128.

26.Palosuo T, Husman T, Koistinen J, Aho K. C-reactive protein in population samples. Acta Med Scand 1986; 220: 175-9.

27.International federation of Clinical Chemistry. Expert Panel on theory of references values. The Theory of references values. Part 2. Selection of individuals for the production of references values. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1987 ; 22 : 203-8.

28.Shine B, De Beer FC. Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. Clin Chim Acta 1981 ; 117: 13-23.

29.Peltola H. C-reactive protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system. Lancet 1982; 1: 1980-3.

N° d'identification : PH Nancy 00 n°201

Thèse soutenue le 4 février 2000

Par Olivier Chenillot

RESUME :

La CRP, l'haptoglobine et l'orosomucoïde sont des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Nous rapportons dans la première partie de ce travail les valeurs de référence de ces 3 protéines et l'amplitude de leur variation due à des facteurs analytiques et biologiques. La population d'étude est constituée d'un échantillon d'individus de la cohorte STANISLAS âgés de 4 à 72 ans et composée de 1805 hommes et 1800 femmes. Le dosage des protéines a été réalisé par une technique immunonéphélémétrique sur BN II (Dade Behring) et notamment avec un réactif ultrasensible pour la CRP : N Latex CRP Mono

Grâce aux résultats des analyses de régression multiple, nous avons mis en évidence les paramètres biologiques, cliniques et les données sur les habitudes de vie associés à des variations de la concentration des 3 protéines. Ils expliquent selon l'âge de 13 à 40% de la variance de la CRP, de 10 à 25 % de la variance de l'haptoglobine et de 8 à 35% de la variance de l'orosomucoïde. Les principaux paramètres associés à des modifications de la concentration des 3 protéines sont les suivants : contraceptifs oraux, BMI, leucocytes, antalgiques et âge. Les paramètres significatifs nous ont servi à définir les critères d'exclusion et de partition de la population de référence.

Dans cette population de référence, la médiane de la CRP augmente avec l'âge de 0,21 à 0,61 mg/L chez les hommes et de 0,20 à 0,54 mg/L chez les femmes. La médiane de l'haptoglobine augmente avec l'âge de 0,43 à 0,85 g/L chez les hommes et de 0,61 à 0,95 g/L. La médiane de l'orosomucoïde varie chez les hommes de 0,63 à 0,71 g/L et de 0,65 à 0,71 g/L chez les femmes.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons montré que la concentration en CRP au même titre que les facteurs de risque cardiovasculaire utilisés dans les modèles prédictifs, semble être un facteur de risque et pourrait être introduite dans des nouveaux modèles.

MOTS CLES : CRP, Haptoglobine, Orosomucoïde, valeurs de référence, variations biologiques, risque cardiovasculaire

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Mr J. Henny	Laboratoire de biologie médicale du Centre de Médecine Préventive	**Expérimentale**	☐
		Bibliographique	☐
		Thème	☐

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament
4 – Alimentation – Nutrition
5 - Biologie
6 – Pratique professionnelle