

RAZANADRAKOTO Ianja Iorenantsoa

**TAUX SANGUIN DU C-LDL OBTENU PAR METHODE ENZYMATIQUE
DIRECTE ET ESTIME PAR LA FORMULE DE FRIEDEWALD :
COMPARAISON**

Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DE MEDECINE

Année : 2015

N° : 8686

**TAUX SANGUIN DU C-LDL OBTENU PAR METHODE ENZYMATIQUE
DIRECT ET ESTIME PAR LA FORMULE DE FRIEDEWALD :
COMPARAISON**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 23 Avril 2015

A Antananarivo

Par

Madame RAZANADRAKOTO Ianja Iorenantsoa

Née le 29 Mars 1990 à SOAVINANDRIANA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE (Diplôme d'Etat)

Directeur de thèse : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

MEMBRES DE JURY

Président : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Juges : Professeur RAKOTO ALSON Aimée Olivat
Professeur VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle

Rapporteur : Docteur RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

☎/Fax : 22 277 04 - ✉ : BP. 375 Antananarivo
E-mail : facultedemedecine_antananarivo@yahoo.fr

I. CONSEIL DE DIRECTION

A. DOYEN

Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana

B. VICE-DOYENS

♦ Médecine Humaine

- Troisième Cycle Long (Internat Qualifiant, Clinicat, Agrégation et Formations Professionnalisantes)

Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck

Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora

- Scolarité

- 1^{er} et 2^{ème} cycles et communication

Pr. RAHARIVELO Adeline

Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle

- 3^{ème} cycle court (stage interné, examens de clinique et thèses)

Pr. ROBINSON Annick Lalaina

Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval

- Téléenseignement, LMD et projets

Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa

- Recherche

♦ Pharmacie

Pr. SAMISON Luc Hervé

♦ Médecine Vétérinaire

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette

C. SECRETAIRE PRINCIPAL

- Administration Générale et Finances

M. RANDRIANJAFIARIMANANA Charles Bruno

II. CONSEIL D'ETABLISSEMENT

PRESIDENT

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette

III. CHEFS DE DEPARTEMENT

Biologie

Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat

Chirurgie

Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora

Médecine

Pr. RABEARIVONY Nirina

Mère et Enfant

Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao

Pharmacie

Dr. RAOELISON Guy Emmanuel

Santé Publique

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

Sciences Fondamentales et Mixtes

Pr. AHMAD Ahmad

Tête et cou

Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam

Vétérinaire

Pr. RAFATRO Herintsoa

IV. CONSEIL SCIENTIFIQUE

PRESIDENT

Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana

V. COLLEGE DES ENSEIGNANTS

A- PRESIDENT

Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense

B- ENSEIGNANTS PERMANENTS

B-1- PROFESSEURS TITULAIRES D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

DEPARTEMENT BIOLOGIE

- Immunologie

Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry

DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Dermatologie Vénérologie

Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

- Endocrinologie et métabolisme

Pr. RAMAHANDRIDONA Georges

- Néphrologie

Pr. RAJAONARIVELO Paul

Pr. RABENANTOANDRO Rakotomanantsoa

- Neurologie

Pr. TEHINDRAZANARIVELO Djacoba Alain

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Pédiatrie

Pr. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO Noëline

Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré

DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE

- Administration et Gestion Sanitaire

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO
Henriette

- Education pour la Santé

Pr. ANDRIAMANALINA Nirina Razafindrakoto

- Santé Communautaire

Pr. RANDRIANARIMANANA Dieudonné

- Santé Familiale

Pr. RANJALAHY RASOLOFOMANANA Justin

- Statistiques et Epidémiologie

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Anatomie Pathologique

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA
Nantenaina Soa

- Radiodiagnostic et Imagerie Médicale

Pr. AHMAD Ahmad

DEPARTEMENT TETE ET COU

- Ophtalmologie

Pr. ANDRIANTSOA RASOAVELONORO Violette

Pr. BERNARDIN Prisca

B-2- PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE

DEPARTEMENT BIOLOGIE

- Hématologie Biologique Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat
- Parasitologie Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa

DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Cardio-vasculaire Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès
- Chirurgie Générale Pr. RAKOTO-RATSIMBA Hery Nirina
- Chirurgie Pédiatrique Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana
- Pr. HUNALD Francis Allen
- Chirurgie Thoracique Pr. RAKOTOVAO Hanitrana Jean Louis
- Chirurgie Viscérale Pr. SAMISON Luc Hervé
- Pr. RAKOTOARIJAONA Armand Herinirina
- Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude
- Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval
- Orthopédie Traumatologie Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora
- Pr. RAKOTOTIANA Auberlin Felantsoa
- Urologie Andrologie

DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Cardiologie Pr. RABEARIVONY Nirina
- Pr. RAKOTOARIMANANA Solofonirina
- Dermatologie Vénérologie Pr. RAMAROZATOVO Lala Soavina
- Hépatogastro-Entérologie Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana
- Maladies Infectieuses Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu
- Pr. ANDRIANASOLO Radonirina Lazasoa
- Médecine Interne Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle
- Néphrologie Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck
- Pr. RANDRIAMANANTSOA Lova Narindra
- Psychiatrie Pr. RAHARIVELO Adeline
- Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense
- Radiothérapie - Oncologie Médicale Pr. RAFARAMINO RAZAKANDRAINA Florine
- Réanimation Médicale Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Gynécologie Obstétrique Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotova
- Pr. RANDRIAMBELOMANANA Joseph Anderson
- Pédiatrie Pr. ROBINSON Annick Lalaina

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Physiologie Pr. RAKOTOAMBININA Andriamahery Benjamin

DEPARTEMENT TETE ET COU

- Neurochirurgie Pr. ANDRIAMAMONJY Clément
- Pr. RABARIJAONA Mamiarisoa
- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Pharmacologie Pr. RAFATRO Herintsoa

B-3- MAITRES DE CONFERENCES

DEPARTEMENT BIOLOGIE

- Immunologie

Dr. RAJAONATAHINA Davidra Hendrison

DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

- Endocrinologie et Métabolisme
- Neurologie
- Pneumo-ptisiologie

Dr. RAKOTOMALALA Andrinirina Dave Patrick
Dr. ZODALY Noëi
Dr. RAKOTOMIZAO Joocelyn Robert
Dr. RAKOTOSON Joëlson Lovaniaina

DEPARTEMENT MERE ET ENFANT

- Gynécologie Obstétrique

Dr. RASOLONJATOVO Jean de la Croix

DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Thoracique

Dr. RAKOTOARISOA Andriamihaja Jean Claude

DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE

- Santé Publique

Dr. RANDRIAMANJAKA Jean Rémi
Dr. RATSIMBASOA Claude Arsène
Dr. RAKOTONIRINA El-C Julio

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Sciences Ecologiques, Vétérinaires
Agronomiques et Bioingenieries
- Evolution - Ecologie - Paléontologie -
Ressources Génétiques -

Dr. RAHARISON Fidiniaina Sahondra
Dr. RASAMOELINA Andriamanivo
Harentsoaniaina

DEPARTEMENT PHARMACIE

- Pharmacologie Générale
- Pharmacognosie
- Biochimie Toxicologie
- Chimie Organique et Analytique

Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David
Dr. RAOELISON Emmanuel Guy
Dr. RAJEMARIMOELISOA Clara Fredeline
Dr. RAKOTONDRAMANANA
Andriamahavola Dina Louisino

DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES

- Biophysique

Dr. RASATA Ravelo Andriamparany

B-4- ASSISTANTS

DEPARTEMENT VETERINAIRE

- Virologie
- Technologie

Dr. KOKO
Mme. RAHARIMALALA Edwige Marie Julie

DEPARTEMENT PHARMACIE

- Procédés de Production, Contrôle et
Qualité des Produits de Santé

Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA
Hanitra Myriam

C- ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

C-1- PROFESSEURS EMERITES

Pr. ANDRIANANDRASANA Arthur	Pr. RAKOTOMANGA Samuel
Pr. ANDRIANARISOA Ange Christophe Félix	Pr. RAKOTO - RATSIMAMANGA S. U
Pr. AUBRY Pierre	Pr. RAKOTOZAFY Georges
Pr. FIDISON Augustin	Pr. RAMAKAVELO Maurice Philippe
Pr. RABARIOELINA Lala	Pr. RAMONJA Jean Marie
Pr. RABENANTOANDRO Casimir	Pr. RANDRIAMAMPANDRY
Pr. RABETALIANA Desire	Pr. RANDRIANASOLO Jean Baptiste Olivier
Pr. RADESA François de Sales	Pr. RANDRIARIMANGA Ratsiatery Honoré Blaise
Pr. RAJAONA Hyacinthe	Pr. RATSIVALAKA Razafy
Pr. RAKOTOMANGA Robert	Pr. RAZANAMPARANY Marcel
	Pr. ZAFY Albert

C-2- CHARGE D'ENSEIGNEMENT

DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Générale

Pr. RAVELOSON Jean Roger

DEPARTEMENT TETE ET COU

- ORL et Chirurgie Cervico-Faciale

Pr. RAKOTO Fanomezantsoa Andriamparany

VI. SERVICES ADMINISTRATIFS

CHEFS DE SERVICES

AFFAIRES GENERALES

M. RANDRIANARISOA Rija Hanitra

COMPTABILITE

M. RATSIMBAZAFIARISON Nivoson Espérant

PERSONNEL

Mme. RAKOTOARIVELO Liva Harinivo Vonimbola

SCOLARITE

Mme. SOLOFOSAONA R. Sahondranirina

TROISIEME CYCLE LONG

Mme. RANIRISOA Voahangy

VII. IN MEMORIAM

Pr. RAMAHANDRIARIVELO Johnson	Pr. RAZAFINTSALAMA Charles
Pr. RAJAONERA Frédéric	Pr. RANAIVOARISON Milson Jérôme
Pr. ANDRIAMASOMANANA Veloson	Pr. RASOLONJATOVO Andriananja Pierre
Pr. RAKOTOSON Lucette	Pr. MANAMBELONA Justin
Pr. ANDRIANJATOVO RARISOA Jeannette	Pr. RAZAKASOA Armand Emile
Dr. RAMAROKOTO Razafindramboa	Pr. RAMIALIHARISOA Angeline
Pr. RAKOTOBÉ Alfred	Pr. RAKOTOBÉ Pascal
Pr. ANDRIAMIANDRA Aristide	Pr. RANAIVOZANANY Andrianady
Dr. RAKOTONANAHARY	Pr. RANDRIANARIVO
Pr. ANDRIANTSEHENO Raphaël	Pr. RAKOTOARIMANANA Denis Roland
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Robin	Pr. ANDRIAMANANTSARA Lambosoa
Pr. RAMANANIRINA Clarisse	Pr. RAHAROLAHY Dhels
Pr. RALANTOARITSIMBA Zhouder	Pr. ANDRIANJATOVO Jean José
Pr. RANIVOALISON Denys	Pr. ANDRIANAIVO Paul Armand
Pr. RAKOTOVAO Rivo Andriamiadana	Pr. RANDRIAMBOLOLONA RASOAZANANY Aime
Pr. RAVELOJAONA Hubert	Pr. RATOVO Fortunat
Pr. ANDRIAMAMPIHANTONA Emmanuel	Pr. GIZY Ratiambahoaka Daniel
Pr. RANDRIANONIMANDIMBY Jérôme	Pr. RASOLOFONDRAIBE Aime
Pr. RAKOTONIAINA Patrice	Dr. RAZAKAMANIRAKA Joseph
Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA Albert	Pr. ANDRIANJATOVO Joseph
Pr. RANDRIANARISOLO Raymond	Pr. RATHIRJAONA Vincent Marie
Dr. RABEDASY Henri	Pr. RAKOTOVAO Joseph Dieudonné
Pr. MAHAZOASY Ernest	Pr. KAPISY Jules Flaubert
Pr. RATSIFANDRIHAMANANA Bernard	Pr. ANDRIAMBAO Damasy Seth

DEDICACES

Je dédie cette thèse à

Jésus

« Merci Jésus pour tout ce que tu m'a offert durant toute ma vie »

Mon cher époux bien aimé, RAKOTOARIMANGA Henintsoa Hery Nirina

« Je te remercie beaucoup pour ton amour, cela m'a beaucoup aidé à réaliser ce rêve qui est devenu réalité, que Jésus soit toujours avec toi. »

Mes parents

« Merci pour votre soutien, sans vous, je ne serai pas si bien instruite. Vous m'avez apporté tant d'affection. »

Mon grand-père, dady

« Je me souviendrai toujours de la patience et de l'affection que tu m'as donné. C'est toi qui m'as incité à faire la médecine, merci Dady. »

Mon frère Tendry

« Eh, oui, je suis devenue un docteur grand frère. »

A Bebe, mes beaux-parents et à Njato

« Milles merci pour votre encouragement. »

Toute la famille, Ihary

« Je ne vous remercierai jamais assez pour vos aides et investissements. Que Dieu vous bénisse. »

Mes amis et la promotion FANASINA

« Mes sincères remerciements. »

Mes chers professeurs de l'Ecole Primaire Mialin-jaza, Collège Saint Joseph, Institut Nouvel d'Alaotra à Ambatondrazaka.

« Qui m'ont bien appris à marcher, à aller de l'avant, merci beaucoup pour vos enseignements. »

A Révérend RAMAROVAZAHA Stephan et Pasteur RAZAFIMAMONJY Dina

« Merci infiniment pour vos prières »

« Que Dieu vous protège tous. »

A NOTRE DIRECTEUR ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Docteur RASAMINDRAKOTROKA Andry

- Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Immunologie à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Ancien Ministre de la Santé Publique

« Malgré vos multiples occupations, vous nous avez consacré votre temps à nous enseigner et à présider ce travail, vous êtes toujours là pour nous écouter et corriger. Nous vous remercions de votre gentillesse et nous vous adressons tous nos respects. Que Dieu vous bénisse. »

A NOS MAITRES ET HONORABLES JUGES DE THESE

Madame le Docteur RAKOTO ALSON Aimée Olivat

- Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Hématologie Biologique à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Chef de Département Biologie

A NOS MAITRES ET HONORABLES JUGES DE THESE

Madame le Docteur VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle

- Professeur d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Médecine Interne à la Faculté de Médecine d'Antananarivo
- Vice-Doyen du 1^{er} et 2^{ème} cycles et communication de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

« C'est avec un grand plaisir que je vous remercie de votre attention pour ce travail.
Longue vie à vous. »

A NOTRE RAPPORTEUR DE THESE

Madame le Docteur RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie

- DEFS en Biologie Médicale
- MSBM en Biochimie

« Pour votre accueil bienveillant et pour la spontanéité d'accepter de diriger ce travail, merci pour vos conseils, vos corrections malgré vos occupations. Que Dieu vous protège. »

**A NOTRE MAITRE ET DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE
D'ANTANANARIVO**

Monsieur le Professeur ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana

« Notre haute considération et profond respect »

**A TOUS NOS MAITRES ET ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE
MEDECINE ET DES HOPITAUX D'ANTANANARIVO**

A TOUS LES MEDECINS ENCADREURS DES STAGES HOSPITALIERS

« Nos respectueux remerciements en reconnaissances de l'enseignement que
vous nous avez prodigué pendant ces longues années »

**A TOUS LES PERSONNELS ADMINISTRATIFS ET TECHNIQUES DE LA
FACULTE DE MEDECINE**

« Nos sincères remerciements pour vos accueils et vos services tout au long du
cursus »

**A TOUS LES MEDECINS ET PERSONNELS DU LABORATOIRE
D'ANALYSE MEDICALE DU CHU-JRA**

« Nos reconnaissances pour vos collaborations »

**A TOUS CEUX QUI, DE LOIN OU DE PRES, ONT PARTICIPE A LA
REALISATION DE CE TRAVAIL**

« Nos sincères remerciements »

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Les principales apoprotéines humaines	6
Tableau II : Les différentes classes de lipoprotéines plasmatiques humaines	10
Tableau III : Principaux récepteurs des Lipoprotéines	14
Tableau IV : Classification des mutations du récepteur des LDL, d'après Marsot	38
Tableau V : ATP II ou stratification du risque cardiovasculaire	40
Tableau VI : Gradation du Seuil de risque coronarien selon le taux d'HDL.....	53
Tableau VII : Fréquence et pourcentage des services demandeurs.....	55
Tableau VIII : Principaux renseignements cliniques	56
Tableau IX : Valeurs moyennes en mmol/l (moyennes +/- écart-type).....	57
Tableau X : Valeurs moyennes des substrats lipidiques selon l'âge (ans).....	59
Tableau XI : Comparaison entre les taux de C-LDL _D et C-LDL _F	62
Tableau XII : Comparaison entre les taux de C-LDL _D et C-LDL _F	62
Tableau XIII : Comparaison des taux de C-LDL D et C-LDL F.	63
Tableau XIV : Stratification du risque cardiovasculaire selon les taux de C-LDL	63

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Transport des lipides exogènes et endogènes	3
Figure 2 : Représentation simplifiée de la structure d'une lipoprotéine	4
Figure 3 : Configuration moléculaire d'une lipoprotéine	4
Figure 4 : Lpp par ultracentrifugation et par électrophorèse sur gel d'agarose	8
Figure 5 : Vue simplifiée du métabolisme des Lpp	11
Figure 6 : Différents domaines du récepteur des C-LDL	15
Figure 7 : Synthèse de LDLR et son action	17
Figure 8 : Internalisation cellulaire de C-LDL	20
Figure 9 : Processus d'oxydation des C-LDL	22
Figure 10 : Modification de l'activité biologique des C-LDL en fonction de leur degré d'oxydation	23
Figure 11 : Capture des C-LDL par les macrophages ; LDL ; Ac-LDL ; LDLox	24
Figure 12 : Schéma sur le devenir d'une lésion athéroscléreuse	27
Figure 13 : Résumé des réactions mises en jeu dans les méthodes de dosage direct en phase homogène	34
Figure 14 : Migration des différentes fractions de Lpp sur agarose	35
Figure 15 : PCSK9 et mutations associées à une élévation ou une diminution des taux plasmatiques de C-LDL	36
Figure 16 : Automate de Biochimie clinique BS 300® (Société Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China)	44
Figure 17 : Principe des méthodes colorimétriques enzymatiques	48
Figure 18 : Principe de la méthode de dosage du cholestérol total dans le sang	49
Figure 19 : Principe des réactions mises en jeu pour le dosage des triglycérides dans le sang	50
Figure 20 : Principe général de la méthode de dosage du C-HDL sanguin	52
Figure 21 : Corrélation selon la formule de Friedewald chez les hommes	58

Figure 22	: Corrélation selon la formule de Friedewald chez les femmes	58
Figure 23	: Corrélation selon la formule de Friedewald chez les moins de 60 ans	60
Figure 24	: Corrélation selon la formule de Friedewald chez les plus de 60 ans	60
Figure 25	: Corrélation selon la formule de Friedewald pour la population générale	61

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

ACAT	:	Acétyl Coenzyme A cholesterol transférase
A-CD	:	Alpha-cyclodextrine
Ac-LDL	:	LDL acétylées
AGL	:	Acide gras libre
Apo	:	Apoprotéines ou Apolipoprotéines
Apo AI	:	Apolipoprotéines AI
Apo AII	:	Apolipoprotéines AII
Apo AIV	:	Apolipoprotéines AIV
Apo AV	:	Apolipoprotéines AV
Apo B	:	Apolipoprotéines B
Apo B100	:	Apolipoprotéines B100
Apo B48	:	Apolipoprotéines B48
Apo CI	:	Apolipoprotéines CI
Apo CII	:	Apolipoprotéines CII
Apo CIII	:	Apolipoprotéines CIII
Apo D	:	Apolipoprotéines D
Apo E	:	Apolipoprotéines E
APOB	:	gène APOB
ATP	:	Adénosyl Triphosphate
AVC	:	Accident vasculaire cérébral
B48R	:	Récepteur B48
CE	:	Cholestérol estérifié
CETP	:	Cholesterol Ester-Transfer protein
C-IDL	:	Intermediate Density Lipoprotein Cholesterol
C-LDL	:	Cholestérol LDL ou Low Density Lipoprotein- Cholesterol
C-LDL_D	:	Cholestérol LDL obtenu par dosage direct
C-LDL_F	:	Cholestérol LDL calculé par la formule de Friedewald
C-LDL_N	:	Nouvelle équation de Friedewald
CLNE	:	Cholestérol libre non estérifié
CM	:	Chylomicron
CML	:	Cellules musculaires lisses
COOH	:	Acide carboxylique
CT	:	Cholestérol Total

C-VLDL	:	Very Low Density Lipoprotein Cholesterol
DSBmT	:	N, N-bis (4-sulfobutyl)-m-toluidine, disodium salt
EGF	:	Epidermal Growth factor
H₂O	:	Eau ou monoxyde d'hydrogène
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
HDAOS	:	N-(2-hydroxy-3sulfopropyl) 3,5-diméthoxyaniline
HLP	:	Hypolipoprotéinémie
HMG-CoA	:	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HTA	:	Hypertension artérielle
IFCC	:	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IFN	:	Interféron
LCAT	:	Lecithine-Cholestérol Acyltransférase
LDLox	:	Lipoprotéines de basse densité oxydées
LDLR	:	Récepteur de C-LDL
LH	:	Lipase hépatique
Lp(a)	:	Lipoprotéines a
LPC	:	Lysophosphatidylcholine
LPL	:	Lipoprotéine lipase
Lpp	:	Lipoprotéines
LRP	:	LDL-receptor relates Protein
MCP-1	:	Macrophage colony Protein-1
M-CSF	:	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDA	:	Malonedialdéhyde
mg/dl	:	milligram par décilitre
µl	:	micro litre
MM-LDL	:	Middly oxidized LDL
mmol/l	:	millimole par litre
MTP	:	Microsomial Triglyceride Transfert Protein
NaN	:	Azide de sodium
NAD/NADH	:	Complexe Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCEP	:	National Cholesterol Education Program
NH₂	:	groupement amine
Nm	:	Nanomètre
O₂	:	Oxygène

Ox-LDL	:	Highly Oxidized LDL
PL	:	Phospholipides
PLTP	:	Phospholipid Transfer Protein
POD	:	Peroxydase
PTA	:	Phosphotungstate de sodium et de chlorure de magnésium
R1	:	Réactif 1
R2	:	Réactif 2
RC	:	Renseignement clinique
SFBC	:	Société Française de Biologie Clinique
SR		Récepteur scavenger
TG	:	Triglycérides
TGF	:	Tumor Growth Factor
TNF	:	Tumor Necrosis factor
TOOS	:	N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3- méthylaniline
VLDLR	:	Récepteur de C-VLDL
>		Supérieur à
<		Inférieur à
> ou =		Supérieur ou égal à
< ou =		Inférieur ou égal à
α		Alpha
β		Béta
d		Densité

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de morbidité et mortalité dans le monde (une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés). On sait depuis une dizaine d'année qu'elles sont souvent liées à deux groupes de facteurs de risque cardiovasculaire bien identifiés : les facteurs non modifiables et les facteurs modifiables. Parmi les facteurs non modifiables, on cite les antécédents familiaux d'accident vasculaire précoce, l'âge et le sexe masculin. Leur présence justifie une prise en charge plus exigeante par rapport aux autres facteurs dits modifiables. A l'opposé, les anomalies du métabolisme des lipides et lipoprotéines comme l'hypercholestérolémie sont considérées comme des facteurs de risque modifiables avec l'hypertension artérielle, le tabagisme, l'obésité, le diabète sucré et la sédentarité [1, 2].

De nombreuses études épidémiologiques ont alors montré avec précision l'association entre le taux sanguin de cholestérol et plus précisément l'augmentation de la fraction de cholestérol liée aux Lipoprotéines de faible densité (cholestérol-LDL ou C-LDL) aux maladies cardio-vasculaires depuis les années 1960. En outre, la confirmation que l'hypercholestérolémie familiale est due à une mutation des gènes du récepteur des LDL remonte déjà aux années 1970 [3,4].

Il a été ainsi démontré qu'un des éléments clé dans l'athérogenèse (ou la constitution de la plaque d'athérome) est l'accumulation pré-lésionnelle de lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol (Low Density Lipoprotein-Cholesterol, ou C-LDL), au niveau des sites de prédilection de la formation des plaques d'athérome [1, 2].

On sait actuellement que le C-LDL en particulier favorise et accélère le développement de l'athérosclérose et ceci même en absence des autres facteurs de risque cardiovasculaire. Cette athérogénicité des C-LDL peut être accentuée par leur oxydation. On considère que les lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox) sont plus fortement impliquées dans l'athérosclérose puisque elles participent à la formation de stries graisseuses, et à l'évolution des lésions vers des stades irréversibles de la maladie. En effet, les LDL, en s'oxydant au cours de leur passage dans l'espace sous-endothélial, présentent de nombreuses propriétés et deviennent notamment cytotoxiques envers différents types cellulaires de la paroi vasculaire. De plus, les LDLox induisent

une augmentation des hydroperoxydes intracellulaires, pouvant participer à la toxicité des LDLox et qui peut être bloquée par des antioxydants [2-8].

Ainsi, les recommandations internationales à l'instar de la NCEP, European Societies for Cardiology, l'EAS (European Atherosclerosis Society) et l'étude Framingham placent les bilans lipidiques et en particulier le dosage du C-LDL en première ligne pour la classification et le suivi des patients à risque [6]. Par conséquent, un dosage exact et précis du C-LDL est nécessaire puisque des variations relativement minimales des concentrations peuvent entraîner des changements dans l'évaluation du risque et dans le suivi des traitements des patients. Cependant, la détermination du cholestérol LDL par calcul présente certaines limites et l'ultracentrifugation en gradient de densité, méthode de référence, est réservée aux laboratoires spécialisés ou de recherche. Depuis quelques années sont apparues des méthodes de dosage direct du cholestérol LDL, présentant d'incontestables avantages : absence de phase de prétraitement analytique et donc adaptation sur analyseurs multiparamétriques [5-11].

L'objectif de cette étude est de comparer le taux de C-LDL obtenu après détermination par une méthode directe en phase homogène par rapport à l'estimation par la formule de Friedewald en vue d'évaluer les performances analytiques et de montrer l'intérêt de l'utilisation d'une méthode par rapport à l'autre. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus nous permettraient de situer le risque cardiovasculaire de nos patients par rapport au C-LDL.

Notre étude comprend trois parties :

- Dans la première partie seront rappelées la structure, le métabolisme et les méthodes utilisées en routine pour déterminer le taux de C-LDL,
- La deuxième partie décrit les matériels et la méthode que nous avons utilisés. C'est dans cette partie que les résultats seront également présentés,
- Dans la troisième partie seront exposées les discussions, nos suggestions ainsi que la conclusion de notre travail.

PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

I. Généralités sur les lipoprotéines (Lpp)

Les lipides qui sont des molécules hydrophobes et donc insolubles dans les milieux biologiques aqueux doivent faire appel pour leur transport sanguin à deux moyens :

- Soit la liaison avec l'albumine, principale protéine plasmatique et qui est utilisée pour le transport des acides gras ;

- Soit la liaison à des transporteurs spécifiques pour tous les autres lipides. Ce sont les Apolipoprotéines ou cénapses lipoprotéiques ou apoprotéines (Apos)

L'association lipides et Apos aboutit à la formation de **lipoprotéines (Lpp)** qui constituent ainsi les transporteurs de lipides dans les milieux extra cellulaires [2, 5, 7, 8]

(figure 1) :

- de l'intestin (lieu d'absorption des lipides exogènes) vers le foie,
- et du foie (lieu de biosynthèse endogène et de dégradation) vers les tissus périphériques (les tissus adipeux principalement où les lipides sont stockés ou les muscles où les lipides seront utilisés comme substrats énergétiques lors des périodes de pénurie d'énergie)

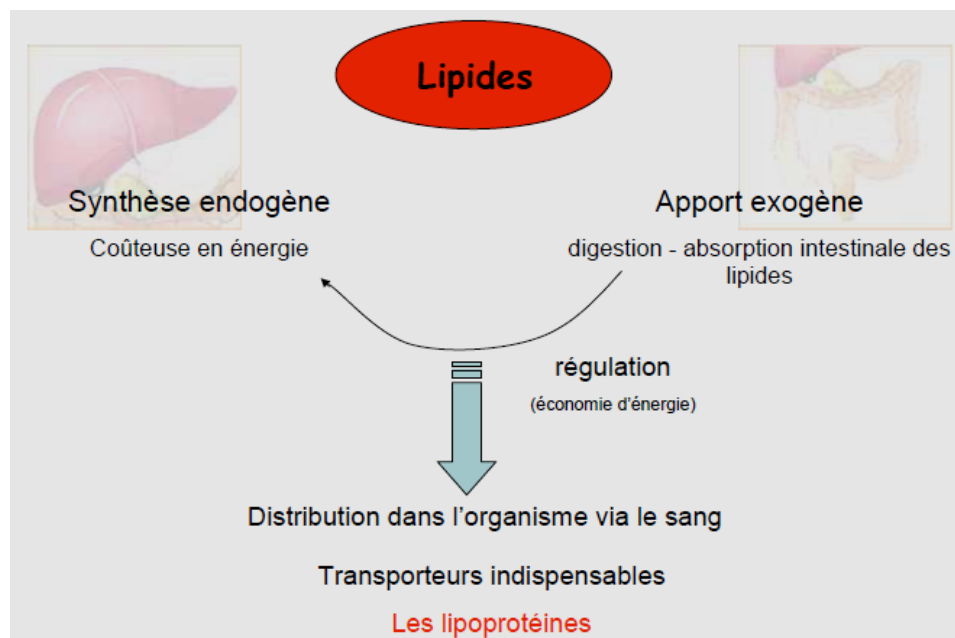


Figure 1 : Transport des lipides exogènes et endogènes [5]

I.1. Structure générale des lipoprotéines (Lpp)

Les Lpp [1, 2, 7, 8, 11, 12] sont des édifices macromoléculaires, instables in vivo et qui subissent des remaniements permanents associant synthèse, dégradation, et retrait du plasma. Elles constituent des complexes moléculaires organisés en micelles et qui sont stabilisés par des protéines amphiphiles du sérum/plasma : les Apos (**figures 2 et 3**).

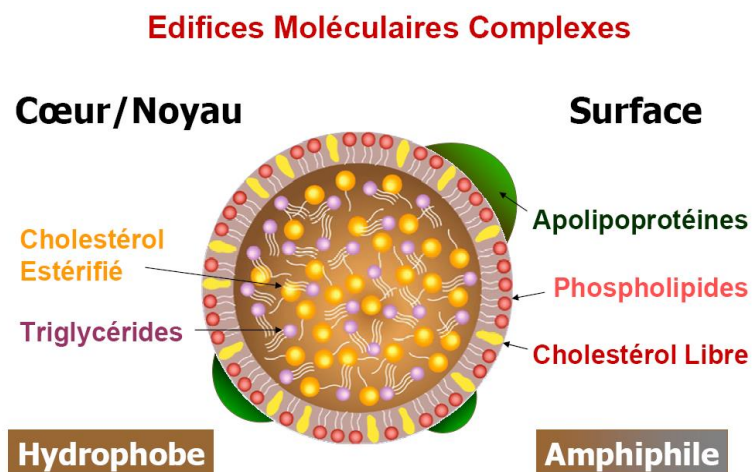


Figure 2: Représentation simplifiée de la structure d'une lipoprotéine [8]

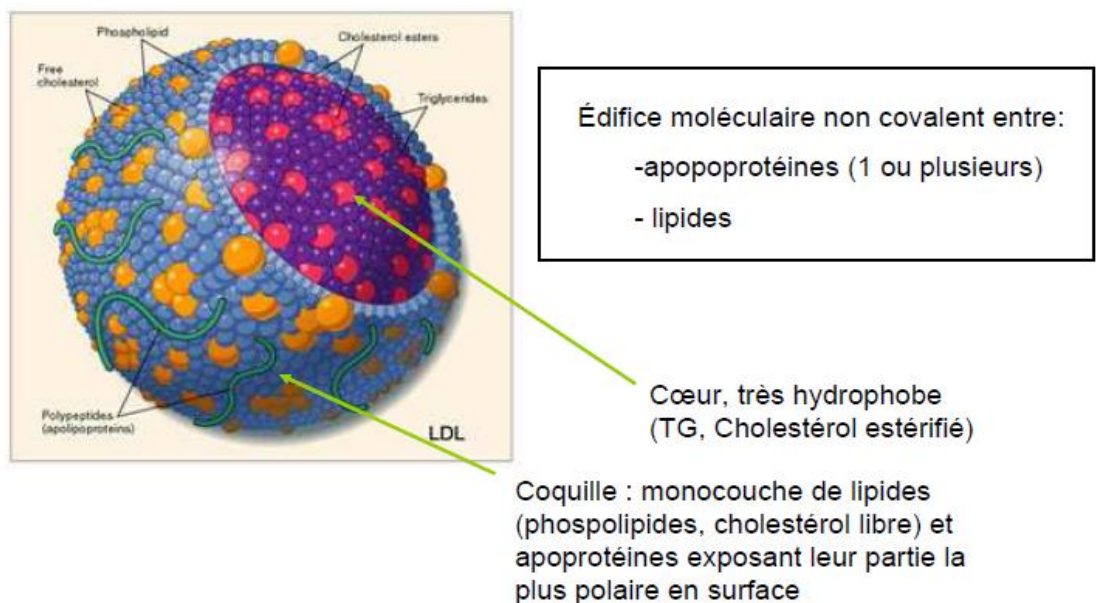


Figure 3 : Configuration moléculaire d'une lipoprotéine [8]

Une Lpp possède une structure sphérique avec :

- Un noyau (ou cœur ou core) contenant les lipides hydrophobes (Triglycérides ou TG et Cholestérol Estérifié ou CE)
- Une enveloppe (ou surface) avec les Apos et les lipides les plus hydrophiles (Phospholipides ou PL et Cholestérol libre non estérifié ou CLNE)

Cette monocouche lipidique à la surface des Lpp leur confère la propriété de solubilité dans les liquides aqueux (plasma, lymphe et liquide interstitiel) nécessaire au transport des lipides hydrophobes.

I.1.1. Les apoprotéines humaines

Les Apos sont des protéines, synthétisées principalement par le foie et l'intestin. Elles possèdent des propriétés fondamentales leur permettant de contrôler le métabolisme des Lpp [1, 2, 5, 7, 8, 12, 13] :

- Des propriétés structurales qui permettent de stabiliser, d'assurer la cohésion des particules lipoprotéiques ainsi que la «solubilité» des lipoprotéines (Exemple: Apo B constitue l'armature fixe des lipoprotéines de grande taille).
- Des propriétés fonctionnelles : les Apos ont un rôle clé dans le métabolisme des LPP du fait de leur interaction avec les autres protéines impliquées :
- Régulation de certaines enzymes : elles agissent à la surface des Lpp comme des cofacteurs ou des activateurs de nombreuses enzymes plasmatiques
- Reconnaissance de récepteurs spécifiques : elles servent de ligand aux protéoglycanes endothéliaux et aux récepteurs cellulaires spécifiques.

Bien caractérisées, les Apos sont classées selon une nomenclature alphabétique. Leurs identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et leurs principales fonctions sont résumées dans le **Tableau I**.

Tableau I : Les principales apoprotéines humaines [1]

NOM (Identité)	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTIONS
Apo AI	Foie	HDL	Structurale, Efflux de cholestérol, Activation LCAT
Apo AII	Foie	HDL	Structurale, efflux de cholestérol, Activateur/inhibiteur LH
Apo AIV	Intestin	Chylomicron	Transport reverse du cholestérol, Activation LCAT
Apo AV	Foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
Apo B100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurale, synthèse et sécrétion de VLDL, liaison au récepteur LDLR
Apo B48	Intestin	Chylomicron	Structurale, synthèse et sécrétion de chylomicrons, liaison au récepteur B48R
Apo CI	Foie (intestin)	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibition CETP, activation LCAT, inhibition liaison à LDLR, LRP, VLDLR
Apo CII	Foie (intestin)	Chylomicron, VLDL, HDL	Activation LPL
Apo CIII	Foie (intestin)	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibition LPL Inhibition de la captation hépatique de lipoprotéines riches en triglycérides
Apo D (AIII)	Foie, intestin, rate, cerveau, pancréas, surrénales, reins	HDL, VLDL, LDL	Transport reverse du cholestérol (?)
Apo E	Foie, macrophage, cerveau	Chylomicron, VLDL, IDL, HDL	Liaison au récepteur LDLR et LRP
Apo F	Foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibition CETP
Apo J	Foie ?	HDL	Anti-inflammatoire
(Clusterine)			

I.1.2. Classification de Lipoprotéines (Lpp)

Les Lpp sont des molécules très hétérogènes par leur taille et par leur contenu lipido-protéiques caractérisées par une spécialité de répartition (chaque Lpp transporte majoritairement un constituant lipidique) et une spécificité de répartition (les différentes apos ne sont pas présentes dans toutes les Lpp)

De nombreuses techniques permettent d'isoler les lipoprotéines à partir du plasma [2, 7-9, 13-17].

I.1.2.1. L'ultracentrifugation

Elle sépare les principales Lpp en cinq groupes selon leur densité [7, 9, 15]. Ainsi, dans un sérum normal à jeun, les Lpp se répartissent dans un gradient de concentration saline en trois principales zones de densité (dans un ordre croissant en densité et décroissant en taille) :

1. Les VLDL (Very Low Density Lipoproteins);
2. Les LDL (Low Density Lipoproteins);
3. Les HDL (High Density Lipoproteins) qui sont subdivisées ensuite en trois zones d'inégale importance :
 - Les HDL1 les plus légères représentent une fraction mineure contenant une entité lipoprotéinique appelée Lp(a)
 - les HDL2 plus denses ont une concentration variable. Cette fraction est habituellement beaucoup plus importante chez l'enfant et la femme que chez l'homme
 - les HDL3 représentent la fraction la plus dense et quantitativement la plus importante des HDL, de concentration à peu près identique dans les deux sexes.
4. Une zone de faible amplitude appelée IDL (Intermediate Density Lipoproteins) représente une sous-fraction de densité intermédiaire entre celle des C-LDL et des VLDL quantitativement mineure à jeun.
5. Les chylomicrons s'isolent à une densité inférieure à celle des VLDL. Ils existent chez le sujet normal pendant les périodes post-prandiales expliquant la lactescence du sérum.

I.1.2.2. L'électrophorèse sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide

Plus rarement utilisée [7, 9, 15], elle sépare les Lpp en fonction de leur charge électrique et on distingue les α , pré β et β lipoprotéines.

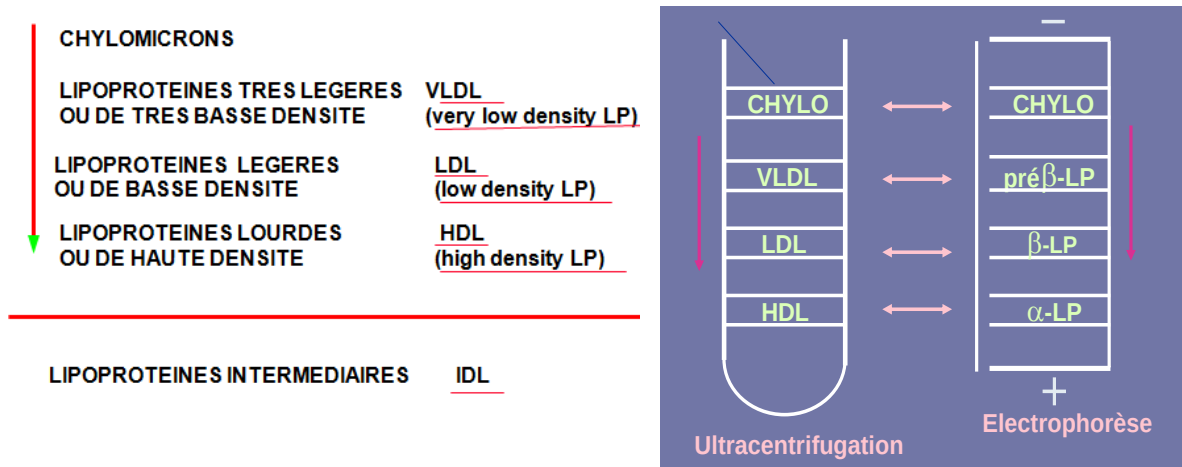


Figure 4 : Lpp par ultracentrifugation et par électrophorèse sur gel d'agarose [1]

I.1.2.3. Une classification selon la nature de l'Apo constituant de la Lpp.

On distingue alors :

- Les lipoprotéines contenant l'Apo B (chylomicrons, VLDL, IDL et C-LDL) reconnus pour leurs propriétés athérogènes,
- Les particules lipoprotéiques contenant l'Apo A (pré β HDL, HDL2 et HDL3) qui sont anti athérogènes [13].

I.1.3. Les différentes classes de lipoprotéines plasmatiques humaines et leurs caractéristiques physiques et chimiques

Les lipoprotéines sont classées [1, 2, 5, 7, 8, 15] selon leurs origines, leurs compositions chimiques (quantité et nature des lipides et des protéines) et leurs propriétés physiques (dimension, mobilité électrophorétique, densité). On distingue (**Tableau II**) :

I.1.3.1. Les chylomicrons

Ce sont des Lpp de très grande taille synthétisés par les entérocytes pendant les périodes de digestion. Leur densité est très faible ($< 0,94$ g/ml) ainsi que leur mobilité électrophorétique. Ils contiennent principalement l'Apo **B48** et les Apos E, C et sont très riches en triglycérides (80 – 90%).

I.1.3.2. Le bloc VLDL-LDL

Les Lpp plus petites que les chylomicrons sont synthétisées de façon continue par les hépatocytes. Leur densité est dite intermédiaire (0,94 – 1,006 g/ml). Leur mobilité électrophorétique intermédiaire est à l'origine de leur dénomination pré- β lipoprotéines). Les VLDL sont caractérisées par leur contenu en Apos (**B100**, E, C) et leur contenu en TG (50 – 60%).

L'hydrolyse de ces VLDL par la lipase hépatique aboutit aux IDL et ensuite aux LDL qui sont les plus petites et plus denses.

Les C-LDL (Low Density Lipoproteins) ont une densité comprise entre 1,019 – 1,063 g/ml. Leur mobilité électrophorétique est lente (d'où l'appellation β -lipoprotéines). Elles ne contiennent du point de vue Apo que l'Apo B100 et contiennent en majeure partie du cholestérol (37% CE).

I.1.3.3. Les HDL (lipoprotéines alpha)

Ce sont les lipoprotéines plus denses (densité comprise entre 1,063 – 1,210 g/ml) et dont l'intégrité est assurée par les Apo A1 et 2.

Appelées aussi alpha-lipoprotéines à cause de leur mobilité rapide à l'électrophorèse et leur petite taille. Elles contiennent surtout des phospholipides (22%) et environ 25% du cholestérol plasmatique. Elles sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol et dont le mécanisme de transport est facilité par un récepteur, le récepteur SRB-I (Scavenger Receptor type B-I).

C'est un processus qui permet la re-circulation du cholestérol constituant ainsi le mécanisme clé du transport inverse du cholestérol. Le cholestérol pourra alors être éliminé dans la bile ou être converti en acides biliaires.

I.1.3.4. Lipoprotéine(a) – Lp(a)

La lipoprotéine Lp(a) représente une classe particulière composée d'une molécule d'apo (a) reliée par un pont disulfure à l'apo B d'une molécule C-LDL [2]. Cette lipoprotéine connaît un intérêt grandissant depuis que plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'elle est associée à un athérome prématuré et qu'elle constitue un facteur de risque indépendant et non modifiable.

Tableau II : Les différentes classes de lipoprotéines plasmatiques humaines [5]

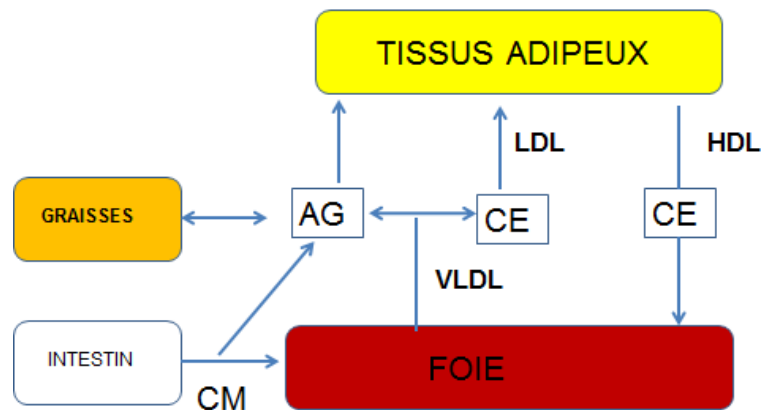
Type de lipoprotéine	Densité (g/ml)	Mobilité électrophorétique	Taille (nm)	Composition (EC/TAG) (%)	Principales Apolipoprotéines (Apo)
Chylomicrons	0,93	Pas de migration	75-1200	1/19	B48, E, C
VLDL	0,93-1,006	Pré β	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	1,006-1,019	Pré β lent	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	1,019-1,063	β	18-27	1/0,23	B100
HDL2	1,063-1,125	α	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	1,125-1,210	α	7-9	1/0,19	AI, AII, C
Préβ HDL	1,210-1,250	Pré β	< 7	ND	AI
Lp(a)	1,040-1,115		25		B100, (a)

I.2. Vue générale du métabolisme des lipoprotéines

Ce métabolisme [1, 2, 7-9, 11] implique plusieurs éléments et comprend plusieurs voies métaboliques (**figure 5**) :

- **Voie ou Circuit hépatofuge** qui permet de transporter les TG et le Cholestérol nouvellement synthétisés par le foie vers les tissus périphériques. Ce transport est assuré par les VLDL et leurs produits de transformation (IDL et C-LDL)
- **Voie ou Circuit hépatopète** qui assure le transport reverse ou inverse du cholestérol. Assurée par les C-HDL, cette voie permet de ramener le cholestérol excédentaire des tissus vers le foie où il sera éliminé tel quel ou après transformation en acides biliaires.

Entre les deux voies, des échanges d'Apos et de lipides ont toujours lieu.



AG : Acide gras; CE : cholestérol estérifié; CM : Chylomicrons

Figure 5 : Vue simplifiée du métabolisme des Lpp [11]

I.2.1. Les tissus

Pour le métabolisme des Lpp, il est essentiel de distinguer trois types de tissus :

- L'intestin qui permet l'absorption des lipides alimentaires et leur intégration dans des LPP de grande taille (CM)
- Le foie constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme
 - Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale et intègre ces lipides dans de nouvelles Lpp afin de les redistribuer aux tissus périphériques. C'est la voie centrifuge ou hépatofuge impliquant les VLDL, les IDL et les C-LDL.
 - Il permet l'élimination du Cholestérol non métabolisé par les tissus périphérique. C'est la voie centripète ou hépatopète qui implique C-HDL
- Les Tissus périphériques (tissus adipeux, tissus musculaires) captent les lipides principalement le cholestérol et les acides gras libres non estérifiés par le biais de l'endocytose et de l'hydrolyse des lipoprotéines d'origine hépatique ou intestinale

I.2.2. Les protéines de transfert

Elles accélèrent l'échange de lipides entre Lpp et récepteurs [2, 7, 16]. Elles sont nombreuses mais les plus importantes sont :

I.2.2.1. La CETP (Cholesterol Ester-Transfer Protein)

Elle catalyse le transfert réciproque des molécules des TG et d'esters de cholestérol entre les C-HDL et les chylomicrons ou les VLDL. Les esters de cholestérol sont transférés des C-HDL vers les VLDL et les TG dans le sens inverse. La synthèse a lieu principalement au niveau hépatique mais également dans l'intestin, le tissu adipeux et les surrénales.

Elle est surtout associée aux C-HDL dont elle modifie la composition en réduisant le ratio cholestérol/triglycérides. Au cours de ce processus certaines C-HDL peuvent être déstabilisées et perdre une molécule d'apo A-I qui forme une C-HDL naissante.

I.2.2.2. La PLTP (Phospholipid Transfer Protein)

Elle assure le transfert rapide et spécifique des phospholipides entre les lipoprotéines. Son expression est ubiquitaire suggérant des fonctions dans de nombreuses voies métaboliques.

I.2.2.3. La MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein)

Contrairement à la CETP et à la PLTP (qui sont présentes dans le compartiment sanguin), la MTP est une protéine intracellulaire. Elle assure, dans les tissus de synthèse des lipoprotéines (foie et intestin) la formation intracellulaire des lipoprotéines. Elle catalyse la formation des VLDL en réunissant l'Apo B sécrétée par le réticulum endoplasmique, les triglycérides endogènes et des esters de cholestérol. Dans les déficits congénitaux de cette protéine (abetalipoprotéinémie) les concentrations de VLDL, LDL et d'Apo B plasmatiques sont effondrées.

I.2.3- Les enzymes

I.2.3.1. Lipoprotéine lipase

Enzyme synthétisée par les cellules musculaires et adipeuse, la Lipoprotéine Lipase de la paroi vasculaire catalyse à la fois :

- la dégradation des TG des chylomicrons en Acides gras libres et en glycérol qui entreront dans les tissus adipeux pour être estérifiés ;

- et, la dégradation des VLDL en IDL.

Cette enzyme nécessite la présence d'un cofacteur (l'héparine) et est activée grâce à l'Apo CII contenue dans le complexe chylomicrons et VLDL.

I.2.3.2. Lipase hépatique

La Lipase Hépatique (LH) ou triglycéride lipase hépatique (TGLH) est une enzyme synthétisée par les hépatocytes et exprimée dans le compartiment vasculaire. Elle a une action lipolytique sur les Lpp riches en TG (VLDL, IDL et remnants de chylomicrons) et sur les HDL. Elle est essentielle dans la formation des pré- β HDL et pour l'inter conversion des sous-fractions de C-HDL.

I.2.3.3. Lécithine-cholestérol acyltransférase ou LCAT

La LCAT à la surface des C-HDL est d'abord synthétisée par le foie. Puis, dans le compartiment sanguin, elle catalyse l'estérification du cholestérol libre, avec les acides gras de la phosphatidyl choline (lécithine). Le cholestérol ester formé au cours de cette réaction est incorporé dans le corps de la lipoprotéine. Les apolipoprotéines A-I, A-IV et CI activent cette réaction [2, 7, 8, 16, 17].

I.2.4- Les récepteurs

I.2.4.1. Les différents types de récepteurs

Différents récepteurs existent [2, 7, 18-20]. Goldstein [18] a été le premier à décrire qu'une forme modifiée de LDL pouvait être capturée plus rapidement par les macrophages et transformer ces derniers en cellules spumeuses. Ses travaux, in vitro, concernaient des LDL acétylées (Ac-LDL). Ce récepteur aux Ac-LDL (Ac-LDL-R) possède deux caractéristiques :

- Il permet une capture plus rapide des LDL acétylées par les macrophages ;
- Il ne possède pas de mécanisme de rétrocontrôle et continue à internaliser des LDL jusqu'à engorgement de la cellule par les esters de cholestérol.

Il n'est pas prouvé que l'acétylation des LDL ait lieu in vivo. Néanmoins, le récepteur est capable de reconnaître les LDL oxydées. Depuis ces travaux, d'autres récepteurs ont été découverts. Des études ont en effet montré que les récepteurs aux Ac-LDL ne pouvaient pas être seuls responsables de la capture de toutes les LDL. Les principaux

récepteurs de Lpp sont nombreux (**tableau III**) et sont généralement classés en 3 grandes catégories.

Tableau III : Principaux récepteurs des Lipoprotéines [21]

Nom	Famille	Principaux tissus	Lipoprotéine	Ligand
LDLR	LDL- récepteur	Foie, cœur, muscle	LDL, VLDL, IDL, chylo remnants	Apo B100, ApoE
LRP	LDL- récepteur	foie, cerveau, poumon	VLDL, IDL, chylo remnants	ApoE
SR-B1	Scavenger récepteur classe B	foie, tissus	HDL, VLDL, LDL	Apo AI, Apo B
SR-AI/AII	Scavenger récepteur classe A	Macrophages, endothélium	LDL oxydées acéthylées	Polyanions
SREC		Endothélium		
CD 36	Scavenger récepteur classe B	Macrophages, endothélium, plaquettes, adipocytes, cellules musculaires lisses	LDL modérément oxydées	
LOXI	Lectine	Macrophages, endothélium	LDL oxydées	

I.2.4.1.1. Récepteurs des C-LDL (LDL receptor ou LDLR ou R-LDL)

Les cellules qui ont besoin de cholestérol pour leur métabolisme, expriment à leur surface une protéine réceptrice capable de reconnaître les LDL, puis de les faire entrer dans la cellule (internalisation) où elles sont digérées par les lysosomes libérant le cholestérol que la cellule va utiliser.

1.2.4.1.1.1. Structure

Ce récepteur est une glycoprotéine de 839 acides aminés pesant 160000 daltons [20]. De l'extrémité NH₂-terminale à l'extrémité COOH-terminale, on distingue cinq domaines (**Figure 6**) :

Récepteur des LDL

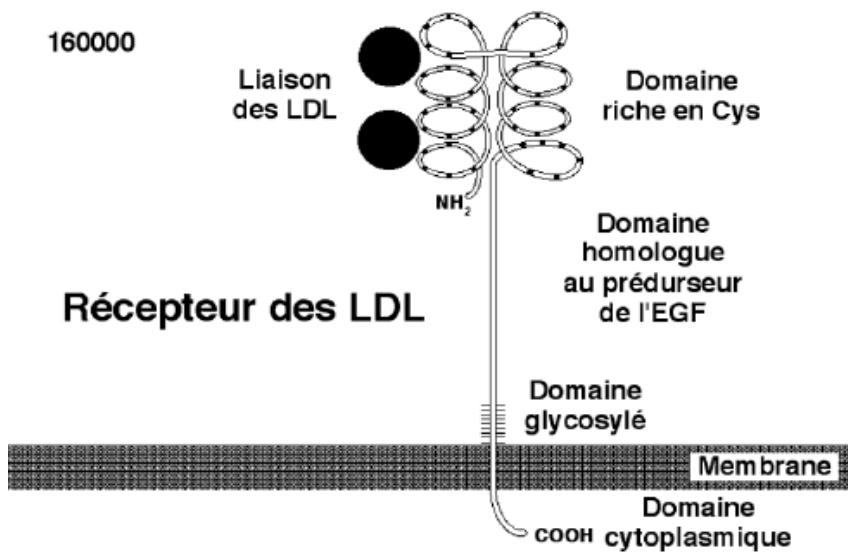


Figure 6 : Différents domaines du récepteur des C-LDL [20]

- **Domaine de liaison**, riche en cystéine comprenant quatre sites de fixation du ligand C-LDL. Il en résulte que la surface de ce domaine de liaison présente des sites riches en acides aminés porteurs de charges négatives au pH du sang [5, 18]. Ces charges permettent la liaison spécifique des LDL.
- **Domaine homologue** avec le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) : les récepteurs présents à la surface des membranes cellulaires ont une fonction commune propre à la reconnaissance d'un ligand spécifique du milieu extracellulaire. Cette fonction résulte de l'expression spécifique d'une structure issue du gène de chaque récepteur : il est donc logique que ces gènes présentent une homologie et codent pour des protéines également homologues.
- **Domaine de liaison de chaînons glucidiques (domaine glycosylé)** : La surface extérieure de la membrane plasmique d'une cellule est tapissée de glycoprotéines et de

glycolipides qui forment une zone hydrophile en avant de la membrane et facilite le contact entre les nutriments ou les molécules informationnelles et la membrane proprement dite.

- **Domaine transmembranaire :** le récepteur des C-LDL doit présenter son site de fixation dans le liquide extracellulaire, sur la face externe de la membrane plasmique. Il doit donc être lié à cette membrane et orienté spécifiquement vers l'extérieur. Cette fixation est possible grâce à des acides aminés hydrophobes ou apolaires et se fait de telle manière que le récepteur ait une extrémité de chaque côté de la membrane : c'est une protéine intrinsèque.

- **Domaine cytoplasmique :** ce domaine est riche en acides aminés polaires, chargés électriquement qui participent à la structure tertiaire du domaine intra cytoplasmique, mais aussi aux interactions électrostatiques avec le cytosquelette.

1.2.4.1.1.2. Caractéristiques

Le LDLR [19, 20] est synthétisé dans la cellule (**Figure 7**) et après une glycosylation, il migre au niveau membranaire dans des zones spécialisées appelées « puits recouverts ». Le LDLR reconnaît l'Apo B (associée aux LDL) et l'apo E des LDL et IDL mais il ne reconnaît pas l'Apo B48.

Il bloque l'activité de l'HMG-CoA reductase, l'enzyme limitante de la synthèse endogène du cholestérol à partir de l'acétate, il active l'ACAT (Acetyl Coenzyme A Cholesterol Transferase) permettant ainsi de stocker l'excès de cholestérol libre sous forme d'esters et il réprime l'expression du gène du LDL-récepteur.

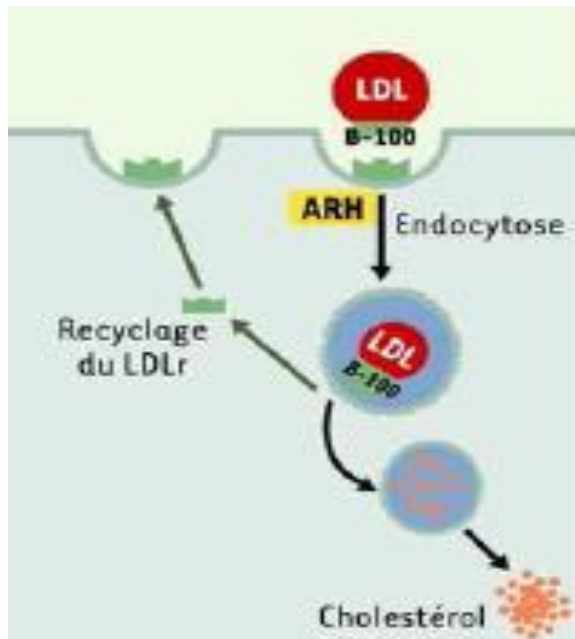


Figure 7 : Synthèse de LDLR et son action [19]

L'interaction du récepteur avec une Lpp stimule l'internalisation du complexe ainsi formé. Les Lpp captées par le récepteur sont dégradées et leurs différents composants sont recyclés. Les esters de cholestérol ainsi libérés sont hydrolysés en cholestérol libre dont le niveau intracellulaire provoque une série de réaction de régulation.

I.2.4.1.2. Récepteurs des remnants de chylomicrons et VLDL

Appelés **LRP** (LDL-receptor Related Protein) **ou récepteurs E**, ce sont des récepteurs à expression ubiquitaire (mais surtout au niveau du foie). Ils reconnaissent l'Apo E mais pas l'Apo B100, la LH et LPL sous forme dimérique lorsqu'elles sont associées aux IDL et résidus de chylomicrons.

Les remnants qui proviennent de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL sont rapidement captées par le foie par l'intermédiaire de l'apo E et ces récepteurs cellulaires spécifiques contribuant ainsi à l'épuration de ces remnants.

I.2.4.1.3. Récepteurs éboueurs (Scavenger Receptor)

1.2.4.1.3.1. Les récepteurs “ poubelles ” de classe A

Ces récepteurs dont il existe différents types sont essentiellement exprimés à la surface des macrophages où ils peuvent capter les LDL natives et essentiellement les LDL modifiées par des processus d'oxydation.

1.2.4.1.3.2. Un récepteur ABC-A1 est un transporteur transmembranaire dépendant de l'ATP et permet aux HDL naissantes de capter le cholestérol libre des cellules des parois artérielles et des macrophages.

Deux récepteurs de la même classe ont été décrits récemment, ABC-C5 et ABC-G8 au niveau des entérocytes. Dans les modèles expérimentaux, l'altération de ce récepteur inhibe les mécanismes d'efflux cellulaire de cholestérol.

1.2.4.1.3.3. Récepteurs “ scavenger ” de classe B

Ces récepteurs et en particulier le type 1 (SR-B1) interviennent dans le métabolisme des HDL pour contrôler l'épuration élective des HDL au niveau hépatique. Ils permettent essentiellement le transfert des esters de cholestérol dans la cellule hépatique sans internalisation des HDL et de l'apo A-I. Le C-HDL dépourvu d'ester de cholestérol est remise en circulation [19-21].

I.2.4.2. Régulation des récepteurs

Les récepteurs "scavengers" présentent par contre une particularité importante : contrairement [19-21] aux LDL-R, ils ne sont pas régulés par le contenu intracellulaire de cholestérol. Ils sont ainsi toujours présents et fonctionnels à la surface des cellules, ce qui peut conduire à un excès d'accumulation lipidique [22] à l'origine des cellules spumeuses, point de départ de l'athérosclérose. Cependant leur expression peut être modifiée par certaines cytokines [18]. Ils subissent un rétrocontrôle négatif par les lymphokines, le TNF- α , le TGF- β , l'IFN- γ et un rétrocontrôle positif par le M-CSF, le PDGF.

II. Les LDL (Low Density Lipoprotein)

II.1. Structure, composition et métabolisme

Les C-LDL [2, 7, 8, 14] ou lipoprotéines légères sont avec les IDL (Intermediary Density Lipoprotein) des Lpp contenant l'Apo B100 et qui proviennent de la transformation des VLDL (Very Low Density Lipoproteins). Elles sont caractérisées par :

- Une densité comprise entre 1,019 – 1,063
- Une mobilité lente à l'électrophorèse d'où l'appellation β -lipoprotéines
- Leur contenu majeur en cholestérol (37% CE)

Cette densité est directement liée à leur contenu en TG et permet ainsi de distinguer trois sous classes de C-LDL :

- LDL I : $1,020 < d < 1,035$
- LDL II : $1,035 < d < 1,045$
- LDL III : $1,045 < d < 1,060$

Sur le plan qualitatif, les C-LDL petites et denses sont classées en 2 phénotypes : A et B.

- Le phénotype A est constitué de C-LDL de densité 1,025 – 1,044, de diamètre $> 25,5$ nm.
- Le phénotype B est constitué de C-LDL de densité $> 1,044 – 1,060$, de diamètre $< 25,5$ nm. Ces LDL ont une affinité faible pour les récepteurs cellulaires. Elles sont moins reconnues par les récepteurs B/E, plus sensibles aux processus d'oxydation d'où une accumulation dans les macrophages à l'origine de la formation de la plaque d'athérome et donc un risque élevé de coronaropathie.

Les C-LDL ont pour fonction principale de transporter aux tissus périphériques les constituants lipidiques (cholestérol) dont ils ont besoin (**figure 8**). En effet, toute cellule ayant besoin de cholestérol pour son métabolisme exprime à sa surface les récepteurs de C-LDL permettant la fixation puis la pénétration dans les cellules par endocytose. Les C-LDL sont digérées par les lysosomes libérant leur contenu en cholestérol esterifié (CE) qui est ensuite hydrolysé en cholestérol libre par une lipase acide lysosomale. Le

cholestérol libre libéré peut être utilisé par les cellules pour la structure de membranes cellulaires et tissus nerveux.

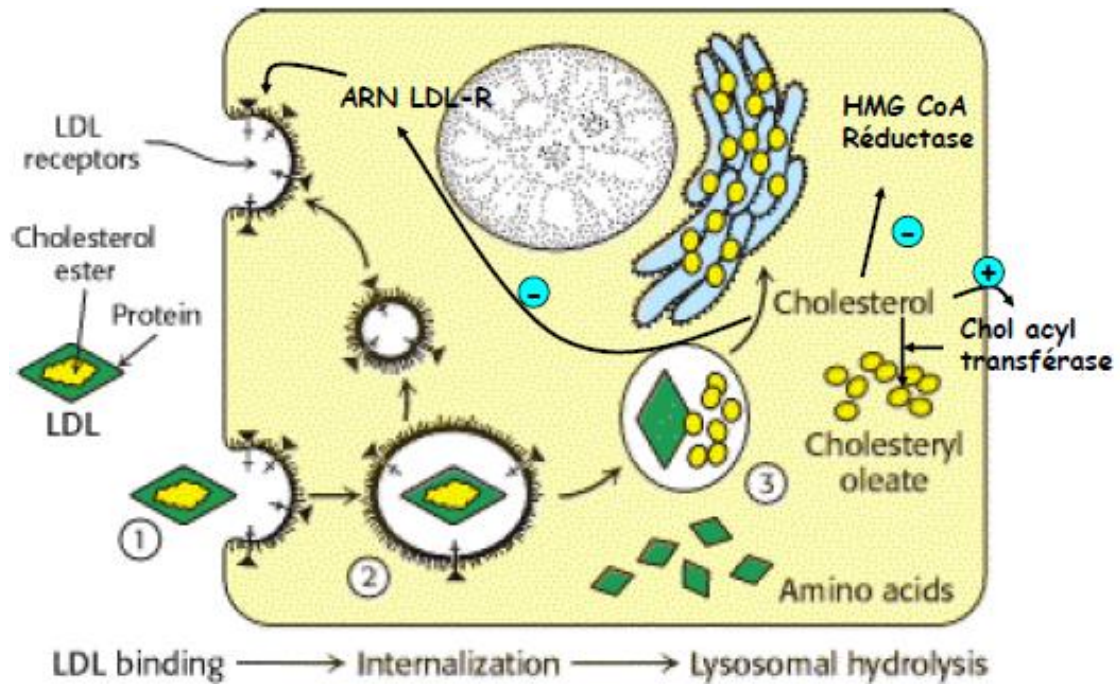


Figure 8 : Internalisation cellulaire de C-LDL [8]

À l'état normal, le catabolisme des C-LDL est lent (durée de vie dépassant plusieurs jours) et la majorité de ces C-LDL est captée par le foie (seul organe capable d'éliminer le cholestérol), puis éliminée par l'intermédiaire des récepteurs B/E. Il s'agit d'un processus antiathérogène car l'absorption des C-LDL par leurs récepteurs diminue la synthèse intracellulaire de cholestérol. Elle limite l'expression de ce récepteur à la surface des cellules, protégeant ainsi les cellules d'une absorption excessive de cholestérol.

II.2. C- LDL et athérosclérose

II.2.1. Oxydation des C-LDL

L'oxydation des LDL est une étape déterminante pour la poursuite du processus d'athérogénèse. Les LDL oxydées sont issues de la modification des LDL par des radicaux libres [2, 4-8, 19-29].

II.2.1.1. Les différentes étapes du processus d'oxydation

Il s'agit d'un phénomène complexe qui comporte plusieurs étapes (quatre au total) (**figure 9**) [2, 4-8, 21-27].

II.2.1.1.1. Phase d'initiation

Appelée aussi phase d'attaque, les radicaux libres s'attaquent aux lipides, surtout les acides gras polyinsaturés. Ils sont particulièrement vulnérables du fait de leurs doubles liaisons. Il est probable que la source des radicaux libres responsables soit intracellulaire. Mais les enzymes responsables ne sont pas encore précisément connues, même si certaines, comme la 15-lipoxygénase, apparaissent comme des candidats potentiels.

II.2.1.1.2. Deuxième étape

Il y a propagation de ces modifications chimiques aux autres lipides. Cette propagation s'effectue selon une réaction en chaîne avec attaque des acides gras dans un ordre aléatoire. Les détails précis de ces réactions sont, en grande partie, inconnus.

II.2.1.1.3. Troisième étape

La propagation des modifications chimiques entraîne la dégradation et la libération de fragments lipidiques. Il y a formation de peroxydes lipidiques dont l'accumulation peut être directement cytotoxique avec leurs produits de dégradation que sont les aldéhydes comme le malonedialdéhyde (MDA). A noter que, l'acide linoléique des LDL (92 % des acides gras polyinsaturés des LDL) peut être complètement oxydé sans qu'il y ait formation de MDA.

II.2.1.1.4. Quatrième étape

La formation des aldéhydes et leur liaison à la partie protéinique des C-LDL (Apo B100), va modifier son activité physiologique puis sa dégradation.

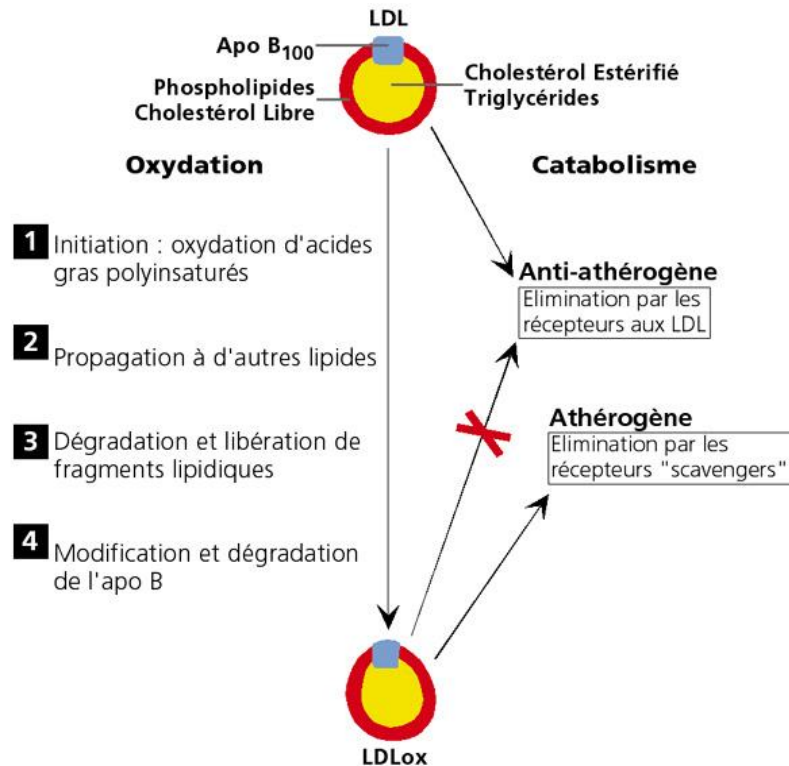


Figure 9 : Processus d'oxydation des C-LDL [24]

II.2.1.2. Les différents types de C-LDL oxydées

Les processus d'oxydation des LDL sont des phénomènes complexes [19, 27-29] puisque la partie protéique et la partie lipidique de la particule peuvent être oxydées. Il existe une grande variété de particules correspondant aux LDL oxydées (LDLox). Outre leur diversité structurale, les LDLox sont caractérisées par des différences fonctionnelles. On distingue (**figure 10**) :

- Les MM-LDL (pour Mildly oxidized LDL) qui entraînent la sécrétion de facteurs de l'inflammation.
- Les Ox-LDL (highly Oxidized LDL) qui sont cytotoxiques et conduisent à la formation de cellules spumeuses.

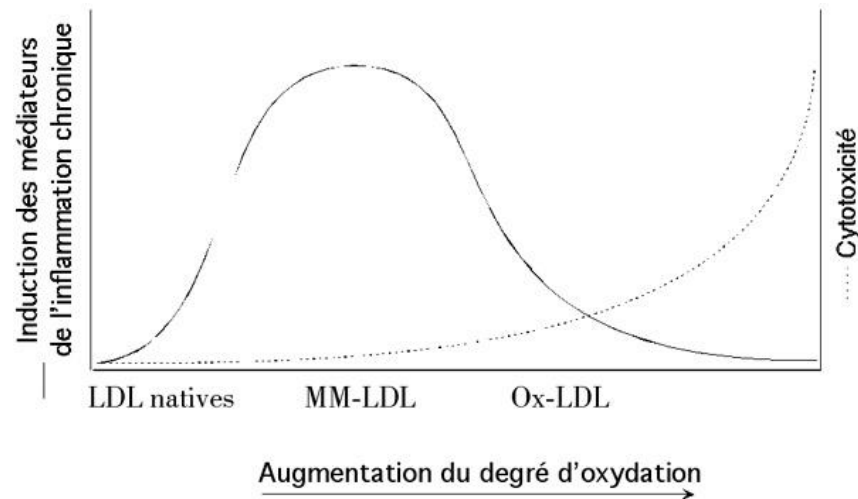


Figure 10 : Modification de l'activité biologique des LDL en fonction de leur degré d'oxydation [27]

- La ligne continue représente le degré d'induction des médiateurs de l'inflammation chronique
- La ligne en pointillés représente le degré de cytotoxicité.

(MM-LDL: Mildly oxidized LDL; Ox-LDL : highly oxidized LDL)

II.2.1.3. Les conséquences de l'oxydation des C-LDL

Quand les LDL sont oxydées, elles ne seront plus reconnues que par les récepteurs "éboueurs" (ou Scavenger Receptors) des macrophages. Ces récepteurs "scavenger" entraînent les LDL dans un processus athérogène, dans la mesure où cette voie ne subit aucun rétrocontrôle métabolique, il n'y a ni diminution de la synthèse intracellulaire de cholestérol, ni limitation de l'expression des récepteurs à la surface des cellules (**figure 11**) [2, 19-29] ;

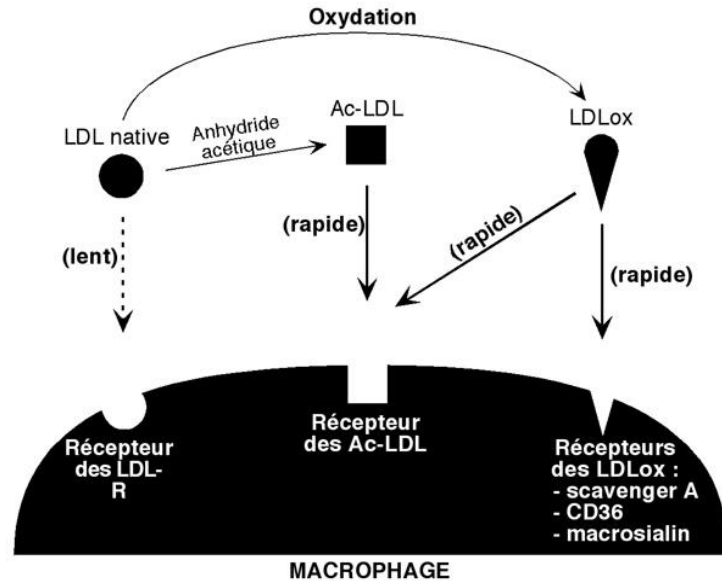


Figure 11 : Capture des LDL par les macrophages ; LDL ; Ac-LDL; LDLox [22]

Ceci conduit à une absorption excessive de cholestérol dans les macrophages. Il y a alors formation de cellules spumeuses (ou foam cells) [29]. De cette oxydation des LDL, découlent plusieurs implications cliniques [24, 28] :

- La formation de LDLox est un élément initiateur majeur de la formation de la plaque d'athérome, et doit donc être évitée. Un traitement antioxydant pourrait compléter un régime hypolipémiant dans le cadre de la prévention.
- Les acides gras polyinsaturés sont les premiers touchés par les réactions oxydatives, alors que les acides gras monoinsaturés sont plus résistants à cette oxydation. Ces derniers sont donc à favoriser dans l'alimentation. Ils sont surtout présents en grande quantité dans les huiles d'olive et de colza (qui présentent en plus l'avantage de contenir une faible proportion d'acides gras saturés).

II.2.1.3.1. Effets pro athérogènes

Les LDL oxydées sont très différentes, des LDL « natives » [23-30] et possèdent de multiples propriétés athérogènes qui sont principalement au nombre de deux :

- Elles ont un effet chimiotactique propre pour les monocytes, les lymphocytes T mais pas pour les lymphocytes B.
- Elles sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales et entraînent une augmentation de la formation de lysophosphatidylcholine (LPC) un composant

majeur des LDL oxydées. Ce dernier provoque la migration des CML vers l'intima [30].

Les MM-LDL stimulent la sécrétion de M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et de MCP-1 (Macrophage Colony Protein-1) par les cellules endothéliales. Ces molécules facilitent ensuite le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages tissulaires et entraînent une augmentation de l'expression des récepteurs "scavenger" des macrophages.

II.2.1.3.2. Interactions avec les récepteurs des C-LDL

Les effets les plus importants des LDLox sont leurs interactions avec les récepteurs des LDL, qui conduiront à l'apparition de stries lipidiques par formation de cellules spumeuses. Les cellules spumeuses sont des cellules dérivées de CML ou de macrophages, et surchargées d'esters de cholestérol [2, 19, 28].

II.2.1.3.3. Formation des cellules spumeuses

La formation des cellules spumeuses est liée à une capture excessive de lipoprotéines par les macrophages. Les LDL sont habituellement capturées par les cellules par l'intermédiaire des récepteurs B/E aux LDL. Ces récepteurs, bien que présents sur les macrophages, ne semblent pas impliqués dans la formation du processus d'athérogénèse [31]. En effet, les sujets déficients en R-LDL peuvent développer une plaque d'athérome ; même en présence de grandes quantités de LDL. Un macrophage ou une cellule musculaire lisse [18] possédant ce récepteur ne se transforme pas en cellule spumeuse.

II.2.1.3.4. Effet prothrombotique des C-LDL

Les MM-LDL stimulent l'expression du facteur tissulaire et participent ainsi à la formation du thrombus [22].

II.2.2. Autre mode de capture des LDL

La capture des C-LDLox se fait par phagocytose suite à une agrégation des particules lipoprotéiques observées in vitro et dans l'espace sous-endothélial [22].

Les facteurs de reconnaissance et de capture sont encore mal connus. Mais cette phagocytose d'une part aboutit à des dépôts de cholestérols intracellulaires aberrants et d'autre part stimule l'apparition de cholestérol non estérifié et de cristaux de cholestérol au sein des lysosomes. De tels dépôts de cholestérol intracellulaire, ne peuvent pas être recyclés en cholestérol estérifié [27].

II.2.3. L'accumulation des LDL et ses conséquences

Les LDLox accumulées au sein des macrophages ou cellules musculaires lisses sont cytotoxiques [18, 19, 22, 23, 26, 28]. Cette cytotoxicité aboutit à la mort des cellules spumeuses au niveau de l'intima, conduisant ensuite à la formation d'un noyau lipidique, un centre athéromateux, recouvert d'une chape fibreuse. Mais ce qui détermine l'évolution de la plaque vers une lésion fibreuse ou vers une lésion nécrotique, c'est la capacité préservée - ou non - qu'ont les macrophages d'éliminer les cellules spumeuses endommagées ou en phase d'apoptose (**Figure 12**) [2, 18, 26].

- Une lésion fibreuse se développera si la plupart des cellules en apoptose est éliminée par phagocytose avant que les dégâts causés à leur membrane plasmique n'entraînent une fuite de leur contenu. Il y aura une accumulation progressive de lipides dans l'espace extracellulaire si une cellule spumeuse devient nécrotique, soit par manque de macrophages environnants, soit parce que leur programme de "mort programmée" ou apoptose est déficient. La lésion évoluera en plaque instable, sujette aux phénomènes de thrombose.
- Les événements impliqués dans la mort des cellules spumeuses sont de deux types : la rapide peroxydation des lipides cellulaires et l'augmentation intense du calcium cytosolique, avec en parallèle une baisse du pH, suivie d'une baisse de la viabilité cellulaire [32].

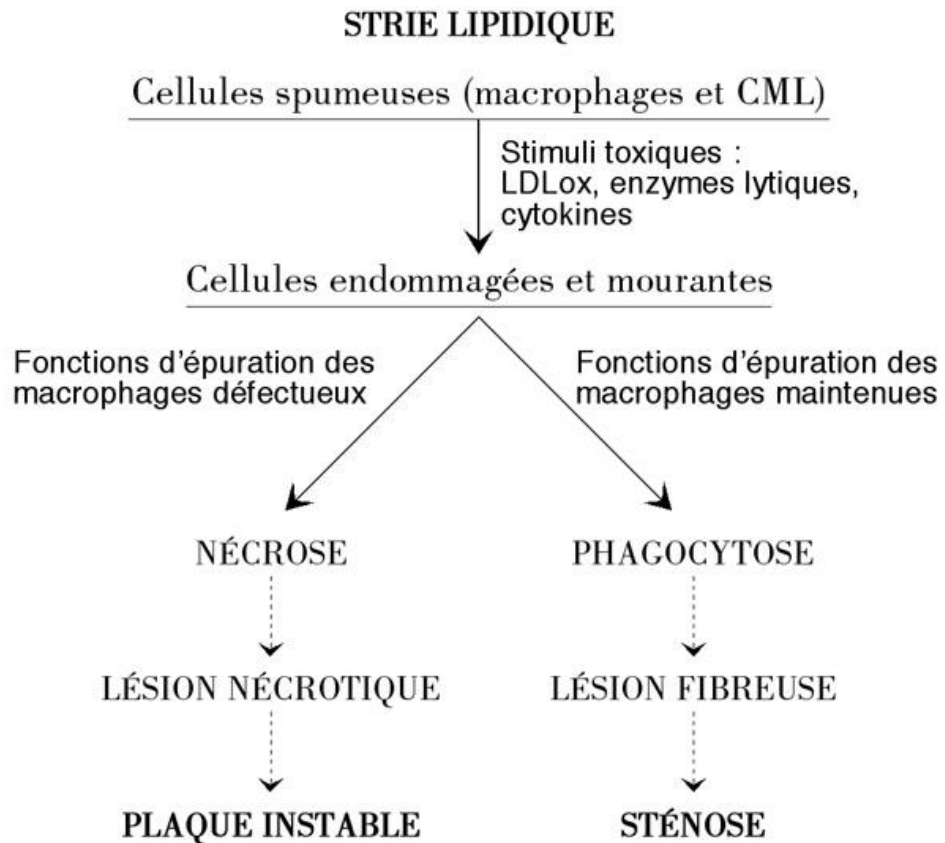


Figure 12 : Schéma montrant comment les fonctions des macrophages pourraient interférer sur le devenir d'une lésion athéroscléreuse. LDLox ; CML [22]

II.2.4. Modifications enzymatiques des LDL

L'oxydation des LDL joue un rôle clef dans le mécanisme de l'athérogénèse. Mais au vu des découvertes les plus récentes, il semblerait que cette transformation ne constitue qu'une étape de l'athérogénèse [2-7, 19, 23].

TORZEWSKI et son équipe [32] ont essayé de synthétiser in vitro des lipoprotéines beaucoup plus proches que les LDLox fonctionnellement et morphologiquement de celles observées au sein des lésions. Ainsi, après traitement combiné par la trypsine, la cholestérol-estérase et la neuraminidase, les LDL sont transformées en E-LDL qui activent le complément. Les E-LDL sont structurellement proches des LCA et sont reconnues par les récepteurs scavenger des macrophages induisant ainsi la formation de cellules spumeuses.

Les modifications enzymatiques des LDL plus encore que leur oxydation pourraient être responsables des dépôts de lipoprotéines et l'initiation de l'athérosclérose.

S'il est incontestable que l'oxydation des LDL joue un rôle dans l'athérogénèse, la faible quantité de LDLox détectée au niveau de la plaque laisse supposer que les LDLox jouent un rôle, surtout dans la phase précoce de contact et de pénétration [27].

III.Moyens d'évaluation du C-LDL

III.1. Examens de routine

III.1.1. Estimation par les formules

III.1.1.1. Formule de FRIEDEWALD

Le taux de C-LDL est évalué généralement par les cliniciens et les laboratoires avec la Formule de Friedewald [1, 7-9, 15] :

$$\text{Cholestérol-LDL} = [\text{Cholestérol total}] - [\text{Cholestérol-HDL}] - [\text{Triglycérides} / 2,2]$$

- Toutes les unités sont en mmol/l
- La formule est seulement utilisable lorsque la triglycéridémie est inférieure à 4,5 mmol/l [9, 15, 33].
- Le taux de triglycérides/2,2 représente les VLDL

III.1.1.2. Formule de PLANELLA

Dans cette formule de Planella dite modifiée [1, 34, 35], des coefficients sont appliqués sur les taux de cholestérol total et de triglycérides. Il semble ainsi que certains désavantages de la formule de Friedewald soient corrigés puisque cette formule tient compte des différents phénotypes (normolipémiques, dyslipémiques IIb et IV)

$$\text{Cholestérol-LDL (mmol/l)} = [\text{Cholestérol total} \times 0,41 \text{ (mmol/l)}] - \text{Triglycérides} \times 0,32 \text{ (mmol/l)} + [\text{ApoB} \times 1,7 \text{ (g/l)}]$$

Cependant, on conserve l'additivité des erreurs analytiques de chaque paramètre. L'équation de Planella peut surestimer le C-LDL chez les sujets porteurs de LDL petites

et denses. Mais sur le plan clinique, il s'agit plutôt d'une amélioration qui permet d'évaluer le risque, non seulement chez les sujets hypercholestérolémiques, mais aussi chez les sujets normocholestérolémiques présentant une augmentation du nombre de particules LDL [36].

III.1.1.3. Formule de DAHLEN

L'équation de Friedewald et de Planella ne tiennent pas compte des taux de Lp(a) [36]. C'est une Lpp dont le taux est fixe chez un individu donné car il est déterminé par un polymorphisme génétique. La Lp(a) est une LDL particulière caractérisée par l'ApoB100 associée à une Apo(a). Cette Apo (a) présente une forte homologie structurale avec le plasminogène qui n'est pas couramment dosé par les Laboratoires en routine.

Un taux élevé de Lp(a) constitue un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant, insensible au traitement hypocholestérolémiant actuellement disponible. Par conséquent, les effets d'un traitement sur les LDL peuvent être sous-estimés si on n'apporte pas de correction.

Cholestérol-LDL (mmol/l) = [Cholestérol total] – [C-HDL] – [Triglycéride/2,2] – [0,3x Lp(a)]

- Toutes les unités sont en mmol/l

III.1.2. Méthodes de dosage directe enzymatique

On distingue plusieurs types de méthodes pour la détermination directe du taux ou concentration sanguine de C-LDL [15, 37].

III.1.2.1. Les méthodes dites de première génération

Elle est basée sur la précipitation des LDL par l'utilisation d'agent chimique tels que l'héparine à pH 5,12 (Merck, Genzyme, and Polymedco), du polyvinylsulfate (Roche Diagnostics), des polymères amphiphatiques non spécifiques (BioMerieux) ou du sulfate de dextran (Progen) [15].

Après centrifugation qui a pour but de précipiter les LDL, le cholestérol du surnageant est mesuré. Le taux de LDL est obtenu par calcul : c'est la différence entre le

cholestérol total du sérum et dans le surnageant (non LDL). Il peut être mesuré directement après dissolution du précipité.

III.1.2.2. Les méthodes de deuxième génération

C'est une technique d'immunoséparation qui permet d'effectuer une détermination directe du taux de C-LDL et qui peut être utilisé chez des patients non à jeun. Développée depuis 1994 par Genzyme Diagnostics et Sigma Diagnostic), le réactif est composé par des anticorps polyclonaux anti-Apo AI et anti-Apo E d'origine humaine liés à des billes de polystyrène. Le dosage du C-LDL se fait après élimination des chylomicrons, C-HDL, VLDL et des particules d'IDL mais des traces de VLDL peuvent être détectées si le patient présente une hypertriglycémie [18].

On peut recourir à une méthode simplifiée de précipitation (LipiDirect) sans nécessité de centrifugation et qui utilise des billes magnétiques revêtues d'héparine à pH 5,1 permettant d'éliminer les C-LDL du sérum, mais les C-HDL, C-VLDL restent en solution. Cette dernière méthode est considérée comme spécifique mais elle est limitée [15, 37-39].

III.1.2.3. Les méthodes de troisième génération

Il s'agit de méthodes homogènes, entièrement automatisées qui permettent la détermination du C-LDL dans des volumes d'échantillons très faibles. Elles peuvent être utilisées sur des analyseurs automatisés multiparamétriques et sans aucun pré-traitement, apportant ainsi un réel progrès méthodologique et laissant espérer de nettes améliorations sur les méthodes antérieures et spécialement sur le calcul de Friedewald [15, 33, 37].

Cinq méthodes directes sont classées dans cette catégorie et elles reposent sur l'action consécutive de deux réactifs. Un premier réactif (appelé R1) est destiné à bloquer ou solubiliser sélectivement certaines classes de lipoprotéines, le second réactif (dénommé R2) permet le dosage spécifique enzymatique de C-LDL dans la même cuvette optique d'un analyseur automatique de biochimie [15, 31, 37, 38].

III.1.2.3.1. Procédé KYOWA (ou solubilization C-LDL method)

Cette méthode consiste en présence d'ions Mg^{2+} à masquer les chylomicrons et les VLDL par des sulfates d'alpha- cyclodextrine et de sulfate de dextran contenus dans le R1. Les complexes ainsi formés sont alors insensibles à l'action des enzymes contenues dans le R2.

Le second réactif (R2) contient, en outre, un détergent qui forme des micelles avec les HDL, les chylomicrons et les VLDL précédemment stabilisés, afin d'inhiber leur réactivité vis-à-vis des enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase.

Seul le cholestérol des LDL est susceptible de réagir et en présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène généré réagit avec la 4-aminoantipyrine et la N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5 diméthoxyaniline pour former un dérivé dont l'intensité de la coloration est mesurée à 585 nm.

III.1.2.3.2. Procédé DAIICHI (ou surfactant C-LDL method)

Cette méthode consiste à solubiliser sélectivement les lipoprotéines non -LDL (CM, VLDL, C-HDL) par un détergent ionique présent dans le premier réactif (R1). Le cholestérol libéré réagit avec plusieurs enzymes cholestérol estérase, cholestérol oxydase et peroxydase. Du peroxyde d'hydrogène est généré et va réagit avec une 4-amino-antipyrine mais ne peut former de dérivé coloré car le sel disodique de la N,N'-bis-(4 sulfobutyl)-m-toluidine (DSBmT) est absent de R1.

Dans la deuxième étape (R2), un autre détergent permet l'accessibilité des enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase au C-LDL. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène généré réagit avec le chromogène (4-amino-antipyrine du premier réactif) et le DSBmT pour former un produit coloré dont l'absorbance est mesurée à 660 nm.

III.1.2.3. Procédé WAKO (ou protectins C-LDL method)

Lorsqu'un échantillon est mélangé avec le Réactif Enzymatique Coloré (R1), les polyanions et le surfactant amphotérique protègent les C-LDL des réactions enzymatiques. La Cholestérol estérase et la cholestérol oxydase réagissent avec les lipoprotéines non-LDL CM, VLDL et C-HDL). Le peroxyde d'hydrogène produit par

les réactions enzymatiques avec le cholestérol non-LDL est décomposé par la catalase du Réactif enzymatique coloré.

Lorsqu'on ajoute la Solution Réactive (R2), le réactif protecteur est écarté des LDL et la catalase est inactivée par l'azide de sodium (NaN₃). Dans cette seconde étape, la Cholestérol estérase et la Cholestérol oxydase ne réagissent qu'avec le C-LDL. Le peroxyde d'hydrogène produit par les réactions enzymatiques avec le C-LDL forme un complexe coloré par condensation oxydative avec la N-(2-hydroxy-3sulfopropyl) 3,5-diméthoxyaniline (HDAOS) et la 4-aminoantipyrine (4-AA) en présence de Peroxydase (POD). En mesurant l'absorbance du complexe coloré bleu produit, à environ 600 nm.

III.1.2.4. Procédé DENKA SEIKEN (ou catalase C-LDL method)

Cette méthode consiste dans un premier temps à faire agir un surfactant (R1) pour libérer le cholestérol des lipoprotéines non LDL, qui réagit alors avec les enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase. Le peroxyde d'hydrogène généré est transformé sous l'action d'une catalase.

Dans la deuxième étape, plusieurs détergents (R2) vont agir spécifiquement sur les LDL dont le cholestérol sera dosé par les cholestérol estérase et cholestérol oxydase.

De l'azide de sodium inhibe la catalase de R1 et le peroxyde d'hydrogène généré réagit avec la peroxydase de R2 en présence de 4-amino-antipyrine et de sel disodique de la N-(2-hydroxy-3 sulfopropyl)-3,5-diméthoxyaniline (HDAOS) pour former un complexe bleu dont l'absorbance est mesurée à 600 nm.

III.1.2.5. International reagents corporation (ou Calixarene C-LDL method)

Dans cette méthode qui ne serait pas utilisée par les US [15] et qui n'est pas présent non plus à Madagascar, un détergent appelé Calixarène complexe les C-LDL pour former un complexe soluble qui est insensible aux enzymes.

Ensuite, une cholestérol estérase hydrolyse les esters de cholestérol des HDL et VLDL permettant de libérer le cholestérol libre lequel est ensuite oxydé par une cholestérol oxydase associée à l'hydrazine en cholesténone hydrazone.

Dans un 2^{ème} temps, le R2 (le deoxycholate) agit sur le complexe soluble C-LDL-calixarène permettant ainsi le dosage du C-LDL libéré par une estérase qui est une

déshydrogénase dépendante du NAD. On mesure au spectrophotomètre la quantité de NADH qui apparaît, elle est considérée comme proportionnelle à la quantité de C-LDL présente initialement dans la prise d'essai.

Toutes ces méthodes de dosage direct du C-LDL qui sont dites de troisième génération sont résumées dans les schémas qui suivent [15, 37] :

Procédé de Kyowa Medex

1. C-HDL, C-VLDL et Chylomicrons are blocked by surfactants and sugar compounds
2. C-LDL are solubilized by enzymes and surfactants → Cholesténone + H₂O₂
 $2 \text{ H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HSDA} + \text{enzyme} \rightarrow \text{Color}$

Procédé de Daiichi

1. Surfactant 1 + enzymes react only with C-HDL, C-VLDL et C-CM
 Peroxides creates by non-LDL are consumed by peroxidase → Colorless
2. C-LDL + surfactant 2 + coupler + enzymes → Color

Procédé de Wako

1. C-LDL + Protecting Reagent protect C-LDL from enzyme reactions
 C-HDL, C-VLDL, C-CM + enzymes → H₂O₂ + catalase → H₂O
2. C-LDL- Protecting Reagent + Deprotecting Reagent → C-LDL
 C-LDL + enzymes → Cholesternone + H₂O₂
 $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HDAOS} \rightarrow \text{Color}$

Procédé de Denka Seiken

1. Non-LDL + surfactant combination 1 + enzymes → Cholestenone + H₂O₂
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
2. C-LDL + surfactant combination 2 → Cholesténone + H₂O₂
 Catalase + azide → Inhibition
 $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HDAOS} + \text{enzymes} \rightarrow \text{Color}$

International Reagents Corporation

1. C-LDL + calixarene → C-LDL- calixarene soluble complexe
2. Non-LDL + Enzymes (CEI) + Hydrazine → cholestenone hydrazone
3. C-LDL + β -NAD + enzymes (CE2) → cholestenone hydrazone + β -NADH

Figure 13 : Résumé des principes schématiques des réactions mises en jeu dans les méthodes de dosage direct en phase homogène [15]

(CM : Chylomicrons ; 4-AA : 4-aminoantipyrine ; HSDA : *N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5dimethoxyaniline, sel de sodium ; C-CM : cholestérol des chylomicrons ; HDAOS : *N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline).

III.2. Examens spécialisés

Ils sont nombreux mais ne sont effectués que par des laboratoires spécialisés. Nous allons parler uniquement de quelques méthodes les plus utilisées en pratique :

II.2.1. La bêta-quantification (β Q) : méthode de référence

Il s'agit d'une procédure [9, 13-16, 36, 37] reconnue comme la méthode de référence pour la mesure du taux de C-LDL mais son utilisation en routine est réservée à certains laboratoires spécialisés. En effet, elle comprend plusieurs étapes combinant les séparations par ultracentrifugation et la précipitation chimique. Cette ultracentrifugation est très variable pouvant aller de 150000 à 590000 tours à 10°C pendant 135 minutes. Elle est fondamentale pour l'isolement des lipoprotéines de densité inférieure à 1,019 g/ml (chylomicrons, VLDL, IDL) dans les surnageants. Les C-LDL et C-HDL de densité supérieure à 1,019 g/ml sont recueillis dans les sous-nageants. Ensuite, un dosage du cholestérol des sur- et sous- nageants est réalisé [15, 31].

- Le dosage des C-HDL se fait après précipitation des C-LDL par du phosphotungstate de sodium et chlorure de magnésium (PTA), suivant le protocole recommandé par l'Arcol/SFBC [40].
- Les concentrations des C-LDL par bêta-quantification seront obtenues par le calcul suivant :

C-LDL (mmol/l) = [Cholestérol total] – [cholestérol de la fraction de densité inférieure à 1,019] – [C-HDL] (Tous les paramètres sont en mmol/l)

II.2.2. Estimation à l'électrophorèse

L'électrophorèse appelée aussi lipidogramme est une technique qui permet la séparation électrophorétique des lipoprotéines en fonction de leur charge ou en fonction de leur charge et taille [7, 29].

Elle permet d'estimer le pourcentage de chaque fraction (ou classe) de Lpp (**Figure 14**) mais surtout elle est indispensable :

- dans le typage des Hyperlipoprotéïnémies (i.e. pour la classification de FREDERICKSON)
- pour détecter certaines lipoprotéines anormales : Lp (x), HDL anormale et la Lp (a)

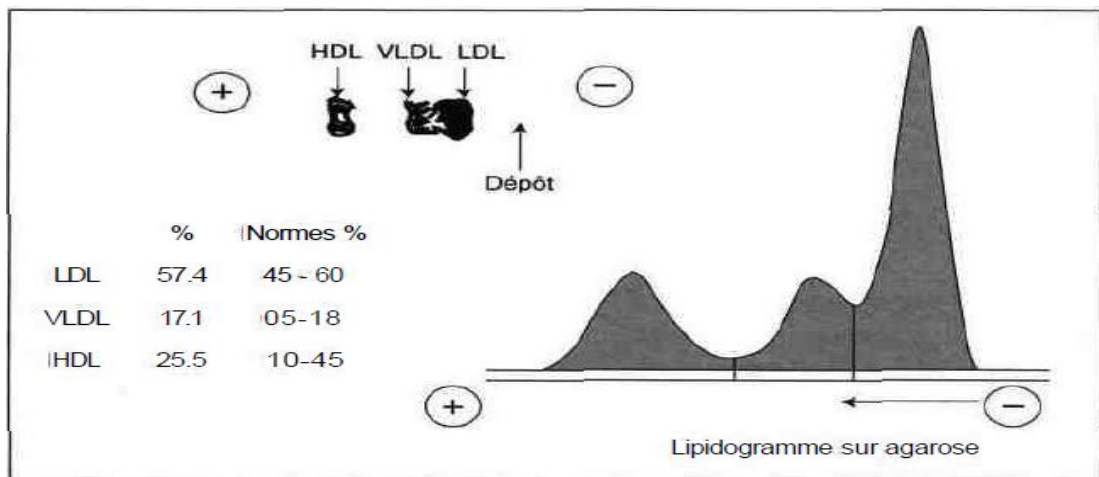


Figure 14 : Migration des différentes fractions de Lpp sur agarose [29]

III.2.3. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier les gènes impliqués dans les perturbations quantitatives et/ou qualitatives des C-LDL dont les plus fréquentes sont les mutations du récepteur des LDL. Ces mutations sont à l'origine d'hypercholestérolémie familiale, leur fréquence est estimée à environ 1 cas pour 500 naissances pour la forme hétérozygote [7, 41, 42].

III.2.3.1. Les premiers variants

Ils peuvent être responsables d'une large modification des C-LDL dans le sens de leur internalisation à l'origine de leur accumulation dans le plasma.

- Il existe des gènes impliqués dans l'élévation des C-LDL pouvant aller jusqu'à 5,16 à 10,32 mmol/l et ce sont :
 - les gènes LDLR et APOB dont la transmission est autosomique dominante,
 - le gène ARH à transmission autosomique récessive, rarement les gènes ABCG5, ABCG8 et PCSK9
- A l'opposé, les gènes MTP (responsable de l'absence de β lipoprotéine) et les gènes APOB et PCSK9 peuvent entraîner une diminution des C-LDL (pouvant aller jusqu'à moins de 1,55 mmol/l).

Ainsi, selon le type de mutation du gène PCSK9, il peut entraîner soit une diminution soit une augmentation du taux de C-LDL (**figure 15**).

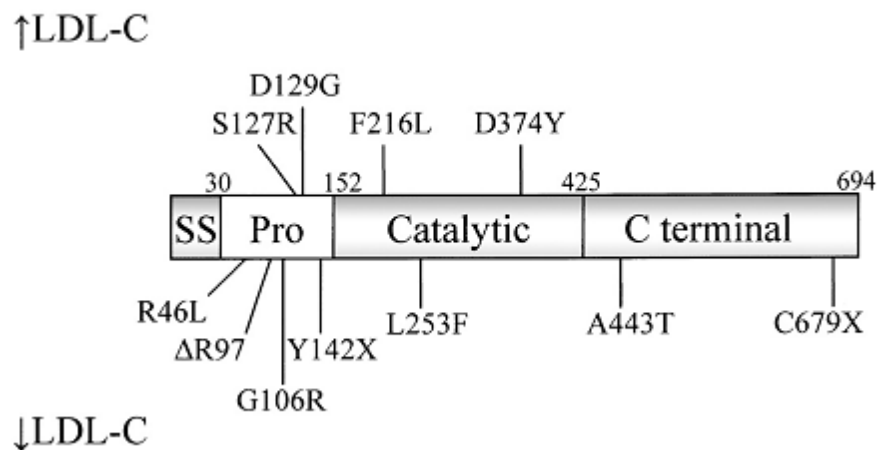


Figure 15 : PCSK9 et mutations associées à une élévation ou une diminution des taux plasmatiques de C-LDL [42]

III.2.3.2. Les secondes classes sont dites communes

Elles sont responsables d'une petite modification des C-LDL d'environ 1,55 mmol/l par mutation. Il s'agit des gènes APOB (rs63), APOE (rs4420638), HMGCR (rs12654264), LDLR (rs688) et PCSK9 (rs11591147).

Les individus peuvent porter plusieurs variants nécessitant alors l'établissement d'un score de génotype pour prédire le taux plasmatique de C-LDL et le risque de maladies cardio-vasculaires.

La technique de biologie moléculaire peut être indiquée chez les patients jeunes et dans le cadre des hypercholestérolémies familiales afin de déterminer si le sujet est homozygote et dans ce cas, la pathologie survient dès l'enfance avec une forme sévère caractérisée par des manifestations cutanées graves (xanthomes) et des maladies athéromateuses précoces. Chez le sujet hétérozygote, les manifestations cliniques surviennent après l'âge de 20 ans [38]. Mais, la réalisation de cette technique coûte très chère puisqu'elle nécessite la spécialisation du Laboratoire [42], par conséquent, elle n'est pas disponible à Madagascar dans un avenir proche.

Tableau IV : Classification des mutations du récepteur des LDL, d'après Marsot [20, 36]

Classe	Phénotype	Localisation de la mutation
1 (plus fréquente ~60%)	Défaut de synthèse du récepteur Pas d'ARNm détectable	Délétion du peomoteur ou délétion large de la portion codante
2	Défaut de transport du récepteur total ou partiel entre réticulum endoplasmique et le Golgi	Zone d'homologie avec le précurseur de l'EGF ou domaine de fixation au ligand
3	Défaut de liaison du récepteur au ligand	Domaine de fixation au ligand parfois zone d'homologie avec le précurseur de l'EGF
4	Récepteur capable de fixer le ligand mais pas de formation de puits recouverts de clathrine	Domaine intracytoplasmique
5	Récepteur incapable de se dissocier de son ligand dans les endosomes. Pas de recyclage du récepteur à la surface des cellules	Zone d'homologie avec le précurseur de l'EGF

III.2.4. Etude des récepteurs des LDL in vitro par cytométrie en flux

Les LDL transportent 60 à 80 % du cholestérol plasmatique. Elles sont principalement catabolisées par le récepteur des LDL qui influence ainsi directement la concentration plasmatique en C-LDL actuellement reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire majeur. L'expression du récepteur des LDL à la surface cellulaire est contrôlée négativement par la concentration intracellulaire en cholestérol et est influencée par de nombreux facteurs hormonaux, médicamenteux ou autres [20].

La cytométrie en flux [20] est une technique simple et rapide permettant la quantification et l'étude fonctionnelle du récepteur des LDL à la surface cellulaire. Deux types de ligands peuvent être utilisés : des LDL marquées par un fluorochrome, et des anticorps monoclonaux révélés par un anticorps secondaire marqué par une molécule fluorescente. Avec cette dernière technique, on peut désormais chiffrer le nombre de sites antigéniques à la surface cellulaire grâce à des coffrets de microbilles de calibration commercialisés.

Les autres examens qui peuvent être effectués par un laboratoire très spécialisé sont :

- Le dosage des remnants,
- L'étude des Apos C et E par isoélectrofocalisation,
- La cinétique in vivo des VLDL, LDL, HDL,
- L'étude de la susceptibilité à l'oxydation des LDL
- Le dosage des LDL petites et denses
- Le dosage des activités enzymatique : lipoprotéine-lipase, lipase hépatique, LCAT, CETP...

IV. C-LDL et risque cardiovasculaire

En résumé, les LDL avec les IDL ainsi que la Lp(a) et à un degré moindre les VLDL sont athérogènes, alors que les HDL sont dites anti-athérogènes. De très nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait un lien très fort entre la quantité du cholestérol porté par les LDL et le risque de pathologie cardio-vasculaire, notamment coronarienne. En effet, le cholestérol associé aux LDL est considéré comme du mauvais cholestérol car il a toutes les chances de stagner au niveau des tissus et des anomalies de leur métabolisme sont à l'origine de perturbations biologiques avec des conséquences importantes en termes de santé publique. Leur dosage constitue par conséquent, un paramètre important pour évaluer le risque cardiovasculaire [2, 6-8, 43].

Cependant, ce rôle central ne doit pas faire oublier que le risque cardio-vasculaire d'un patient ne se mesure pas qu'aux perturbations lipidiques et que tous les facteurs doivent être pris en compte lors de l'évaluation initiale et de la mise en place du traitement. Ces facteurs de risque sont nombreux, et on cite principalement l'âge, les antécédents familiaux, le tabagisme, une HTA permanente, le diabète sucré et des taux d'HDL inférieurs à 0,90 mmol/l quel que soit le sexe.

La NCEP [6] et les équipes de Gundy [43] ont établi des critères pour catégoriser et classer (**Tableau IV**) les sujets à risque cardio-vasculaire selon les taux de cholestérol total et le cholestérol associé aux LDL. Le risque est qualifié d'optimal lorsque un individu a un taux de C-LDL $\geq 3,34$ mmol/l et ceci même en absence des autres facteurs.

Tableau V : ATP II ou stratification du risque cardiovasculaire en fonction du taux de cholestérol total et du taux de C-LDL [43]

CT (mmol/l)		C-LDL (mmol/l)	
< 5,16	Désirable	< 2,58	Optimal
		2,59 – 3,34	Près de l'optimal
5,17 - 6,17	Limite haute	3,67 – 4,12	Limite haute
		4,14 – 4,90	Haute
$\geq 6,19$	Haute	> 4,92	Très haute

Mais on sait actuellement qu'au-delà de leur taux, ce sont les densités des LDL qui sont fondamentales dans la survenue du risque. En effet, plusieurs études ont montré que seul un quart des patients ayant développé des accidents cardiaques ont un taux élevé de C-LDL et inversement, on peut trouver des patients dont le taux de C-LDL est augmenté mais qui n'ont pas encore développé des accidents cardiovasculaires.

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. . Méthodes

I.1. Cadre de travail

Cette étude a été réalisée au sein de l'Unité Paraclinique de Formation et de Recherche en Biochimie (UPFR en Biochimie) au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona (CHU – JRA) d'Antananarivo.

L'UPFR en Biochimie reçoit les demandes d'analyses provenant des différents services hospitaliers situés à Antananarivo et même des autres régions de Madagascar. Elle effectue également des analyses pour des patients non hospitalisés (vus en consultation externe) et dont les prélèvements sanguins se font au sein du Centre de prélèvement du Département Laboratoire.

I.2. Type et Période de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective comparative réalisée au sein de l'Unité de Formation Paraclinique et de Recherche en Biochimie du CHUA-JRA pendant une période de 6 mois, allant de 01 Avril au 30 Septembre 2013.

I.3. Sélection de la population

Notons que tous les dossiers des patients sont retenus confidentiels.

I.3.1. Critères d'inclusion

Seuls des patients hospitalisés ont pu être inclus dans notre étude, les critères d'inclusion étant :

- un bilan sanguin lipidique complet comprenant des dosages du Cholestérol total et de ses fractions C-HDL et C-LDL et un dosage des Triglycérides ;
- une triglycéridémie inférieure à 4,50 mmol/l afin d'éviter toute erreur d'estimation du C-LDL calculé par la formule de Friedewald.

I.3.2. Critères de non inclusion

Ont été exclus, tous les patients hospitalisés ou externes ayant fait un bilan lipidique incomplet et n'ont pas été inclus tous patients ayant eu une triglycéridémie supérieure à 4,50 mmol/l, là où la formule de Friedewald est non applicable.

I.4. Variables étudiées

Les paramètres retenus et étudiés ont été :

- Le genre
- L'âge
- Le renseignement clinique
- Le service prescripteur
- Les taux de cholestérol total, de C-HDL, de C-LDL et de Triglycérides afin de pouvoir effectuer le calcul
- La différence entre la concentration de C-LDL obtenue par le dosage direct (C-LDL_D) et celle obtenue par la formule de Friedewald (C-LDL_F)

I.5. Méthodes de prélèvement sanguin et de mesure du taux de C-LDL

I.5.1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins recueillis sur des tubes héparinés (Héparinate de Lithium Vacuette®) sont réceptionnés au Laboratoire. Ces échantillons sont tout de suite étiquetés afin d'identifier chaque patient, en notant la date et l'heure du prélèvement.

Ces échantillons sont tout de suite identifiés par étiquetage manuel qui spécifie :

- Les noms et prénoms
- L'âge
- La date de naissance
- Le service d'hospitalisation si c'est le cas
- La date et l'heure du prélèvement
- L'identité du préleveur

I.5.2. Prétraitements des échantillons

Les échantillons ont été rapidement centrifugés dans les 2 heures au plus tard, qui suivent le prélèvement dans une centrifugeuse Jouan GR4i® réfrigérée à une température de +4° C, à 3500 tours par minute pendant 15 minutes pour séparer le plasma du culot globulaire. Les dosages des paramètres étudiés sont effectués sur le surnageant (le plasma, un milieu biologique validé par les méthodes). Ces échantillons quel que le soit le dosage sont stables 5 à 7 jours à 2-8°C et 3 mois à -20°C.

I.5.3. Automate de biochimie clinique

Le dosage des paramètres lipidiques a été fait sur l'automate Mindray BS300®, (**figure 16**) de la société Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Ltd, 2009-2012. Chine, N° AO-2A 1011986.

C'est un système ouvert comprenant :

- Un système de traitement de spécimens
- Un système de gestion du milieu réactionnel avec des cuvettes optiques à usage unique
- Un système de mesure photométrique (photométrie UV-Visible et une module ISE)
- Un système de traitement des informations (données patients, données de calibration et de contrôle) qui est constitué par un ordinateur avec le logiciel Chemistry Analyzer Software BS300 et l'imprimante, le tout rattaché à l'automate.



Figure 16 : Photo de l'Automate de Biochimie Clinique BS 300® (Société Shenzen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China) [photo prise au laboratoire de Biochimie à l'HU-JRA]

I.5.4. Calibrateurs (ou solutions d'étalonnage ou de calibration)

Avant chaque série de test et selon les spécifications des notices techniques, une calibration des paramètres est effectuée à l'aide d'une solution de calibration :

- Pour le cholestérol total et les triglycérides : le Multisera calibrator® (Réf. 105-001144-00 de la Société Shenzen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China). C'est un calibrateur multiparamétrique lyophilisé, d'origine humaine pour la Biochimie générale.
- Pour les C-HDL et C-LDL : le HDL/LDL CAL® (Réf 33903, de la Société Spinreact, S.A.U., Espagne), un calibrateur lyophilisé spécifique, d'origine humaine.

I.5.5. Solutions de contrôle de qualité interne

Les résultats des patients sont validés grâce à des contrôles de qualité interne quotidiens.

- Deux niveaux de contrôle sont utilisés pour le cholestérol total et les triglycérides : solution de contrôle multiparamétrique lyophilisé niveau normal (Ref. 10-001145-00) et pathologique (Ref.105-001146-00) toujours de la Société Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China
- Pour le C-HDL et C-LDL, on utilise le sérum de contrôle HDL/LDL/CK-MB et lipides « taux 2 » (Réf 95526, Biolabo® France)

Les résultats du contrôle sont interprétés en temps réel et de façons cumulées grâce au diagramme de Levey-Jennins en association avec les règles de Westgard.

I.5.6 Principes des méthodes de dosage des paramètres lipidiques

I.5.6.1. Méthode de dosage directe C-LDL utilisée sur l'automate Mindray BS300®

I.5.6.1.1. Composition du Kit

C'est une méthode enzymatique directe en phase homogène qui est basée sur l'utilisation de deux réactifs (Réf. LDL0103, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China). :

- R1 composé par :
 - un tampon (Good's buffer),
 - des enzymes (Cholestérol estérase, Cholestérol oxydase et une catalase)
 - un détergent appelé TOOS ou N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-méthylaniline (au lieu de HDAOS, N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline).
- R2 composé par le même tampon qu'en R1 (Good's buffer), le chromogène incolore (4-aminoantipyrine) et une enzyme (Peroxydase).

L'utilisation de TOOS dans cette dernière réaction indicatrice colorée nous indique que la méthode utilisée à l'UPFR Biochimie est donc une variante du procédé de Wako.

I.5.6.1.2. Principe réactionnel

Cette méthode directe comporte deux étapes :

- **Dans la 1^{ère} étape** : un agent « protecteur » protège les LDL tandis que, les VLDL, les HDL et les chylomicrons sont solubilisés par le détergent puis ces mêmes VLDL et HDL sont oxydés par les enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase. Il se forme un produit inactif incolore.
- **La 2^{ème} étape utilisant le R2** contenant du détergent, des enzymes et le chromogène incolore permettra le dosage direct du C-LDL.

Schématiquement, ces réactions se déroulent comme suit :

- LDL+ Réactif protecteur contre l'action des enzymes+ Détergent $\longrightarrow$ LDL
- C-HDL, VLDL, chylomicrons + Enzymes $\rightleftharpoons$ H₂O₂
- C-LDL $\longrightarrow$ cholesténone + H₂O₂
- 2H₂O₂ + Enzyme (catalase) $\rightleftharpoons$ 2H₂O + O₂
- H₂O₂ + 4-amino-antipyrine
+ TOOS + Enzyme (peroxydase) $\longrightarrow$ Quinone imine + 2H₂O

La quinone imine est le chromogène coloré dont l'absorbance est lue au spectrophotomètre. Cette coloration est considérée comme proportionnelle à la concentration de C-LDL présent dans la prise d'essai.

Après centrifugation, 12 µl de surnageant sont mis en présence de 900 µl de R1 puis incubé pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite mis en présence de 300 µl de R2. L'absorbance est lue à 600 nm après 5 minutes.

I.5.6.1.3. Domaines de mesure

La limite de détection est de 0,05 mmol/l avec une sensibilité de 99,7%.

La limite de linéarité est de 20,00 mmol/L.

Il n'est pas noté une interférence spécifique des échantillons hémolysés jusqu'à 300 mg/dl d'hémoglobine, ou lactescents jusqu'à 3,42 mmol/l de triglycérides. Il n'existe pas d'interférence de la bilirubine ni de l'acide ascorbique avec cette méthode.

Les valeurs de référence du C-LDL avec cette méthode sont comprises :

- entre 2,58 à 3,87 mmol/l pour les Femmes
- entre 2,84 à 4,13 mmol/l pour les Hommes

Toute valeur supérieure traduit un risque cardio-vasculaire, d'où la nécessité d'avoir une méthode de dosage précis au Laboratoire.

I.5.6.1.4. Précision

Cette méthode sur Mindray BS300 a été testé par le fabricant par rapport au réactif utilisé sur le système HITACHI/ROCHE avec une corrélation $R^2 = 0,99$.

I.5.6.2. Calcul du taux de C-LDL selon la formule de Friedewald

Les dosages du cholestérol total, des triglycérides ainsi que le C-HDL sont nécessaires pour effectuer ce calcul :

- **C-LDL** = Cholestérol Total (en mmol/l) – C-HDL (en mmol/l) – Triglycérides (en mmol/l/ 2,2
- Avec taux de triglycérides (mmol/l)/2,2 représentant les VLDL

I.5.6.2.1. Principe général

Le dosage du cholestérol total et le cholestérol HDL, ainsi que les triglycérides font appel à des méthodes colorimétriques enzymatiques selon Trinder. Ces réactions enzymatiques dites couplées, dont la dernière fait intervenir un produit final coloré facilement mesurable, se déroulent en plusieurs étapes :

- On ajoute une quantité fixe et connue d'enzyme spécifique (réactifs) à la prise d'essai (i.e. l'échantillon du patient) qui contient le substrat à doser
- Après un temps d'incubation et à 37°C, on mesure l'absorbance du mélange réactionnel en point final par rapport à celle du calibrateur.

Ces réactions couplées utilisent des oxydases spécifiques qui oxydent le substrat en produisant de l'eau oxygénée. L'eau oxygénée (H_2O_2) est ensuite dégradée par une peroxydase selon divers protocoles conduisant à la formation d'un produit coloré, la quinone imine dont l'intensité de coloration est lue dans le domaine du visible entre 500 à 520 nm (réaction de Trinder). Cette coloration est considérée comme proportionnelle à la quantité de substrat contenu dans la prise d'essai initial (**Figure 17**).

La présence de facteur clarifiant les lipides dans les réactifs permet d'éviter les absorptions non spécifiques pouvant être liées à la turbidité des échantillons et qui donnent des résultats faussement élevés.

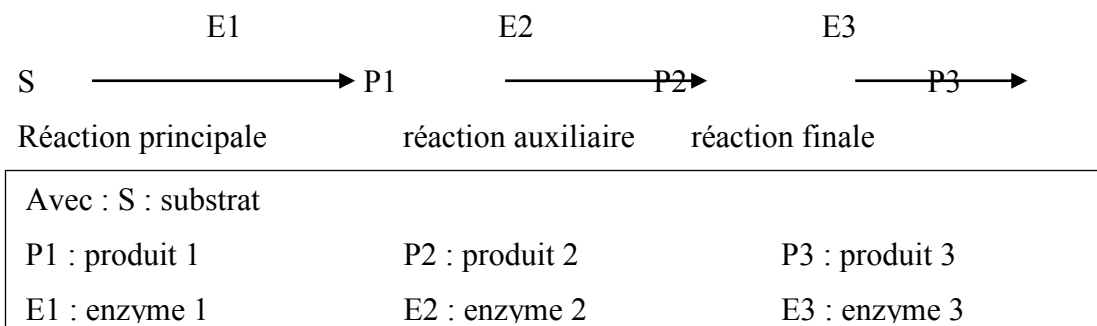


Figure 17 : Principe des méthodes colorimétriques enzymatiques

I.5.6.2.2.Méthode de dosage du cholestérol total

I.5.6.2.2.1. Composition du Kit

Le Kit Total Cholestérol® Réf TC 0103, Shenzen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China) est composé par plusieurs éléments:

- Un tampon phosphate,
- Un chromogène qui est le Phénol 4-aminoantipyrine,
- et des enzymes (la Cholestérol estérase, la Cholestérol oxydase, et la Peroxydase)

I.5.6.2.2.2. Principe réactionnel

Cette méthode de dosage est toujours basée sur le principe des réactions enzymatiques colorimétriques couplées utilisant la cholestérol oxydase et la peroxydase. Elle est schématisée comme suit :

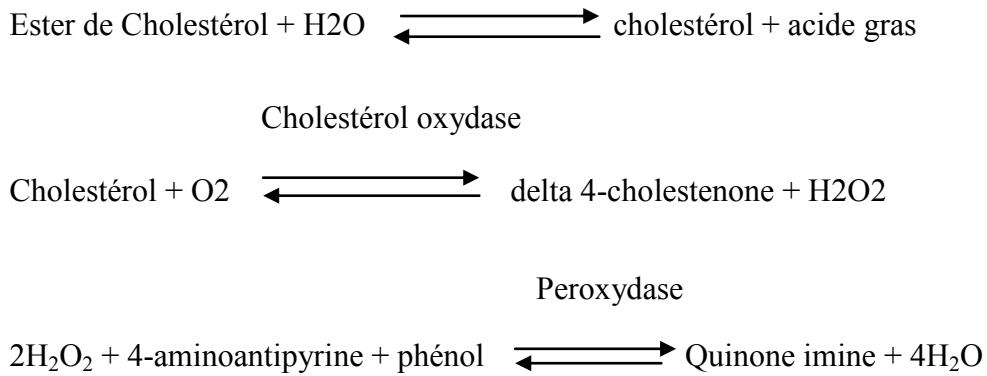


Figure 18 : Principe général de la méthode de dosage du cholestérol total dans le sang

L'absorbance de la quinone imine (chromogène coloré) est lue à 510 - 530 nm. L'intensité de cette coloration est considérée comme proportionnelle à la concentration du cholestérol présent dans la prise d'essai.

Après centrifugation, 10 µl de surnageant sont mis en présence de 1000 µl de réactif. L'absorbance du mélange réactionnel est lue à 530 nm après 10 minutes d'incubation.

I.5.6.2.2.3. Domaines de mesure

La limite de détection est de 0,40 mmol/l avec une sensibilité de 99,7%

La limite de linéarité est de 20,00 mmol/l.

Il n'est pas noté une interférence spécifique des échantillons hémolysés (jusqu'à 500 mg/dl d'hémoglobine), ou lactescents (jusqu'à 5,70 mmol/l de triglycérides) ou ictériques. Il n'a pas été noté une interférence de la bilirubine ni de l'acide ascorbique avec cette méthode.

Les valeurs de référence du cholestérol total avec cette méthode sont comprises entre 2,50 à 6,80 mmol/l.

I.5.6.2.2.4. Précision de la méthode

Cette méthode sur Mindray BS300 a été testé par le fabricant par rapport au réactif utilisé sur le système HITACHI/ROCHE avec une corrélation $R^2 = 0,99$.

I.5.6.2.3. Méthode de dosage des triglycérides

I.5.6.2.3.1. Composition du Kit

C'est aussi une méthode enzymatique directe basée sur l'utilisation du Kit Triglycerides® (Réf TG0103, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China). Il est composé par :

- un tampon Phosphate,
- un cofacteur : l'ATP-Mg²⁺,
- des Enzymes : Glycérol kinase, Peroxydase, Lipoprotéine et lipase Glycero-3-phosphate-oxydase.
- un chromogène : 4-aminoantipyrine associé au 4-chlorophénol

I.5.6.2.3.2. Principe réactionnel

C'est une méthode qui fait aussi appel à la méthode enzymatique colorimétrique couplée utilisant la glycérol kinase et la peroxydase (**Figure 19**).

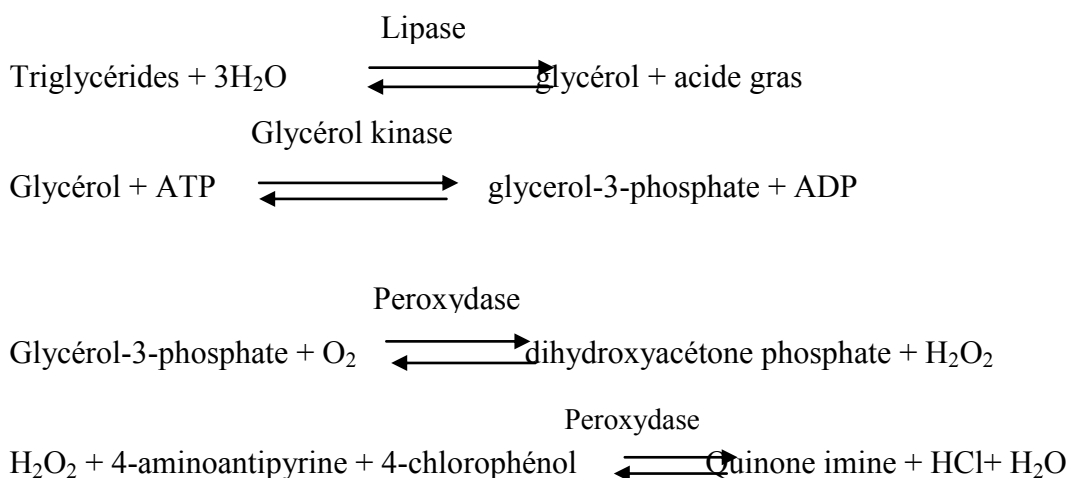


Figure 19 : Principe des réactions mises en jeu pour le dosage des triglycérides dans le sang

L'intensité de coloration de la quinone imine à 510 - 530 nm est considérée comme proportionnelle à la concentration du cholestérol présent dans la prise d'essai.

Après la centrifugation, 10 µl de surnageant est mis en présence de 1000 µl de réactif. L'absorbance du produit final formé est lue à 510 nm après 10 minutes.

I.5.6.2.3.3. Domaines de mesure

La limite de détection est de 0,10 mmol/l avec une sensibilité de 99,7% et la limite de linéarité est de 12,50 mmol/l.

Il n'est pas noté une interférence spécifique des échantillons hémolysés jusqu'à 500 mg/dl d'hémoglobine. Ces interférences n'existent pas avec les échantillons lactescents ou ictériques.

Avec cette méthode, les valeurs de référence du TG sont comprises entre 0,35 à 1,35 mmol/l chez les femmes et 0,65 à 1,48 mmol/l chez les Hommes.

Une hypertriglycéridémie est actuellement reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire surtout si elle est associée avec d'autres facteurs.

I.5.6.3.3.4. Précision

Cette méthode sur Mindray BS300® a été testée par le fabricant par rapport au réactif utilisé sur le système HITACHI/ROCHE avec une corrélation $R^2 = 0,992$.

I.5.6.2.4. Méthode de dosage direct du C-HDL

I.5.6.2.4.1. Composition du Kit

C'est une méthode enzymatique directe en phase homogène basée sur le procédé de Wako. Le kit est composé de deux réactifs (Réf HDL0103, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. LTD, China) :

- R1 composé par :
 - un tampon appelé Good's buffer
 - des enzymes : Cholestérol estérase, Cholestérol oxydase, Catalase
 - un détergent : HDAOS ou N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, sel de sodium
- R2 composé par : le même tampon qu'en R1 (Good's buffer), le chromogène (4-aminoantipyrine), la peroxydase, et du surfactant.

I.5.6.2.4.2. Principe réactionnel

Il existe également 4 procédés permettant de faire un dosage direct du taux de C-HDL mais celui qui est utilisé au Laboratoire est une technique de précipitation, en phase homogène d'où le terme « procédé de PTA » (PTA pour acide phosphotungstique). Il comporte (**Figure 20**) :

- Une étape de blocage (ou précipitation) des autres lipoprotéines (VLDL, LDL) par de l'acide phosphotungstique et l'ion magnésium,
- Puis le C-HDL est dosé par méthode enzymatique colorimétrique couplée

Cette méthode est schématisée comme suit :

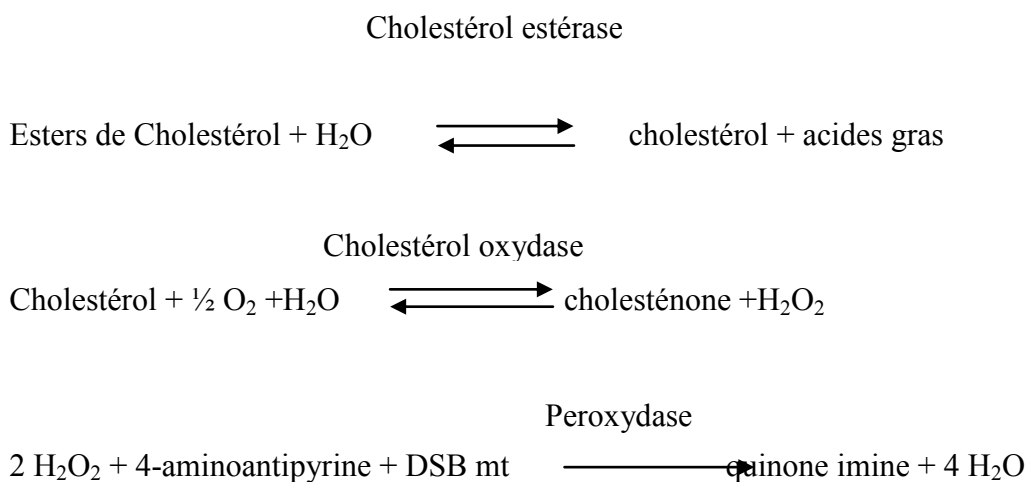


Figure 20 : Principe général de la méthode de dosage du C-HDL dans le sang

L'absorbance de la quinone imine à 510 – 530 nm et en bichromatisme (670 nm) pour l'élimination des interférences est considérée comme proportionnelle à la concentration du C-HDL présent dans la prise d'essai.

Après centrifugation 12 µl de surnageant est mis en présence de 90 µl de R1. Le mélange est incubé à une température de +37°C pendant 5 minutes puis sera additionné de réactif R2. L'absorbance est lue à 600 nm après 5 minutes.

I.5.6.2.4.3. Domaines de mesure

La limite de détection est 0,05 mmol/l avec une sensibilité de 99,7%

La limite de linéarité est de 6,00 mmol/l.

Il n'est pas noté une interférence spécifique des échantillons hémolysés (jusqu'à 300 mg/dl d'hémoglobine), ou lactescents (jusqu'à 3,99 mmol/l de TG) ou ictériques (jusqu'à 680 μ mol/l de bilirubine).

Pour le C-HDL, on définit des seuils de cardio-vasculaires et que nous avons résumés dans le tableau qui suit. Ceci explique également la nécessité d'avoir une méthode de dosage précis au Laboratoire.

Tableau VI : Gradation du Seuil de risque coronarien selon le taux d'HDL

	Homme	Femme
Pronostic favorable	> 1,42 mmol/l	> 1,68 mmol/l
Risque standard	0,90 – 1,42 mmol/l	1,16 – 1,68 mmol/l
Indicateur de risque élevé	< 0,90 mmol/l	< 1,16 mmol/l

I.5.6.3.3.4. Précision

Cette méthode sur Mindray BS300 a été testé par le fabricant par rapport au réactif utilisé sur le système HITACHI/ROCHE avec une corrélation $R^2 = 0,99$.

I.6. Tests statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de Microsoft Excel 2013 et logiciel epi info version 3.5.4. associé au logiciel R. Nous avons comparé les deux méthodes de détermination de la concentration de C-LDL par le test Z et pour chaque paramètre (âge, genre, paramètres lipidiques, aspect du plasma) en fonction du taux plasmatique de C-LDL mesuré par méthode enzymatique et calculé par la formule de Friedewald, nous avons évalué p, et $p < 0,05$ est significatif avec un intervalle de confiance 95%. Le test Z permet de comparer les moyennes de deux variances connues mais différentes où l'une est supérieure à l'autre. Ainsi, nous pouvons déduire que plus l'écart-type est réduit plus il y a une grande précision d'une variance par rapport à l'autre.

I.8. Limites de l'étude

Plusieurs facteurs limitent notre étude :

- La taille de la population qui est faible.
- L'étude concerne uniquement des patients hospitalisés avec une pathologie évidente. En effet, seuls ces patients hospitalisés ont eu une demande de dosage direct du C-LDL ;
- Le respect des conditions de jeun strict exigées lors de l'analyse du métabolisme et celles plus spécifiques à l'exploration du métabolisme lipidique n'ont pas pu être vérifiées étant donné qu'il s'agit de patients hospitalisés.
- L'alimentation des sujets la veille du test n'a pas été tenue en compte.

II. Résultats

Parmi les 10655 demandes d'analyses biochimiques reçues à l'UPFR en Biochimie du CHU-JRA, nous avons pu analyser 167 échantillons de plasma, mais nous n'avons pas inclus 63 échantillons mais inclus 104 échantillons de plasma soit 0,97% des analyses totales reçues par le Laboratoire.

II.1. Répartition des prescriptions du dosage direct de C-LDL

II.1.1. Selon les services cliniques

Par ordre croissant, les services demandeurs sont résumés dans le tableau VII

Tableau VII : Fréquence et pourcentage des services demandeurs

Service demandeur	Fréquence	Pourcentage (%)
CHU-HJRB		
- Cardiologie etUSIC	29	27,88
- Neuro-psychiatrie	15	14,42
- Rhumato-dermatologie	10	9,61
- Néphrologie	9	8,65
- ATUR CHU-JRB	5	4,81
- Hépto-gastro-entérologie	4	3,84
- Pneumologie	4	3,84
- USFR Endocrinologie	2	1,92
- Maladies infectieuses	2	1,92
CHU-JRA		
- Réanimation médicale et toxicologie	9	8,65
- Chirurgie vasculaire	6	5,76
- Réanimation chirurgicale	3	2,89
- Chirurgie thoracique	2	1,92
- Neuro-chirurgie	2	1,92
- Urologie	1	0,96
- Oncologie	1	0,96
TOTAL GENERAL	104	100

II.1.2. Répartition du dosage de C-LDL D selon les renseignements cliniques

Le tableau VIII résume les principaux renseignements cliniques fournis lors d'une demande de dosage direct de C-LDL

Tableau VIII : Principaux renseignements cliniques

Renseignements cliniques	Fréquence	Pourcentage (%)
Pathologies cardiovasculaires		
- Hypertension artérielle	40	38,46
- Accident vasculaire cérébral	22	21,15
- Insuffisance cardiaque	5	4,81
- Syndrome coronarien aigu	3	2,88
- Troubles de rythme cardiaque	3	2,88
- Signes vasculaires	3	2,88
Sous total	76	73,07
Diabète	2	1,92
Signes neurologiques	6	5,77
Signes infectieux		
- Zona intercostal	1	0,96
- Toux chronique	2	1,92
Sous total	3	2,88
Pathologies et symptômes divers		
- Œdèmes des membres inférieurs	6	5,77
- Surpoids	1	0,96
- Signes gastro-intestinaux	6	5,77
- Altération de l'état général	1	0,96
- Dyspnée	3	2,88
- Signes cutanés (érythrose)	1	0,96
Sous total	20	19,23
TOTAL GENERAL	104	100

Les signes vasculaires regroupent l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, la varice rompue, la gangrène.

Les autres signes neurologiques sont les céphalées, les fourmillements des membres, les neuropathies et le trouble de la conscience.

Les signes gastro-intestinaux sont l'épigastralgie, le vomissement, la dysphagie, et le méléna.

II.2. Résultats du dosage des C-LDL D et après calcul de Friedewald selon le genre

Parmi les 104 patients, le dosage de C-LDL a concerné 59 femmes soit 56,73% du total et 45 hommes (43,27%). Le sexe ratio est de 0,76 (H/F)

Pour le genre masculin, le taux moyen de C-LDL après dosage direct est de 2,13+/- 0,70 mmol/l et après calcul il est en moyenne de 2,64+/- 0,99 mmol/l

Tableau IX : Valeurs moyennes en mmol/l (moyennes +/- écart-type) des paramètres lipidiques selon le genre

	Hommes n = 45	Femmes n = 59	Total n = 104
C-LDL_D	2,13 +/- 0,70	2,02+/-0,75	2,07+/-0,73
C-LDL_F	2,64+/- 0,99	2,50+/-1,05	2,44+/-1,01
Cholestérol total	4,50 +/- 1,13	4,50+/-1,24	4,38+/-1,19
C-HDL	1,14+/-0,30	1,28+/-0,41	1,18+/- 0,37
TG	1,56+/-0,83	1,56+/-0,76	1,38+/-0,79

(C-LDL_D : C-LDL mesuré par méthode directe en phase homogène)

(C-LDL_F : C-LDL calculé selon la formule de Friedewald)

La comparaison des taux de C-LDL obtenues avec les 2 méthodes montre qu'il n'y pas de différence significative avec p value > 0,05

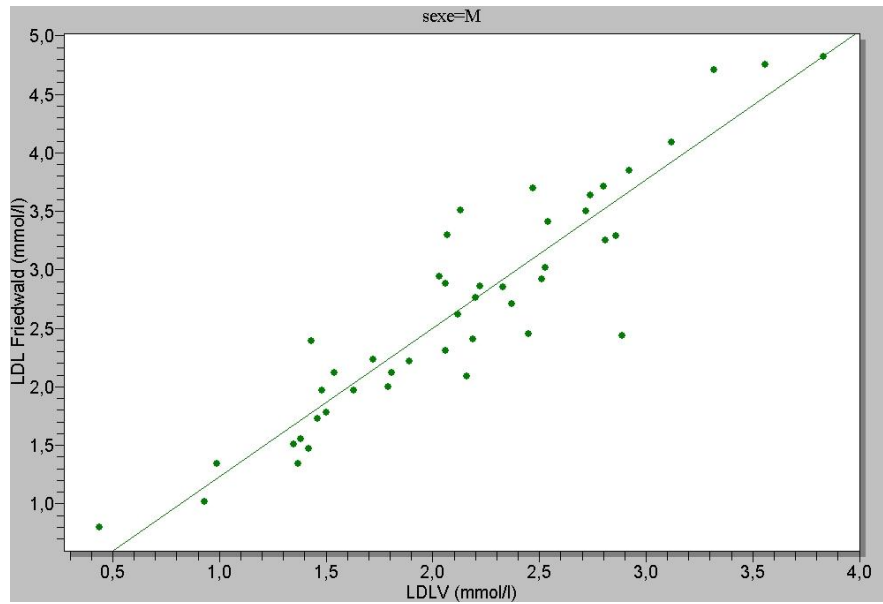


Figure 21 : Corrélation entre les valeurs du C-LDL direct et selon la formule de Friedewald chez les hommes (n=45).

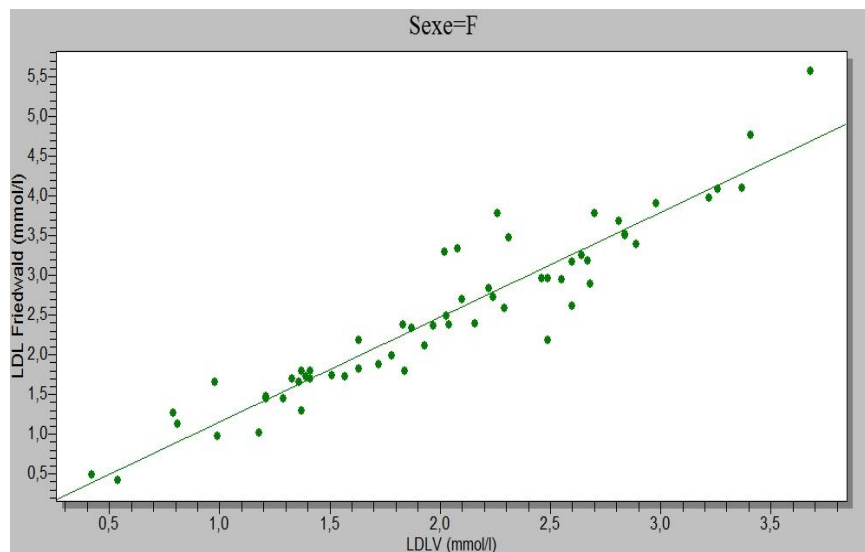


Figure 22 : Corrélation entre les valeurs du C-LDL direct et selon la formule de Friedewald chez les femmes (n=59).

II.3. Résultats du dosage des C-LDL_D et après calcul de Friedewald selon l'âge

L'âge de nos patients allait de 23 ans à 87 ans avec une moyenne de 57,27 ans $\pm$ 13,77. Il n'y a pas eu de prescription pour les moins de 18 ans.

La prescription des dosages lipidiques est observée surtout chez les adultes entre 18 ans et 60 ans avec au total 58 prescriptions soit 55,77%. Leur taux moyen de C-LDL par méthode directe (C-LDL_D) est de 2,11 $\pm$ 0,72 mmol/l et après calcul de 2,61 $\pm$ 1,02 mmol/l.

Les 46 prescriptions restantes ont été indiquées chez les sujets âgés de plus de 60 ans soit 44,23% avec un taux moyen de C-LDL de 2,01 mmol/l (0,44 – 3,68) par méthode directe et 2,50 $\pm$ 1,04 mmol/l par calcul.

Tableau X : Valeurs moyennes des substrats lipidiques selon l'âge (ans)

Âge (en années)	< 18 (n = 0)	18 - 60 (n = 58)	> 60 (n = 46)
C-LDL _D	-	2,11 $\pm$ 0,72	2,01 $\pm$ 0,75
C-LDL _F	-	2,61 $\pm$ 1,02	2,50 $\pm$ 1,04
Cholestérol total	-	4,57 $\pm$ 1,17	4,41 $\pm$ 1,22
C-HDL	-	1,18 $\pm$ 0,36	1,26 $\pm$ 0,38
TG	-	1,68 $\pm$ 0,79	1,41 $\pm$ 0,77

(C-LDL_D : C-LDL mesuré par méthode directe en phase homogène)

(C-LDL_F : C-LDL calculé selon la formule de Friedewald)

La comparaison des taux de C-LDL obtenues avec les 2 méthodes selon l'âge montre qu'il n'y pas de différence significative avec p value > 0,05. Ensuite, quel que soit l'âge du sujet, on note une bonne corrélation entre l'âge et C-LDL_D et C-LDL_F avec $r^2 = 0,99$ pour les moins de 60 ans et $r^2 = 1,00$ pour les plus de 60 ans (**figures 23 et 24**).

Le C-LDL_D est plus précis car son écart-type est réduit.

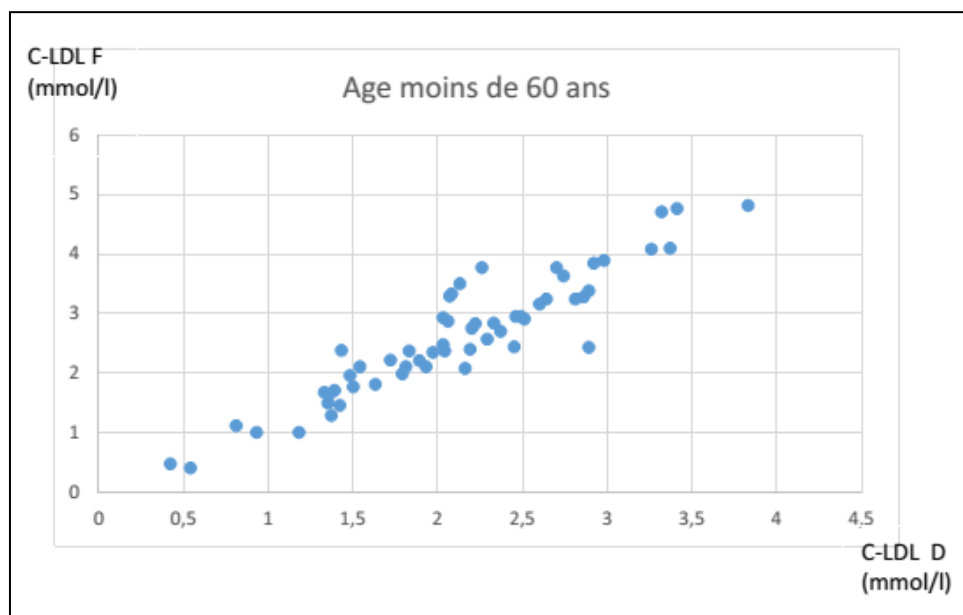


Figure 23 : Corrélation entre les taux de C-LDL_D et C-LDL_F pour les moins de 60 ans (n = 57)

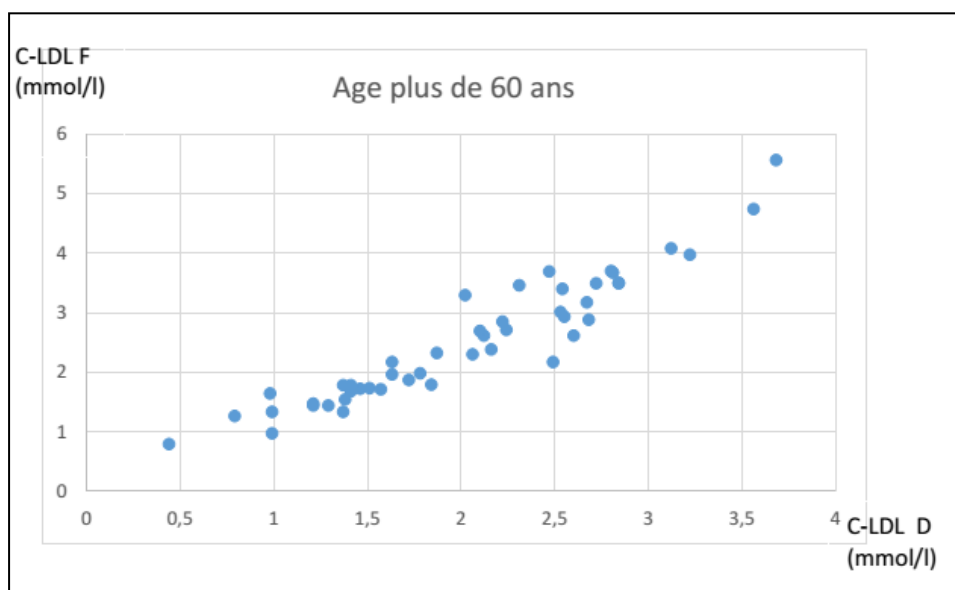


Figure 24 : Corrélation entre les taux de C-LDL_D et C-LDL_F pour les plus de 60 ans (n= 47)

II.4. Comparaison des résultats de C-LDL obtenus avec les deux méthodes

La détermination du C-LDL par les méthodes directes C-LDL suivie de calcul par la formule de Friedewald nous a permis d'avoir un résultat comme suit :

II.4.1 Comparaison globale des taux de C-LDL obtenues avec les deux méthodes

Pour toute la population confondue, on note une différence significative entre les résultats de C-LDL_D et C-LDL_F avec respectivement une moyenne de 2,07 mmol/l pour le C-LDL D contre 2,59 mmol/l si le C-LDL est calculé.

Le test Z est $> 1,96$ et p value $< 0,05$. La différence est en moyenne de -0,51 mmol/l. Il y a une corrélation positive entre C-LDL_D et C-LDL_F avec $r^2=0,97$.

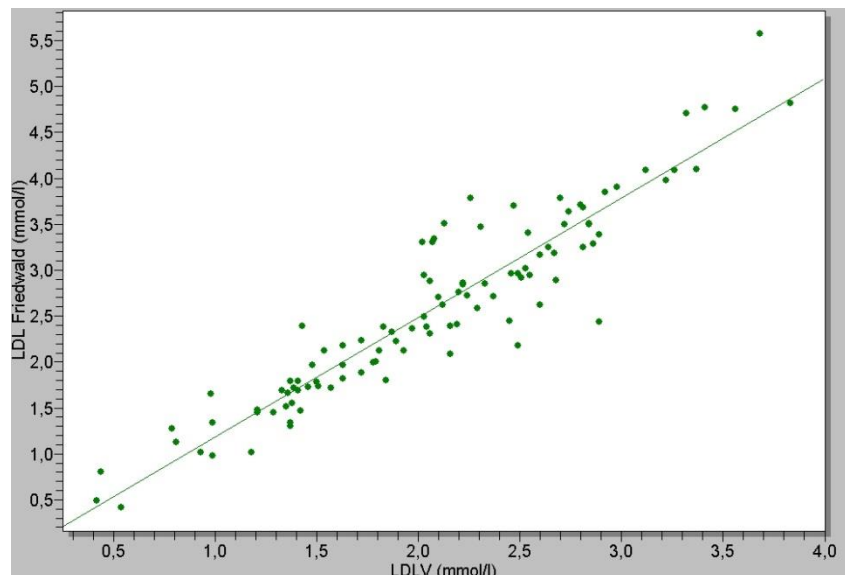


Figure 25 : Corrélation entre les valeurs du C-LDL direct et selon la formule de Friedewald pour la population en général (n=104).

II.4.2. Comparaison des taux de C-LDL_D et C-LDL_F selon les paramètres lipidiques étudiés

Les tableaux suivants nous montrent une différence significative entre C-LDL_D et C-LDL_F

. Selon le taux plasmatique de cholestérol total avec p value $< 0,05$ (**Tableau XII**)

Tableau XI : Comparaison entre les taux de C-LDL_D et C-LDL_F en fonction des taux plasmatiques de cholestérol total

Cholestérol total (mmol/l)	n	C-LDL_D (mmol/l)	C-LDL_F (mmol/l)
1,29 – 2,57	5	0,75	0,91
2,58 – 3,84	26	1,42	1,64
3,85 – 5,13	38	2,00	2,47
5,14 – 6,42	28	2,71	3,41
≥ 6,42	7	4,39	3,25

Il en est de même pour le C-HDL (**Tableau XIII**), on note une différence significative avec p value < 0,05 entre les taux C-LDL_D et C-LDL_F selon les taux plasmatiques de cet analyte.

Tableau XII : Comparaison entre les taux de C-LDL_D et C-LDL_F en fonction des taux plasmatiques de C-HDL

C –HDL mmol/l	n	C-LDL_D (mmol/l)	C-LDL_F (mmol/l)
< 0,90	20	1,86	2,42
0,90 – 1,50	63	2,11	2,61
1,50 – 2,30	21	2,13	2,62

- Cette différence significative entre le C-LDL D et C-LDL F est également notée avec les valeurs de la triglycéridémie (Tableau XIV) soit une p value < 0,05.

Tableau XIII : Comparaison des taux de C-LDL_D et C-LDL_F en fonction de la triglycémie.

Triglycérides (mmol/l)	n	C-LDL _D (mmol/l)	C-LDL _F (mmol/l)
0,01 – 1,14	39	1,88	2,43
1,15 – 2,28	46	2,04	2,52
2,29 – 3,42	16	2,46	2,98
3,43 – 4,50	3	2,75	3,10

II.5. Stratification du risque cardiovasculaire avec le C-LDL

On considère qu'un sujet est à haut risque cardio-vasculaire si son taux de C-LDL excède les 3,35 mmol/l sans tenir compte des autres facteurs de risque (seuil d'intervention thérapeutique ou à risque cardio-vasculaire). Le **tableau XIV** montre que 5 patients (soit 4,80%) dans les tranches d'âge de 44 à 73 ans sont considérés à haut risque si on utilise le taux de C-LDL_D contre 24 (23,07%) si on utilise le C-LDL_F.

Tableau XIV : Stratification du risque cardiovasculaire selon les taux de C-LDL

C-LDL (mmol/l)	Stratification du risque cardio-vasculaire	C-LDL _D (n)	C-LDL _F (n)
< 2,58	Optimal	77	55
2,59 – 3,33	Près de l'optimal	22	24
3,34 – 4,10	Limite haute	5	20
4,11 – 4,89	Haute	0	4
> 4,90	Très haute	0	1

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

Dans la plupart des études et en pratique médicale courante, le C-LDL est estimé par la formule de Friedewald. Les recommandations internationales soulignent l'importance de la détermination du cholestérol-LDL (C-LDL) dans la prise en charge et le suivi des patients à risque cardiovasculaire [2-8, 10, 15, 37, 44-55].

L'objectif de notre travail est de comparer le taux de C-LDL déterminé par une méthode enzymatique en phase homogène directe (C-LDL_D) par rapport à celui obtenu par la formule de Friedewald (C-LDL_F). Dans un deuxième temps, l'étude nous permettra de situer le risque de nos patients.

I. Lieu de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective qui a duré 6 mois au sein du Laboratoire de Biochimie de l' HU/JRA et qui nous a permis de colliger 104 dossiers. Ces patients ont eu une demande de dosage de C-LDL par méthode directe et pour pouvoir faire le calcul du C-LDL par la formule de Friedewald, le patient doit avoir également les autres bilans lipidiques qui sont : le dosage du Cholestérol total, le dosage du C-HDL et des triglycérides.

Au cours de cette période, le Laboratoire a reçu 10655 demandes d'analyses et le C-LDL_D ne représente qu'un faible pourcentage des activités du Laboratoire soit 0,97% des analyses. Ce faible taux de prescription du C-LDL pourrait s'expliquer de plusieurs manières :

- Il s'agit d'un dosage direct par le procédé de Wako grâce à l'utilisation d'un automate de biochimie clinique, un système ouvert sur lequel les autres méthodes peuvent y être adaptées ultérieurement lorsque les contraintes de garantie de l'appareil seront levées, ce dosage a été mis en place au Laboratoire puis mis à la disposition des cliniciens seulement vers le début du mois de février 2013, date à laquelle la direction de l'Hôpital a fait l'acquisition de l'automate.

Quoi qu'il en soit, nous supposons que la taille de la population de notre étude (n = 104) est statistiquement raisonnable. Généralement, un minimum de 50 à 120 individus sont nécessaires pour des études statistiques en biologie pour une population dont la distribution est symétrique et environ 200 lorsque la distribution est non

symétrique, 120 selon les recommandations de l'IFCC [1]. Des études similaires sont réalisées sur 45 échantillons pour Bayer P et *al.* [37] contre 355 pour Nauck M et *al.* [15].

- Les services hospitaliers ne sont pas correctement informés de la disponibilité du test ce qui traduit le problème de communication entre le laboratoire et les services cliniques. En effet, les cliniciens n'ont pas à leur disposition un guide des analyses qui devrait être distribué par le soin du Laboratoire. Tout au plus, il existe les fiches de demande d'analyses dans lesquelles figurent ce test mais, ces fiches ne sont pas non plus déposées dans les Services par souci d'économie. En délivrant ces fiches uniquement lorsque les services en font la demande, le labo prend le risque de ne pas mettre régulièrement les cliniciens au courant des analyses qu'il est capable d'effectuer.

II. Comparaison des résultats de C-LDL selon les services prescripteurs

Il n'a pas été noté dans notre étude une prescription du dosage pour des patients externes (i.e. non hospitalisés). Le dosage du C-LDL_D est surtout demandé par les cliniciens en milieu hospitalier. Il s'agit principalement du service de Cardiologie (27,88%).

Ce dosage enzymatique direct pratiqué dans notre laboratoire est assez nouveau à Madagascar, d'autres alternatives doivent être mises en place et d'autres études en perspective doivent être faites pour tous les patients même à titre externe et pour chaque tranche d'âge.

Ce faible pourcentage concernant la prescription du dosage direct des C-LDL confirmerait également les recommandations. En effet, le calcul du C-LDL par la formule de Friedewald serait encore largement utilisé par nos cliniciens, utilisation qui date de l'année 1972 puisqu'elle est moins onéreuse par rapport au dosage direct. Dans la plupart des études, dans les recommandations internationales et en pratique courante le C-LDL est toujours estimé par la formule de Friedewald [2-9, 10, 15, 37, 43-52] même s'il est actuellement reconnu que ce calcul présente un défaut d'exactitude en raison de sa dépendance aux trois autres paramètres. En effet, même si la Formule de Friedewald présente une bonne corrélation avec la méthode de référence qui est la bêta quantification lorsque la triglycémie est inférieure à 4,50 mmol/l, elle cumule les variabilités analytiques et biologiques des 3 dosages indépendants et ne peut être

appliquée si le prélèvement n'est pas réalisé à jeun strict. Ainsi, lorsque la concentration de triglycérides est supérieure à 4,50 mmol/l, le résultat n'est plus corrélé à la méthode de référence [9, 15, 37, 44-52] (ce qui n'est pas notre cas puisque cette valeur de triglycéridémie constitue le critère de non inclusion). D'autres études ont également mis en évidence l'inexactitude de ce calcul lors de concentrations modérément augmentées de Triglycérides (entre 3,41 – 4,56 mmol/l) ou lors des hyperlipoprotéïnémies secondaires rencontrées au cours du diabète ou de l'insuffisance rénale [15, 37, 51, 52].

Enfin, ce dosage direct coûte dans les 10 000 Ariary, un tarif qui est assez cher pour des patients qui financent eux même les coûts de leur soin, un coût non négligeable à rajouter aux coûts des autres dosages qui seront toujours effectués dans le cadre d'un bilan lipidique pour des patients qui financent eux même les coûts de leur santé. ce qui est le cas à Madagascar. Son utilisation en routine pour évaluer le risque cardiovasculaire en remplacement de la formule de Friedewald suscite actuellement plusieurs avis divergents [10, 14,15, 20, 43, 51, 52]. Nous pensons que, il trouvera tout son intérêt non pas en routine mais dans certains cas précis (invalidité des formules de calcul habituellement utilisées, bilan lipidique d'interprétation délicate).

Aussi des récentes publications proposent une nouvelle méthode de calcul du C-LDL selon Friedewald (notée C-LDL_N) pour estimer le risque cardio-vasculaire [44, 45]. C'est une équation qui introduit un facteur ajustable tenant compte du ratio TG:VLDL et qui évaluerait plus précisément les VLDL. Le taux de C-LDL selon cette nouvelle équation de Friedwald [44, 45, 52] peut être calculé comme suit :

C-LDL_N = [Cholestérol Total] – [C-HDL] – [Triglycérides] / X avec:

- tous les paramètres sont en mmol/l ;
- et X, un facteur ajustable décrit dans les travaux de [52] et égal à 0,37 si les triglycérides sont en mmol/l selon Stein EA [53].

Sa mise en œuvre dans la pratique clinique serait simple et pratiquement sans frais supplémentaire pour le clinicien et en particulier pour les patients dont le taux de C-LDL est inférieur à 1,80 mmol/l. Mais, même si cette nouvelle équation est considérée comme plus précise que la formule standard de Friedewald, elle nécessite encore des procédures de validation et elles doivent faire encore l'objet d'évaluation clinico-biologique et des études multicentriques pour déterminer les cadres de leur application

et quelles nouvelles formules sont les mieux applicables chez nous, si les patients n'ont pas le moyen d'avoir le C-LDL par dosage direct. Nous reviendrons plus loin sur cette nouvelle formule de Friedewald.

III. Comparaison des résultats de C-LDL selon les renseignements cliniques

Le dosage direct de c-LDL est observé principalement au cours de pathologies cardiovasculaires (n = 76 soit 73,07% du total).

III.1. L'utilisation du C-LDL_D au cours des pathologies cardiovasculaires

Dans la majorité des cas (n = 40 soit 38,46 %), elle a concerné des patients hypertendus. Douze patients avaient un taux de C-LDL supérieur à 3,35 mmol/l après calcul et seuls 3 patients si l'on ne tient compte que du taux de C-LDL_D. On peut considérer alors que la formule de Friedewald classe plus de patients comme étant à haut risque que la méthode directe. Ces différences entre taux de C-LDL_D et C-LDL_F peuvent être dues à certains médicaments antihypertenseurs tels que des diurétiques et des bêta-bloquants, molécules largement utilisés à Madagascar. Elles sont sources d'effets secondaires sur les métabolismes glucidique et lipidique et donc une modification des différentes fractions lipidiques à l'origine d'une interférence sur le calcul [55-58].

- En effet, les thiazides et les diurétiques de l'anse qui sont encore très utilisés à Madagascar sont la cause de l'élévation des taux de cholestérol total, du C-VLDL sans modification de la fraction C-HDL [56-58] et donc de modification du taux de C-LDL calculé dans le sens d'une augmentation. Selon Freis [58], ces altérations lipidiques sont fonction de la dose et de la durée d'utilisation des diurétiques.
- Pour les bêta-bloquants non sélectifs et les bloquants bêta 1 sélectifs, ils sont associés à une élévation des triglycérides et donc des VLDL, une diminution du C-HDL alors que le cholestérol total est non modifié.

Tout ceci explique l'importance de la détermination précise des autres facteurs de risque cardio-vasculaire chez les patients hypertendus et d'un dosage précis et exact du C-LDL. En effet parmi les 12 patients de notre étude, 3 avaient une hypoHDLémie inférieure à 0,96 mmol/l et indépendamment du taux de C-LDL, 6 patients avaient un

taux de C-HDL inférieur à 0,96 mmol/l. Cette hypoHDLémie pourrait expliquer la différence entre les valeurs de C-LDL_D et C-LDL_F.

Il est ensuite généralement admis que tout patient hospitalisé pour un évènement cardiovasculaire plus ou moins majeur et en particulier coronarien doit avoir un bilan lipidique dans les 24 heures qui suivent son admission [7, 8, 51]. Aussi, la prescription des cliniciens suit certaines recommandations pratiques. Les autres principales pathologies cardio-vasculaires sont :

- Les AVC qui représentent 22 cas (soit 21,15%) avec une moyenne de C-LDL_D à 1,78 mmol/l contre 2,16 mmol/l pour le C-LDL_F soit une différence de 0,38 mmol/l.
- Nous avons eu 3 cas de syndrome coronarien aigu (soit 2,88%). Il s'agit d'une femme de 63 ans et 2 hommes de 44 ans et 67 ans dont seulement un d'entre eux avait un taux de C-LDL_D inférieur à 1,81 mmol/l. Après calcul, tous les trois ont un C-LDL_F élevé supérieur au seuil de risque coronarien.
- L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs avec un C-LDL_F à 0,49 mmol/l contre C-LDL_D 0,42 mmol/l soit une différence de 0,07 mmol/l.

Ces taux de C-LDL qui sont inférieurs à la limite inférieure de la normale seraient liés à la défaillance qualitative des C-LDL qui sont petites et denses expliquant l'arrivée des accidents vasculaires chez les individus ayant une hypertriglycémie.

Cette différence peut être également due au syndrome métabolique (ou syndrome X) qui peut être rencontré dans une série de situations cliniques. Ce syndrome composé de plusieurs anomalies métaboliques (hyperglycémie et hypertriglycémie) conduisent à la production de C-LDL petites et denses. Il est aussi caractérisé par la présence de faibles niveaux de HDL et de petites particules HDL, de VLDL, de chylomicrons, d'Apo B 100 [2, 40, 59, 60].

Cette prédominance des prescriptions du dosage de C-LDL_D au cours des pathologies cardiovasculaires concorde avec les recommandations internationales [6-8, 43, 47, 48]. En effet, l'hypercholestérolémie et particulièrement l'augmentation de la fraction de cholestérol liée aux lipoprotéines de faible densité (C-LDL) représente un risque cardiovasculaire bien établi et les études de prévention primaire et secondaire confirment clairement la relation entre concentration de C-LDL et morbi-mortalité cardiovasculaire. C'est pourquoi les recommandations soulignent l'importance de la

détermination du C-LDL dans la prise en charge et le suivi des patients à risque cardiovasculaire.

Une question majeure se pose alors : pourquoi la méthode de détermination du taux de C-LDL est-elle si importante chez les patients à haut risque cardiovasculaire ou qui présentent déjà la pathologie ?

- Selon Robinson et *al.* [49], une réduction du taux de C-LDL de 1%, permettrait de réduire la maladie coronarienne de 1%. Toutes les études épidémiologiques [6, 7, 9, 51-54], mettent en évidence une corrélation positive entre le taux de C-LDL athérogène et la fréquence des complications cardiovasculaires. Et ces études ont démontrées que l'athérosclérose peut régresser si on agit très tôt sur les facteurs de risque. Cette régression peut être soit un ralentissement de sa progression, une stabilisation voire une véritable régression des lésions jeunes par rapport à un groupe placebo [51].

Une diminution de 1 mmol/l du taux de C-LDL permettrait de diminuer la mortalité de 12% toute cause confondue, et aussi de diminuer de 23% de l'incidence de l'infarctus du myocarde, cause majeure de décès d'origine coronarienne [54] ;

- Enfin, l'objectif du traitement est de diminuer le taux de C-LDL à moins de 2,00 mmol/l, ce traitement est capable de modifier le taux de cholestérol et ainsi d'entraîner un changement de l'épaisseur de l'intima-média [6, 55, 56].

III.2. L'utilisation du C-LDL_D au cours du Diabète

Nous avons 2 demandes de C-LDL_D pour des sujets diabétiques avec des taux de C-LDL différents après calcul et en dosage direct. Il s'agit de 2 hommes âgés de 51 ans présentant tous les deux une hypertriglycémie supérieure à 1,48 mmol/l et une diminution du taux de C-HDL inférieur à 0,96 mmol/l. Ensuite, leur taux de C-LDL que ce soit calculé par la formule de Friedewald ou obtenu par méthode directe est inférieur à 3,35 mmol/l mais supérieur à 1,81 mmol/l.

Ce dosage direct est logique et suit les données de la littérature qui recommande l'utilisation du C-LDL par dosage direct [61-63]. En effet, les patients diabétiques qui ont plus de 50 ans développent un risque de coronaropathie dans 67% des cas chez l'homme et 57% pour la femme [64].

Ensuite, la notion de glycation de l'Apo B au cours du diabète mérite un point d'importance. La glycation de toutes les protéines ApoB/ApoE est responsable d'une altération de la liaison des C-LDL à son récepteur ainsi que son épuraison plasmatique d'où l'augmentation de son taux plasmatique et son accumulation dans la plaque athéromateuse. Cette glycosylation est interdépendante de l'oxydation. Plus il y a glycosylation, plus il y a oxydation [65], favorisant la captation rapide et l'absorption par macrophages donc une stimulation de la formation de cellules spumeuses associée à la libération de cytokines toxiques pour endothélium.

Aussi, chez les diabétiques, beaucoup d'anomalies lipidiques s'installent [66] comme l'hypertriglycéridémie et donc une augmentation des VLDL, l'hypoHDLémie, l'augmentation du taux d'Apo B et surtout une anomalie qualitative du C-LDL qui est caractérisée par la présence de petites particules hautement athérogènes. Ces facteurs permettent d'expliquer les différences de concentrations lorsqu'on effectue le calcul et le dosage du C-LDL et l'importance du dosage direct.

Chez le diabétique, le taux de triglycérides est fréquemment supérieur à 4,50 mmol/l. On peut noter également la présence d'IDL dans le sérum/ou plasma à jeun si le diabète est déséquilibré. Tout ceci entraîne une difficulté de dosage de C-HDL d'où une imprécision et par conséquent une erreur sur le C-LDL_F. Notre étude a montré une différence de 0,43 mmol/l entre C-LDL_F et C-LDL_D avec surestimation du risque chez les diabétiques si utilisation du C-LDL_F expliquant ainsi pourquoi plusieurs auteurs recommandent de ne pas utiliser la Formule de Friedewald chez les patients atteints de diabètes, de maladies du foie et du rein [15, 36, 62, 63, 67].

III.3. L'utilisation du C-LDL_D au cours des pathologies infectieuses

Nous avons eu un cas de toux chronique chez une femme de 75 ans avec une diminution de C-HDL à 1,28 mmol/l. ce qui pourrait expliquer la différence entre son C-LDL_D (3,56 mmol/l) et C-LDL_F (4,75 mmol/L).

Nous avons aussi rapporté un cas de zona intercostal chez un homme de 57 ans dont le taux plasmatique de cholestérol total est de 4,63 mmol/l, une discrète hypertriglycéridémie à 1,96 mmol/l alors que le taux de C-HDL est diminué à 0,85 mmol/l. Le taux de C-LDL est dans la limite des valeurs de référence mais on note une différence de 0,82 mmol/l entre C-LDL_F (2,88 mmol/l) et C-LDL_D (2,06 mmol/l).

Toutefois, la formule de Friedewald surestime le C-LDL. Nos résultats concordent avec les résultats d'autres études [68] qui décrivent dans ces cas que le taux de C-LDL reste dans la fourchette de la normalité mais c'est probablement le phénotype B qui est à l'origine de l'athérogénicité des LDL avec une diminution de l'immunité.

Selon Tedgui A [26] et [69], la réaction inflammatoire chronique au niveau intimal a favorisé la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL4, l'IL13, le TGF β , et surtout l'IL10. Ce déséquilibre de production de l'IL10 va augmenter les chances d'installation surtout dans un contexte immuno-inflammatoire si le sujet est infecté par certains germes en particulier *Chlamydia pneumoniae*.

Par contre, Evans et al [70] ont trouvé des résultats contraires où le C-LDL_F sous-estime le taux de C-LDL contrairement au dosage direct. En fait, leurs patients étaient sous antirétroviraux et donc sujets à une hypertriglycémie mais aussi à diminution de C-HDL et par conséquent, le taux de C-LDL peut être augmenté ou normal. Ce résultat est également constaté par El-Sadr WM et *al.* dans leur publication [71].

En tout cas ces anomalies lipidiques observés au cours de pathologies infectieuses et notamment virales doivent être prises en charge correctement puisque elles sont liées à des événements cardiovasculaires [72, 73].

III.3.4. L'utilisation du C-LDL_D au cours des Pathologies et symptômes divers

De cette étude, on peut constater :

- que premièrement, les médecins n'ont pas l'habitude de prescrire les bilans lipidiques en général et le C-LDL en particulier dans le cadre d'un bilan systématique de santé ;
- et que deuxièmement, des recommandations nationales à l'instar de celles établies par la NCEP [6, 43] ou comme celles de l'ESA ou l'ECA [7, 8] n'existent pas encore à Madagascar. Ce qui pourrait expliquer la disparité des renseignements cliniques fournis lors de la demande de dosage de C-LDL.

Aussi, nous avons retrouvé dans notre étude une prescription de C-LDL_D pour des œdèmes des membres inférieurs. Ce symptôme concerne 6 cas et il pourrait s'agir d'un dosage de C-LDL qui rentre dans le cadre d'un bilan rénal en vue d'orienter le

diagnostic étiologique. La moyenne du C-LDL_F est de 2,35 mmol/l, celle de C-LDL_D est de 2,08 mmol/l avec une moyenne de différence de 0,27 mmol/l.

Moulin B [74] a déjà décrit en 2000 les types d'anomalies lipidiques qui peuvent survenir au cours de l'insuffisance rénale : une augmentation du taux de TG, de VLDL et IDL, de la Lp(a) ce qui pourrait expliquer la différence entre le C-LDL_D et le C-LDL_F quand il est calculé. Ces analyses lipidiques sont importantes en termes de prise en charge d'où la nécessité d'un dosage précis car les patients insuffisants rénaux avec une protéinurie et des anomalies lipidiques sont classés comme étant à haut risque, leur risque relatif d'IDM est de 5,5 [75]. Ainsi, Muso et *al.* [76] avaient conclu dans leur étude que si les patients présentant un syndrome néphrotique sont traités par aphérèses, les conséquences seraient les suivantes : une diminution de leur taux de C-LDL, de leur protéinurie et ensuite une amélioration de leur fonction rénale.

L'étude du groupe SHARP [77] en 2010 a établi qu'un taux bas de C-LDL diminue l'incidence d'évènement cardiovasculaire majeur. Mais selon Anavekar et Pfeffer [78], leur risque augmente indépendamment des autres facteurs. Un seul patient avait un taux de C-LDL inférieur à 1,81 mmol/l (C-LDL_D égal à 0,81 mmol/l contre un C-LDL_F à 1,13 mmol/l) et un taux de C-HDL égal à 0,37 mmol/l c'est une hypoHDLémie sévère (< 0,96 mmol/l) qui indique un risque élevé même si son taux de LDL est bas.

Nous avons eu un cas de surpoids chez une femme de 44 ans qui rentre dans le cadre d'un syndrome métabolique avec une surcharge pondérale et des troubles métaboliques à savoir une hypertriglycéridémie à 2,11 mmol/l mais sans diminution du taux de C-HDL (1,14 mmol/l) ni augmentation du taux de C-LDL (< 3,35 mmol/l). Ce taux de C-LDL est surestimé par la formule de Friedewald (3,25 mmol/l contre 2,64 mmol/l en dosage direct) soit une différence est de 0,61 mmol/l. Comme nous l'avons étudié dans le chapitre **III.3.1**, cette différence serait liée premièrement à une modification qualitative des C-LDL qui deviennent petites et denses et une augmentation de l' Apo B. Dans la plupart des cas, il s'agit du phénotype B dont l'incidence augmente également avec celle du diabète [79]. Deuxièmement, elle peut être due à une modification d'un ou plusieurs composants de la formule de Friedewald. Au cours de ce syndrome métabolique, les hépatocytes transforment les acides gras libres non estérifiés (AGNE) en triglycérides expliquant ainsi l'hypertriglycéridémie qui

conduit ensuite à un échange d'acides gras et de cholestérol estérifié vers les VLDL et les chylomicrons d'une part tandis que les triglycérides sont transférées à des particules de LDL et d'HDL qui deviennent petites et denses et dont les potentiels athérogènes sont bien connus.

Lorsque le taux de triglycérides augmente au-delà de 1,71 mmol/l, l'hypertriglycémie stimule l'action du CETP entraînant un enrichissement en triglycérides des C-LDL d'où l'augmentation du C-LDL après calcul.

Un cas d'altération de l'état général pour un patient hospitalisé dans le Service d'Oncologie a été observé. Il s'agit d'un homme de 29 ans, ayant un taux de C-LDL_D à la limite de la valeur physiologique (1,81 mmol/l) mais une surestimation de C-LDL_F à 2,12 mmol/l soit une différence de 0,31 mmol/l.

Une forte association entre faible taux de C-LDL et risque de cancer existe mais le mécanisme est encore mal élucidé [80].

Dans tous les cas i.e. quelle que soit la pathologie concernée, concernant les différences entre les résultats de C-LDL_D et C-LDL_F, elles peuvent être liées :

- Premièrement, au fait que le taux « normal » de cholestérol total peut varier selon l'heure, la saison et en fonction d'autres facteurs et même d'un jour à l'autre.
- Deuxièmement, la triglycémie est très variable en fonction des conditions diététiques. Or, une hypertriglycémie favorise l'augmentation des VLDL et la tendance à former les LDL denses ce qui modifie le taux de C-LDL par calcul [59, 60].
- Et troisièmement, au fait qu'il s'agit de patients en milieu hospitalisé et par conséquent le respect de l'état de jeun strict nécessaire lors d'un bilan lipidique est difficilement contrôlable au Laboratoire et par les cliniciens eux-mêmes. En effet, nous n'avons pas eu connaissance de leur alimentation quotidienne ou bien la veille du test qui constitue pourtant un facteur majeur pouvant être responsable de cette différence entre C-LDL_D et C-LDL_F.

Généralement, une période de jeûne de 12H au minimum est exigée pour que la formule de Friedewald soit valide quoi que selon la NCEP [6], il n'y a pas d'association ni pour la méthode directe (p value = 0.72) ni pour la formule de Friedewald (p value = 0,92) même si les sujets ne sont pas à jeûn. Aussi, la méthode directe peut être utilisée

chez des sujets non à jeûn [81]. En effet, une prise alimentaire de faible énergie la veille de l'examen lipidique [82] mais non l'état de jeûn serait à l'origine de la surestimation de C-LDL par la formule de Friedewald.

Mais pour certains auteurs, comme Fukuyama et *al.* [82], la période de jeun qu'elle soit de 12 Heures ou 18 Heures diminue seulement la glycémie mais n'a pas d'influence sur les taux de Triglycérides, de Cholestérol total, de C-HDL et donc ni celui de C-LDL que ce soit le C-LDL_F ou le C-LDL_D.

A l'inverse, la prise de repas énergétique, sous-estime le C-LDL_F mais ne modifient pas les valeurs C-LDL_D. Ceci pourrait expliquer les 9 cas de sous-estimation de C-LDL_F qu'on a pu déceler. Les substrats énergétiques qui sont capables de modifier le taux de C-LDL en méthode directe dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution sont les glucides mais surtout les lipides [83].

- Les acides gras saturés et les acides gras trans font augmenter le taux de C-LDL. On trouve principalement les acides gras saturés dans les aliments prêts à manger (exemples : biscuits, viennoiseries, gâteaux, les aliments transformés d'huile de coco...). Les acides gras trans sont par exemple les pâtisseries, les grignotines, les aliments cuits en grande friture, les margarines contenant des huiles hydrogénés.
- A l'opposé, les acides insaturés qu'ils soient mono ou polyinsaturés et les fibres solubles diminuent le taux de C-LDL.

Aussi, la méthode directe doit être préférée pour la détermination du taux de C-LDL lorsque les sujets ne sont pas à jeun [6, 9, 15, 37].

IV. Comparaison des résultats de C-LDL_D et C-LDL_F selon l'âge et le genre

Il s'agit d'une population assez homogène composée de 59 femmes et 45 hommes soit un total de 104 individus avec un sex-ratio de 0,76. La moyenne d'âge de la population est de 57,27 ans +/- 13,77 avec des extrêmes allant de 23 à 87 ans.

Nous avons noté une prédominance de prescription entre 18 ans et 60 ans avec au total 58 prescriptions soit 55,77%. Or, dans les recommandations internationales, la prescription devrait être systématique vers l'âge de 40 ans et plus tôt vers 18 – 25 ans s'il existe des facteurs de risque cardio-vasculaire personnel et/ou familial [7, 8, 51].

Notre étude a trouvé que le taux de C-LDL augmente avec l'âge ce qui est corrélé avec les résultats observés par [83]. Cette augmentation est retrouvée chez les hommes de plus de 45 ans, mais plus marquée chez la femme en âge de la ménopause. Mais de façon globale, on n'a pas noté de différence significative entre C-LDL_F et C-LDL_D quel que soit l'âge et le genre. Yu Hu et *al.* [84] ont trouvé les mêmes résultats i.e. les valeurs de C-LDL sont les mêmes quelle que soit la méthode utilisée qu'il s'agit d'adultes ou d'enfants mais la méthode directe en phase homogène est recommandée car considérée comme plus précise.

V. Comparaison des résultats de C-LDL selon les méthodes et les paramètres lipidiques

Dans notre étude, nous avons trouvé une différence significative entre C-LDL_F et C-LDL_D avec un p value $< 0,05$ et selon test $Z > 1,92$. On note une corrélation positive entre les deux méthodes $r = 0,97$ puisque globalement, le taux de C-LDL est plus élevé de 0,51 mmol/l par calcul par rapport au dosage direct (soit 2,58 mmol/l contre 2,07 mmol/l respectivement).

Les résultats de notre étude sont comparables à plusieurs études où le taux de C-LDL_F est supérieur à celui du C-LDL_D avec bonne corrélation. Mora S. et *al.* [10] qui a fait une étude comparative sur les taux de C-LDL_F et C-LDL_D ont trouvé des résultats identiques aux nôtres : une corrélation positive avec $r = 0,97$ et une différence significative avec $p < 0,001$. Ainsi, ils ont pu constater qu'il y a une différence de 0,15 mmol/l chez les sujets à jeun, plus élevée (0,30 mmol/l) chez des sujets non à jeun. Bostham et *al.* [85] ont constaté une surestimation de C-LDL_F par rapport à C-LDL_D avec p value $< 0,001$. La différence est de 0,17 mmol/l avec une corrélation de $r = 0,80$. Les travaux d'Anandaraja S. et *al.* [86], avec une bonne corrélation ($r = 0,97$) une différence de 0,08 mmol/l entre C-LDL_D et C-LDL_F (soit une moyenne de C-LDL_D de 3.02 ± 1.08 mmol/l et une moyenne de C-LDL_F de 3.09 ± 1.2 mmol/l). Selon Martin SS et *al.* [52], pour des taux C-LDL inférieurs à 1,81 mmol/l, la moyenne de C-LDL_D est de 0,23 mmol/l plus élevée par rapport au C-LDL_F et en particulier lorsque la triglycéridémie est supérieure à 1,69 mmol/l.

D'autres études ont cependant trouvé avec une bonne corrélation des résultats contraires où c'est le taux de C-LDL_F qui devient inférieur à celui du C-LDL_D. Une différence de 0,15 mmol/l avec une corrélation $r = 0,97$ est observé par Kamezaki F. et

al. [87]. Cette différence devient de 0,27 mmol/l dans les travaux de Vujovic et *al.* [88] qui ont comparé plusieurs formules pour calculer le C-LDL. Ils ont trouvé en moyenne un taux de C-LDL_F inférieur au taux obtenu par dosage direct avec respectivement une moyenne de C-LDL_F à 3,63 mmol/l contre 3,90 mmol/l pour le C-LDL_D. Il s'agit d'une différence significative ($p < 0,001$) avec une bonne corrélation ($r = 0,96$).

Gupta S. et *al.* [89], ont trouvé pratiquement la même différence significative de 0,28 mmol/l ($p < 0,001$) avec une bonne corrélation ($r = 0,93$). Dans leur étude, le taux de CLDL_D est plus bas (en moyenne 3,18+/-1,37 mmol/l) par rapport au taux moyen de C-LDL_F (2,90+/-1,30 mmol/l). Pour Kamal AHM et *al.* [90], la différence augmente et passe à 0,44 mmol/l avec une corrélation $r = 0,78$.

Cette différence entre les deux méthodes qui entraîne soit une surestimation soit une sous-estimation du C-LDL par calcul serait liée à plusieurs facteurs :

- en premier lieu par la méthode directe utilisée,
- ensuite par l'alimentation des patients (que nous avons déjà étudiés auparavant),
- et enfin, à la variabilité de la formule de Friedewald qui est sous la dépendance des paramètres lipidiques pris séparément.

V.1. Selon les méthodes

La différence entre C-LDL_D et C-LDL_F observée dans notre étude peut être liée à la méthode. En effet, c'est le procédé de Wako qui est installé sur notre automate de Biochimie. Les performances analytiques de cette méthode ont été établies selon les recommandations de la CLSI (Notice technique annexée à la fin du document, annexe 1). Appelée « protecting LDL-C method », ce procédé, rappelons-le est basé sur l'utilisation d'un premier réactif (R1) contenant un agent « protecteur » (polyanions et surfactant amphotère) qui masque les LDL aux détergents et aux enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase.

Une comparaison de cette méthode par rapport à la formule de Friedewald est relevée dans une seule publication [15], il n'existe pas une analyse multicentrique. Selon [15], le coefficient théorique de variation serait $\leq 1,2\%$, elle est 1,36% en intra-série et 2,43% en inter-série selon les spécifications du fabricant. Quoi qu'il en soit, ces valeurs sont largement au-dessous des limites imposées par la NCEP ($\leq 12\%$) Mais ses performances analytiques peuvent être affectées par plusieurs facteurs :

- Les échantillons de contrôle et de calibration utilisés en particulier les changements (ou variabilités) de leur caractéristiques et de leur matrice pendant le processus de fabrication, de transport ou de stockage ;
- La méthode directe en phase homogène qui contient dans sa composition comme détergent le TOOS ou N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3- méthylaniline au lieu de HDAOS, N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline) indiqué dans les littératures [15, 37] ce qui peut être à l'origine de différences de comportement notamment quand il existe une surcharge en VLDL. En effet, dans le contexte des méthodes homogènes, on distingue : la Lp (a), les IDL, VLDL riches en triglycérides et les chylomicrons. Selon [18], les capacités du procédé de Wako à reconnaître et différencier chaque fraction lipoprotéique ne sont pas encore précisées. Apparemment, ce procédé n'exclut pas totalement les VLDL ; il est capable de réagir avec les IDL dans 52 – 64% des cas et peuvent entraîner une surestimation des C-LDL en réagissant avec les LDL petites et denses
- La limite de détection qui est de 0,05 mmol/l pour notre réactif contrairement au procédé Wako proprement dit qui est de 0,03 mmol/l [15, 44] ;
- La concentration des VLDL dépend de l'alimentation et cette concentration peut interférer avec la méthode de dosage direct [15].

Par ailleurs, quelques auteurs n'ont pas trouvé de différence significative ($p > 0,05$) entre de C-LDL_F et C-LDL_D avec un coefficient de corrélation avec $r = 0,90$ [91, 92]. Nauck et *al.* [9] Edjème-Aké A et *al.* [93] sont arrivés à la même constatation. Mais il faut noter que leur étude sur la comparaison entre la formule de Friedwald et une méthode de détermination directe du C-LDL à l'alpha cyclodextrine (Procédé de Kyowa). Cette méthode est la plus utilisée sur les automates et dans les pays développés. Appelée « solubilization method » [15], la présence du Mg²⁺, de l'α-cyclodextrine (αCD) et du sulfate de dextran dans les réactifs stabilisent les molécules de VLDL et de chylomicron et permettent de supprimer la réactivité du cholestérol dans les lipoprotéines riches en Triglycérides [15, 37, 94]. Cette méthode est caractérisée par une limite de détection plus basse (0,006 mmol/l) par conséquent, elle est très sensible ; ensuite son exactitude est estimé à un coefficient de variation entre 0,7 à 3,1% [9, 15] ce qui est largement inférieur aux spécifications de la NCEP [6, 15, 43]. En effet, selon la NCEP, compte tenu de l'importance médicale du taux de C-LDL, ce coefficient de

variation doit être $\leq$ à 12% de la valeur vraie et l'imprécision et l'inexactitude de la méthode doit être $\leq$ à 4% [6, 15,95].

Tout ceci pourrait expliquer l'absence de différence entre les valeurs de C-LDL_D et de C-LDL_F observée dans ces études. Toutefois, elle sous-estime le taux de C-LDL chez les patients ayant une Hyperlipoprotéinémie de type III. Mais on considère actuellement qu'elle est plus appropriée que la formule de Friedewald, et peut être utilisée chez les individus non à jeûn et ayant un taux de TG > 4,56 mmol/l [15, 37].

En effet, dans la littérature la méthode à l'alpha-cyclodextrine (ou Procédé de Kyowa) qui est considéré comme le plus performant avec un coefficient de variation compris entre 0,7 à 3,1% contre environ 1,2% pour le procédé de Wako [15, 37].

Mais en plus des contrôles de qualité interne qui sont faits quotidiennement, une évaluation externe de la qualité doit être envisagée et externe doivent être faits régulièrement, afin de rendre des résultats surs. La technique de dosage de C-LDL doit être mentionnée dans les résultats parvenus aux prescripteurs ce qui impose l'acquisition par le Laboratoire d'un vrai système informatique de gestion du Laboratoire (ou LIMS pour Laboratory Information Management System).

Enfin, une amélioration du procédé analytique est proposée.

V.2. Variations des taux de C-LDL selon les paramètres lipidiques ou variabilité de la Formule de Friedewald

Pendant plusieurs années, la méthode la plus utilisée pour évaluer le C-LDL en pratique médicale courante ou dans les Laboratoires cliniques est la formule de Friedewald. Il s'agit d'une estimation du C-LDL basée sur les dosages du cholestérol total, du C-HDL et des TG.

Nous avons constaté qu'il y a une différence significative entre C-LDL_F et C-LDL_D, quel que soit le taux plasmatique de cholestérol total. Plus ce taux de Cholestérol total augmente, plus la différence sera grande. Cette différence significative entre le C-LDL_D et C-LDL_F est aussi observée quel que soit le taux plasmatique de triglycérides avec p value < 0,05. Globalement, la différence entre C-LDL_F et C-LDL_D augmente avec les valeurs de TG allant de 0,01 à 4,50 mmol/l.

Sahu et al. [96] ont déjà trouvé cette différence significative en 2005 lorsque le taux de TG est < 0,77 mmol/l et le taux de Cholestérol total > à 0,58 mmol/l. L'étude

de Mora S [10] a montré une différence significative après comparaison entre C-LDL_D et C-LDL_F pour un taux de triglycérides $\leq 2,26$ mmol/l chez des sujets à jeûn et non à jeûn. Mais pour des taux de triglycérides compris entre 2,26 – 4,52 mmol/l, il n'y a qu'une petite différence de 0,04 mmol/l chez des sujets à jeûn et de 0,19 mmol/l chez des sujets non à jeûn.

La formule de Friedewald est prise à défaut même si l'hypertriglycémie est modérée $< 3,50$ mmol/l. Ceci est lié à la surestimation de la fraction VLDL (les TG étant les principaux constituants de ces lipoprotéines de grande taille). Les études de Nauck et *al.* [15], celle de Bayer P et *al.* [37] et d'Esteban-Salan et *al.* [97] confirment ces résultats. Il existe une corrélation positive entre C-LDL_F et le rapport C-VLDL/TG montrant que l'estimation du VLDL par le rapport TG/2,2 est loin d'être parfaite. Plus ce rapport augmente (c'est-à-dire plus les VLDL sont enrichies en cholestérol, plus le C-LDL dosé avec la méthode de Wako (et les méthodes Daiichi et Kyowa) est surévalué par rapport à la méthode de référence [37, 96].

Nous avons trouvé dans notre étude une différence significative entre les deux méthodes d'évaluation du C-LDL en fonction du C-HDL. Mais cette différence ne suit pas l'augmentation du taux plasmatique de C-HDL, que ce soit pour les sujets à risque ayant un taux $< 0,90$ mmol/l, que ce soit avec des taux compris entre 0,90 – 2,30 mmol/l (avec p value $< 0,05$). Or, selon Bayer P. et *al.* [37], cette méthode Wako serait responsable d'une surestimation du C-LDL d'environ 5% lorsque le taux de C-HDL devient $> 3,36$ mmol/l.

Actuellement, les limites et les inconvénients de cette formule sont bien établis. Elle cumule les erreurs analytiques des trois paramètres pris indépendamment soit un coefficient de variation estimé en moyenne à 5,1% [10] avec extrêmes entre 2,7% et 6,8% pouvant aller dans certains laboratoires à 12% [15].

Aussi de nouvelles formules ont été proposées afin de mieux estimer le C-LDL avant la mise en place des différentes méthodes de dosage direct, et ont été comparées à la Béta-quantification. Ainsi, plusieurs auteurs [44, 45, 53] ont conclu dans leur étude que VLDL est mieux représenté par $0,37 \times \text{Triglycérides (mmol/l)}$. Cette nouvelle équation de Friedewald améliore la concordance de C-LDL surtout pour un taux $< 1,80$ mmol/l.

VI. Conséquences des résultats du C-LDL pour la classification des patients

Les patients ayant un taux de C-LDL $> 3,35$ mmol/l sont considérés à haut risque cardio-vasculaire. Nous avons trouvé que le taux de C-LDL_D ne classifie que 6 patients (soit 5,76%) comme étant à haut risque cardio-vasculaire alors que 24 patients (23,07%) le sont si on utilise le taux de C-LDL_F.

L'étude de Sahu [96] en 2005, est comparable à la nôtre, de point de vue C-LDL_F puisque celle-ci classifie 23.5% des patients à haut risque contre 17.58 % pour C-LDL_D. Kamezaki et *al.* [88] ont classé 31,7% des patients comme à haut risque trouvé avec le C-LDL_D contre 25,1% pour C-LDL_F. Mais certains auteurs comme Mora S. et *al.* [10] n'ont pas pu bien classer les catégories de risque cardiovasculaire (selon le NCEP risk category) parce que généralement la formule de Friedewald surestime le taux de C-LDL.

Les différences entre C-LDL_D et C-LDL_F affectent la classification des patients selon la NCEP puisque la corrélation entre C-LDL_F et les triglycérides. Ainsi, il est très important de choisir une bonne méthode de mesure du taux sérique de C-LDL afin de connaître le profil du patient, parce que ceci va influencer la décision thérapeutique en prévention primaire ou secondaire [43].

La connaissance du statut lipidique permettant l'instauration précoce de mesures préventives adéquates (hygiéno-diététiques) étant importante, nous proposons en collaboration avec les cliniciens et les endocrinologues en particulier :

- La mise en place d'un groupe d'étude sur les moyens de diagnostic et de prise en charge des dyslipoprotéïnémies et les pathologies cardio-vasculaires afin de pouvoir définir des recommandations précises à l'instar de celles de la NCEP, ESC/ECA.
- Une étude sur les valeurs de référence des paramètres lipidiques, étude qui a été initié par Razanamparany F. [1] dans une population d'Antananarivo mais qui doit être complétée à d'autres populations de référence

CONCLUSION

CONCLUSION

De nombreuses études épidémiologiques prospectives menées aux cours des quatre dernières décennies ont identifié plus de 200 facteurs de risque cardiovasculaire. Ces facteurs peuvent être modifiables et non modifiables. Parmi les facteurs modifiables les plus importants, l'hypercholestérolémie et en particulier sa fraction C-LDL est à la base d'un risque cardiovasculaire et son taux plasmatique est utilisé par de nombreuses sociétés savantes et des groupes d'étude pour la stratification (ou gradation) du risque.

Dans notre travail, nous avons pu constater que le taux de prescription de cette analyse est encore faible et elles ont concerné uniquement des patients hospitalisés avec des pathologies cardiovasculaires ou non. Aucune prescription de ce dosage dans le cadre d'un bilan systématique n'est observée.

Nous supposons que l'équation de Friedewald reste encore d'actualité à Madagascar probablement par souci d'économie. Mais il faut retenir que c'est un calcul qui présente plusieurs biais, car dépendant des autres paramètres lipidiques (CT, C-HDL, TG). En plus, cette formule de Friedewald n'est pas applicable si les taux de triglycérides sont supérieurs à 4,50 mmol/l et quand il existe des hyperlipoprotéïnémies III ou des dyslipidémies secondaires. Une méthode de dosage sanguin de C-LDL précise et exacte doit être ainsi utilisée pour éviter la sous-estimation ou la surestimation par l'équation.

La bêta-quantification (ou ultracentrifugation) est citée dans de nombreuses littératures, [9, 13-16, 36, 37, 53, 98] comme étant la méthode de référence pour le dosage de ce C-LDL. Mais c'est une méthode onéreuse et longue et dont il existe plusieurs variantes quant à la manière de l'appliquer (notamment en ce qui concerne la vitesse de centrifugation des échantillons et la durée de celle-ci). Aussi, elle n'est pas réalisable en routine, dans la plupart des laboratoires et c'est le cas de Madagascar. Mais actuellement, il y a plusieurs méthodes directes de mesure de C-LDL [15, 37, 94] qui sont avantageux et qui sont considérées comme plus précises et exactes [15, 37, 93].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Razanaparany F. Profil lipidique des tananariviens à travers les cas vus à l'UPFR Biochimie du CHUA-JRA. [Thèse]. Biologie : Antananarivo ; 2008. 54p.
2. Traoré M. Interaction des lipoprotéines de faible densité avec les cellules endothéliales vasculaires humaines : influence des contraintes de cisaillement – étude in vitro par microscopie de fluorescence confocale [Thèse]. Ingénierie Cellulaire et Tissulaire : Nancy; 2008. 196p.
3. Kannel WB, Neaton, Wentworth D et al. Overall and coronary rates in relation to major risk factors in 325, 348 men screened for the MRFIT. Multiple risk factor intervention trial. Am heart J.1986; 112: 825-36.
4. Scandivian simvastatin survival study group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. Lancet.1994;344:1393-9.
5. Dallongeville J. Le métabolisme des lipoproteines. Cahier nutrition. 2006; 41: 6-1.
6. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. JAMA. 2001; 285: 2486-97.
7. Marshall WJ, Bangert SK. Biochimie Médicale : Physiopathologie et diagnostic. Lipides, Lipoprotéines et maladies cardiovasculaires. 2005, Edition Elsevier France ; 245 – 62.
8. Gaw A, Murphy MJ, Gowan RA et al. Biochimie Clinique. 2004, Edition Elsevier France ; 126 – 9.

9. Nauck M, Graziani MS, Bruton D et al. Analytical and clinical performance of a detergent-based homogeneous LDL-cholesterol assay: a multicenter evaluation. *Clin Chem* 2000; 46: 506-14.
10. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Comparison of LDL-Cholesterol concentration by Friedewald calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27331 women. *Clin Chem*. 2009; 55(5):888-94.
11. Ginsberg, H. N. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab. Clin North Am*. 1998; 27: 503-19.
12. Muller C. Apoptose, stress du réticulum endoplasmique et autophagie induit par les LDL oxydées dans les cellules vasculaires. Rôle protecteur des HDL et chaperones du RE [Thèse]. *Biologie cellulaire : Toulouse* ; 2001; 239p.
13. Cole T, Ferguson C, Gibson D, Nowatzke W. Optimization of β -quantification methods for high-throughput applications. *Clin Chem*. 2001; 47:712-21.
14. Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by Iodixanol gradient Ultracentrifugation. *Clin chem* 2003 ; 49 (1) : 1865 – 72.
15. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem*. 2002; 48(2): 236 – 54.
16. Sich D, Saidi Y, Egloff M et al. Direct isolation of labeled low density lipoproteins for the determination of cholesteryl ester transfer protein activity. *Clin Chim Acta*. 1997; 266: 185-93.
17. Ganong W, Jobin M. *Physiologie médicale*. Bruxelles: De Boeck ; 2005. 853.

18. Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture. Oxydative modification of LDL and atherogenesis circulation. 1997; 95(4):1062-71.
19. Laporte F. Les récepteurs membranaires des LDL oxydées : leur rôle dans l'athérogenèse. Néphrologie. 2000; 21(7): 327-8.
20. Duvillard L, Gambert P, Lizard G. Étude du récepteur des lipoprotéines de basse densité par cytométrie en flux : intérêts biologiques et cliniques. Ann Biol Clin. 2004 ; 62:87-91.
21. Winther MPJ et al. Macrophage scavenger receptor calls A. A multifunctional receptor in atherosclerosis. Arterioscl Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 290-7.
22. Daugherty A, Roselaar SE. Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: insights from pharmacological studies. Cardiovasc Res. 1995; 29: 297-311.
23. Picard S. LDL oxydées et atherosclerose. STV. 1998; 10:15-20.
24. James RW. L'oxydation des lipoprotéines de faible densité C-LDL. Med Hyg. 1993; 51: 2894-6.
25. Jerome L. Physiopathologie de l'athérosclérose – Mécanismes et prévention de l'athérosclérose [Thèse]. Biologie et recherche : Besançon ; 2001. Consultable sur 123bio.net.
26. Tedgui A. La plaque. Médecine thérapeutique. 2000; 6(10): 810-4.
27. Berliner JA et al. Atherosclerosis: Basic Mechanism oxydation, inflammation and genetics. Circulation. 1995; 91: 2188-96.

28. Yoshida H, Quenen Berger O, Kondratenkon, Green S, Steinberg D. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD 36 and macrophage scavenger receptors in resident mouse peritoneal macrophages. *Arteriosclerthrombvasc Biol.* 1998; 18(5):794-802.
29. Morel S. Nutrition et risque cardio-vasculaire : les thérapies du futur. *Option Bio.* 1998; 208: 6-7.
30. Mazakazuk et al. Induction by lipophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation.* 1998; 98: 359-9.
31. Murray J, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet.* 1997; 349:1498-504.
32. Torzewski M et al. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler thromb vasc Biol.* 1998; 18: 369-78.
33. Lefevre F et Gillery P. Intérêt d'une nouvelle méthode de dosage du cholestérol – LDL en cas d'hypertriglycéridémie modérée. *Ann Biol Clin.* 2000;58(5):618-23.
34. Planella T, Cortes M, Martinez Bru C, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J. Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of non chylomicronemic dyslipidemia. *Clin Chem.* 1997; 43: 808-15.
35. Coulder R, Beucler I, Bruckert E et al. Comparaison du calcul du LDL-Cholesterol par la formule de Friedewald et par celle de Planella. *Le courrier de l'Arcol.* 1999; 1: 79-81.

36. Frey J, Courdes R, valeur séméiologique du chol- LDL et de l'Apo B dans le risque athéromateux. *Ann Bio Clin*. 1998; 56: 517-20.
37. Bayer P, Veinberg F, Couderc R, Cherfils C, Cambillau M, Cosson C et al. Evaluation multicentrique de quatre méthodes de dosage direct du cholestérol-LDL. *Ann Biol Clin*. 2005; 63: 27-41.
38. Pisani T, Gebiski C, Leary E, Warnick G, Ollington J. Accurate direct determination of low-density lipoprotein cholesterol using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay. *Arch Pathol Lab Med*. 1995; 119: 1127-35.
39. Lawlor J, Pelczar D, Sane R. Performance characteristics of the lipidirect magnetic LDL cholesterol reagent. *Clin Chem*. 1997; 43: 262.
40. Commission de standardisation lipides – lipoprotéines Arcol/SFBC. Recommandations pratiques pour le dosage du cholestérol –HDL après précipitation par le phosphotungstate de sodium et le chlorure de Mg. *Option Bio*. 1996;172:1-6.
41. Doley G. La génétique des particules LDL petites et denses. [Thèse]. Sciences. : Québec ; 2011. 249p.
42. Burnet JR, Hooper AH. Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL cholesterol. *Clin Biochem PMC*. 2008 Feb; 29(1): 11-26.
43. Grundy SM, Cleeman JI, Bairey Merz CN et al. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004; 110:227-39.
44. Meeusen JN, Lueke AJ, Jaffe AS et Saenger AK. Validation of a proposed novel equation for estimating LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2014; 60 (12): 1373-3.

45. Martin SS, Blaha MJ, Elshazy MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, Jones SR. Comparison of novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. JAMA. 2013; 310:2061-8.
46. Catapano A et al. "ESC/EAS" guidelines for the management of dyslipidemias: the task force for the management of dyslipidemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Atherosclerosis. 2001; 1016-6.
47. Yusuf S. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2002; 360:7-22.
48. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, et al: National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult Treatment Panel III guidelines. Circulation. 2004; 110: 227-39.
49. Robinson JG, Smith B, Maheshwari N, Schrott H. Pleiotropic effects of statins: Benefit beyond cholesterol reduction? A meta-regression analysis. J Am Coll Cardiol. 2005; 46: 1855-62.
50. Ginsberg HN. The 2013 ACC/AHA guidelines on the treatment of blood cholesterol : questions, questions, questions. Circ Res. 2014; 114: 761-4.
51. Turpin G, Colomes M, Paillard F et al. L'exploration du métabolisme lipidique en pratique courante. Commission Education – Prévention de l'ARCOL. John Libbey Eurotext, Paris, 2005.

52. Martin SS, MD, Blaha MJ, Elshazly MB et al. Friedewald-Estimated Versus Directly Measured Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Treatment Implications. *JACC* 2013; 62 (8): 732–9.
53. Stein EA. Measuring LDL Cholesterol: Old and New Calculations, Is There an Optimal Formula? *Clinical Chemistry*. 2014 ; 60 (12): 000–000. DOI :10.1373/clinchem.2014.232793.
54. Bonovas S, Nikolopoulos G, Sitaras NM. Cholesterol Treatment Trialists Collaboration (CTT). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2010; 376:1670-81.
55. Genest J, McPherson R, Frohlich J et al. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult – 2009 recommendations. *Can J Cardiol*. 2009; 25(10):567-79.
56. Howard BV, Roman MJ, Devereux RB et al. Effect of lower targets for blood pressure and LDL cholesterol on atherosclerosis in diabetes: the SANDS randomized trial. *JAMA*. 2008; 299(14):1678-89.
57. Grimm RH, Leon AF, Hunninghake DB. Effects of thiazide diuretics on plasma lipids and lipoproteins in mildly hypertensive patients. *Ann Intern Med*. 1981; 94:7-11.
58. Freis ED. The efficacy and safety of diuretics in treating hypertension. *Ann Intern Med*. 1995; 122:223-6.
59. Mauger JF. Apolipoprotéine C-III, taille des LDL et protéine C-réactive. Etudes physiologiques en relation avec le syndrome métabolique [Thèse]. Québec ; nutrition: 2009.

60. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363-79.
61. Bairaktari ET, Tzallas C, Kalientzidou M, Tselepis AD, Siamopoulos KC, Seferiadis KI, Elisaf M. Evaluation of alternative calculation methods for determining low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2004; 37:937-40.
62. Rubies-Prat J, Reverter JL, Senti M, Pedro-Botet I, Salinas I, Lucas A, Nogues X, Sanmartí A. Calculated low-density lipoprotein cholesterol should not be used for management of lipoprotein abnormalities in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993; 16:1081-6.
63. Matas C, Cabre M, La Ville A, Prats E, Joven J, Turner PR, Masana L, Campus J. Limitations of the Friedewald Formula for Estimating Low Density Lipoprotein Cholesterol in Alcoholics with Liver Disease. *Clin Chem.* 1994; 40:404-6.
64. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG et al. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation.* 2006; 113:791-8.
65. Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G. Modification of lipoproteins in diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1996; 12:69-90.
66. Fitchett D. Nouveau regard sur la prise en charge optimale du C-LDL dans les populations à risque élevé. *STA.* Mars 2011;26(3)23-31.
67. Fredenrich A. LDL-cholestérol chez le diabétique. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie et Reproduction.* Juin 2000;2(3):235-40.

68. Sawadogo M, Sakandé J, Kabré E, Sougué M. Profil lipidique au cours de l'infection par le VIH à Ouagadougou - Burkina Faso : intérêt des marqueurs lipidiques dans le suivi de l'évolution de l'infection à VIH. *Ann Biol Clin.* 2005;63(5):507-12.
69. Azzouzi N, Elhataoui M, Bakhatar A, Takourt B, Benslimane A. La part de *Chlamydia pneumoniae* dans l'athérosclérose et les exacerbations de bronchopneumopathie chronique obstructive et d'asthme. *Ann Biol Clin.* Mars 2005;63(2):179-84.
70. Evans SR, Fichtenbaum CJ, Aberg JA, A5087 Study Team. Comparison of Direct and Indirect Measurement of LDL-C in HIV-Infected Individuals: ACTG. *HIV Clin trials.* 2007;8(1) :45-52, DOI : 10.1310/hct0801-5.
71. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F et al. Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral-naïve cohort. *HIV Med.* 2005; 6:114-21.
72. The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combinaison antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003;349:1993-2003.
73. Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Clinical epidemiology Group from the French Hospital Database. Increases risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. *AIDS.* 2003;17:2479-86.
74. Moulin B. Anomalies lipidiques au cours de l'insuffisance rénale : conséquences sur la progression de l'insuffisance rénale et le risque cardiovasculaire. *Néphrologie.* 2000;21(7):339-41.

75. Ordonez JD, Hiatt RA, Killebrew EJ, Fireman BH. The increased risk of coronary heart disease associated with nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1993;44:638-42.
76. Muso E, Yashiro M, Matsuhima M, Yoshida H, Sawanishi K, Sasayama S. Does LDL-apheresis in steroid resistant nephrotic syndrome affect prognosis? *Nephrol Dial transplant.* 1994; 9:257-64.
77. Sharp Collaborative Group. Study of Heart and Renal Protection (SHARP) : randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease. *Am Heart J.* 2010;160(5):785-94.
78. Anavekar NS, Pfeffer MA. Cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2004;(92):S11-5.
79. Haffner SM, Mykkanen L, Stern MP, Paidi M, Howard BV. Greater effect of diabetes on LDL size in women than in men. *Diabetes Care.* 1994;17:1164-1171.
80. Casteel B. Faible taux de cholestérol LDL est lié au risque de cancer. Mars 2012. Consultable sur bcasteel@acc.org 240-328-4549.
81. Yu HH, Ginsburg GS, Harris N, Rifai N. (1997) Evaluation and clinical application of direct low-density lipoprotein cholesterol assay in normolipidemic and hyperlipidemic adults. *Am J Cardiol.* 1997; 80:1295-9.
82. Fukuyama N, Homma K, Wakana N, Kudo K, Suyama A, Ohazama H, et al. Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL-cholesterol. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43:1-5.
83. Fodor JG et al. Recommendations for the management and treatment of dyslipidemia. *Can Med Assoc J.* 2000;162(10):1441-7.

84. Yu HH, Markowitz R, De Ferranti SD, Neufeld EJ, Farrow G, Bernstein HH, et al. Direct measurement of LDL-C in children : Performance of two surfactant-based methods in a general pediatric population. Clin Biochem. 2000; 33:89-95.
85. Bostham M, Rmezzani MA, Naderi G, Sarrafzadegan N. Is Friedewald formula a good estimation for low density lipoprotein level in Iranian population? J Res Med Sci. 2012; 17:519-22.
86. Anandaraja S, Narang R, Godeswar R, Laksly R, Talwar KK. Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population. Int J cardiol. Juin 2005; 102(1):117-20.
87. Kamezaki F, Sonoda S, NakataS, Otsuji Y. A direct measurment for LDL-Cholesterol increases hypercholesteroliam prevalence: comparasion with Friedewald calculation. JUOE. Sep 2010; 32(3):211-20.
88. Vujovic A, Stevulijevic JK, Spasic S et al. Evaluation of different formulas for LDL-C calculation. Lipids Health Dis. 2010;9:27, DOI : 10.1186/1476-511X-9-27.
89. Gupta S, Verma M, Singh K. Does LDL-C estimation using Anandaraja's formula give a better agreement with direct LDL-C estimation than the Friedewald's formula? Ind J Clin Biochem. Avril 2012; 27(2):127-133, DOI: 10.007/s12291-011-0186-3.
90. Kamal AHM, Hossain M, Chowdhury S, Mahmud NU. A comparison of calculated with direct measurement of Low-density lipoprotein cholesterol level. JCM. 2009; 20:19-23.

91. Assoumanou MG, Agniwo CC, Soumanou MM, Akpona SA. Intérêt de la technique de précipitation au sulfate de dextrane dans la détermination du cholestérol-LDL. *Ind J. Biol.* Déc 2000; 4(6):2237-44.
92. Benlian P, Béréziat G. Une nouvelle méthode de dosage direct du LDL cholestérol. *Revue française des laboratoires.* 2001; 331:68-9.
93. Edjème-Aké A, Hauhouot-AML, Ahiboh H, Yayo SE, Cakou KG, Monnet D. Détermianction de la concentration sérique du cholestérol-LDL : comparaison entre une méthode directe de dosage et de la formule de Friedewald. *J Sci Pharm.* 2010 ; 11(2) :52-9.
94. McNamara JR, Warnick GR, Cooper. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. *Clin Chim Acta.* 2006;369:158-67.
95. Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, Ethridge SF, Jayne EC. Performance of four homogenous Direct Methods for LDL- Cholesterol. *Clin Chem.* 2002;48 (3):489-98.
96. Sahu S, Chawla R, Uppal B. Comparison of two methods of estimation of low density lipoprotein cholesterol. The direct versus Friedewald estimation. *Ind J Clin Biochem.* 2005; 20:54-61, DOI: 10.1007/BFO20867401.
97. Esteban-Salan M, Guimon-Bardesi A, De La Viula-Unzueta JM, Azcarte-Ania MN, Pascual-Usandizaga P, Amoroto-Del-Rio E. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-Cholesterol in hyperlipidemic pateins. *Clin Chem.* 2000; 46:1121-31.
98. Bachorick PS, Ross JW. For the National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurements. National Cholesterol Education

Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. Clin Chem. 1995; 41:1414-20.

ANNEXE

LDL-C

LDL-Cholesterol (R: Direct Method)

Order Information	
Cat. No.	Package size
LDL0102	R1 1x40 ml + R2 1x15 ml
LDL0103	R1 4x40 ml + R2 2x20 ml
LDL0104	R1 4x40 ml + R2 2x40 ml
LDL0105	R1 3x250 ml + R2 1x750 ml

Extended use

In vitro test for the quantitative determination of LDL-Cholesterol (LDL-C) concentration in serum and plasma on photometric systems.

Summary

LDL-Cholesterol is directly related to the risk of developing coronary heart disease. A low HDL/LDL-Cholesterol ratio is directly related to the risk of developing coronary artery disease. Elevated LDL-Cholesterol is the primary target of cholesterol-lowering therapy.

Method

Direct method

Reaction Principle

(1) HDL, VLDL, Chylomicrons $\xrightarrow{\text{Cholesterolase}}$ Cholesterol + H₂O

2H₂O $\xrightarrow{\text{Cholesterolase}}$ 2H₂O + O₂

CH₂ + CHO $\xrightarrow{\text{Cholesterolase}}$ Cholesterol + H₂O

(2) LDL $\xrightarrow{\text{HDL + TOOS + 4-aminotriphenyl}}$ Cholesterol + H₂O
POD $\xrightarrow{\text{Quinidine}}$ Quinidine

The System monitors the change in absorbance at 600 nm. This change in absorbance is directly proportional to the concentration of cholesterol in the sample and is used by the System to calculate and express the LDL-cholesterol concentration.

Reagents

Components and Concentrations

RL	Each's buffer	50 mmol/L
	Cholesterolase	600 U/L
RL	Cholesterol oxidase	800 U/L
	TOOS	2 mmol/L
RL	Good's buffer	50 mmol/L
	4-aminotriphenyl	4 mmol/L
RL	Proteolase	4 U/ml

Warnings and Precautions

- For in vitro diagnostic use.
- Take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.
- Preservative contained. Do not swallow. Avoid contact with skin and mucous membranes.
- Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines.
- Paternal safety data sheet is available on request for professional users.

Reagent Preparation

R1 and R2 are ready to use.

Storage and stability

Stable up to expiry date indicated on the label, when stored unopened at 2-8°C and protected from light.

Once opened, the reagents are stable for 28 days when refrigerated on the analyzer as refrigerator.

Contamination of the reagents must be avoided.

Do not freeze the reagents.

Reagent Blank Absorbance

The absorbance of reagent blank of R1 or R2 should be <0.05.

Materials required but not provided

- Calibrator and controls as indicated below.

2. NaCl solution 9 g/L

- General laboratory equipment

Spectrum Collection and preparation

- Serum, plasma is suitable for samples. Whole blood, hemolyzed and urine are not recommended for use as a sample. Freshly drawn serum is preferred specimen.

Use the suitable tubes or collection containers and follow the instructions of the manufacturer; avoid effect of the materials of the tubes or other collection containers.

- Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay

4. Stability:

4 days at 2-8°C

7 days at -20°C

Assay procedure

Reagent 1	Blank	Sample	Reagent 2	Blank	Sample
Dist. water	1000 µl	12 µl	100 µl	100 µl	12 µl
Sample					
Mix thoroughly, incubate at 37°C for 5 min., then read the absorbance change value.					
6A = 10A sample / 10A blank					

Application sheets by 85 series analyzers are available in this document. Please refer to the appropriate operation manual for the analyzer-specific assay instructions.

Calibration

- It is recommended to use the HDL/LDL Cholesterol Calibrator from Hirsche and 9 g/L NaCl for two-point calibration. Traceability of the mini-calibrator can refer to the calibration instructions for use of Mindray Company.

Control

After reagent lot changed.

As required following quality control procedures.

Quality control

At least two levels of control material should be analyzed with each batch of samples. In addition, these controls should be run with each new calibration, with each new reagent cartridge, and after specific maintenance or troubleshooting procedures as detailed in the appropriate system manual.

We recommend using the LIPID Control made by Mindray to verify the performance of the measurement procedure. If suitable control material can be used in addition,

Each laboratory should establish its own internal quality control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable

LDL-C

Reagents

Each laboratory should establish its own reference intervals based upon its patient population. The reference interval measured at 37°C when below were taken from Hirsche.

Reference Intervals

Each laboratory should establish its own reference intervals based upon its patient population. The reference interval measured at 37°C when below were taken from Hirsche.

Sample Type	Conventional Units
Serum	0-4.11 mmol/L

Performance Characteristics

Representative performance data obtained from Mindray system is given below. Results may vary if a different instrument, an individual laboratory or a manual procedure is used.

Interference/Specificity

The following substances were tested for interference with this methodology. Criterion: Recovery within ±10% of initial value.

Substance	Level Tested	Observed Effect
Ascorbic acid	20 mg/dL	Nil
Lipemia	300 mg/dL	Nil
Hemoglobin	300 mg/dL	Nil

* HCL: No Significant Interference (within ±15%)

Linearity range

The Mindray System (Mindray 85 series analyzers / Mindray LDL-C Reagent) provides the following linearity range:

Sample Type	Conventional Units
Serum	0-15.89 mmol/L

If the only of sample exceeds 28 mmol/L, the sample should be diluted with 9 g/L NaCl solution (e.g. 1:10) and retest; the result should be multiplied by 10.

Sensitivity/Detection Limit

The lowest measurable LDL-C concentration that can be distinguished from zero is 0.05 mmol/L with 99.7% confidence.

Precision

Precision performance using the CLSI Approved Standard (EP5-A) to assay series. Coefficient of variation (CV) is given in the table below.

Type of Precision	Level I			Level II			Level III		
	Mean	SD	CV %	Mean	SD	CV %	Mean	SD	CV %
Within run	4.21	0.08	1.30	4.21	0.07	0.97	4.21	0.07	0.97
Between run	4.21	0.10	2.40	4.21	0.10	2.39	4.21	0.10	2.39
Between day	4.21	0.11	2.67	4.21	0.11	2.62	4.21	0.11	2.62
Within day	4.21	0.10	2.39	4.21	0.10	2.39	4.21	0.10	2.39

Method Comparison

A comparison between Mindray system (Mindray 85 series analyzers / Mindray LDL-C reagent) (Y) and Hirsche/Kocher system (Hirsche/Rodhe LDL-C) (X) using 40 samples gave following correlation (mmol/L): $y = 0.962x + 0.113$, $r^2 = 0.9992$

Details of the comparison experiments are available on request.

References

- Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. Burtis CA, Ashwood LR, WB Saunders Co., 1996.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, Approved Guideline, NCCLS publication H18-A, Villanova, PA (1990).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory.

Annexe



Approved Guideline, CLSI publication C28-A, Villanova, PA (1995).

Tietz, R. H., ed., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA (1997).

CLSI Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices

Approved Guideline, CLSI document EP5-A (1988) 1-5828-260-0, CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1399 USA, 1991

© 2011 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. All rights reserved.

SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.
Mindray Building, No. 13th Road South, Huijin Industrial Park,
Nanshan District, Shenzhen 518057, China
Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. (Europe)
Effelsberg 40, 22637 Hamburg Germany

EC REP

Mindray Tel: 400-700-5852

Mindray Web: www.mindray.com.cn

VELIRANO

Eto anatrehan' Andriamanitra Andriananahary, eto anoloan' ireo mpampianatra ahy sy ireo mpiara-mianatra tamiko eto amin'ity toeram-pianarana ity ary eto anoloan'ny sarin'i HIPPOCRATE.

Dia manome toky sy mianiana aho fa hanaja lalandava ny fitsipika hitandrovana ny voninahitra sy ny fahamarinana eo am-panatontosana ny raharham-pitsaboana.

Hotsaboiko maimaim-poana ireo ory ary tsy hitaky saran'asa mihoatra noho ny rariny aho, tsy hiray tetika maizina na oviana na oviana ary na amin'iza na amin'iza aho mba hahazoana mizara aminy na karama mety ho azo.

Raha tafiditra ao an-tranon'olona aho, dia tsy hahita izay zava miseho ao ny masoko, ka tanako ho ahy samirery ireo tsiambaratelo aboraka amiko ary ny asako tsy avelako hatao fitaovana hanantontosana zavatra mamofady na hanamorana famitan-keloka.

Tsy ekeko ho efitra hanelanelanana ny adidiko amin'ny olona tsaboiko ny anton-javatra ara-pinoana, ara-pirenena, ara-pirazanana, ara-pirehana ary ara-tsaranga.

Hajaiko tanteraka ny ain'olombelona, na dia vao notorontoronina aza, ary tsy hahazo mampiasa ny fahalalako ho enti-manohitra ny lalan'ny maha-olona aho na dia vozonana aza.

Hanaja sy mankasitraka ireo mpampianatra ahy aho, ka hampita amin'ny taranany ny fahaizany noraiziko tamin'izy ireo.

Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy rabirabian'ireo mpitsabo namako raha mivadika amin'izany.

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APPROUVE

LE DIRECTEUR DE THESE

Signé Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO

Signé Professeur ANDRIMANARIVO Mamy Lalatina

Name and surname : RAZANADRAKOTO Ianja Iorenantsoa

Title of thesis : **“LOW DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL CONCENTRATIONS BY DIRECT MEASUREMENT AND FRIEDEWALD FORMULA : COMPARISON”**

Category : BIOLOGY

Number of figures: 25

Number of pages: 81

Number of table: 14

Number of bibliographical reference : 98

Annexe : 01

SUMMARY

Introduction: The concentration of C-LDL is one marker of atherosclerosis and predictor for assessing coronary heart disease. That's the reason why the precision and exactitude of the methods for its determination are recommended internationally.

Objective: The aim of this study is to evaluate the prescription for measurement of C-LDL and to compare the direct C-LDL measurement method with C-LDL measured by Friedewald formula in order to situate the risk cardiovascular.

Methods: This is a prospective comparative study realized to unity of Biochemistry, during 6 months. A fasting blood sample was taken from all subjects. We used direct homogeneous assay kit to estimate serum C-LDL on Mindray BS300® with measuring Total cholesterol, C-HDL and Triglyceride. After, we calculated C-LDL by Friedewald's formula. We excluded patients whose triglyceride levels exceeded 4,50mmol/l.

Results: In a total of 104 patients hospitalized, the mean age was 57,27, the sex ratio was 0,76. The mean level of C-LDL_F (2,59mmol/l) was higher than the mean level of C-LDL_D (2,07 mmol/l). And the mean difference between the two methods was significant, which was -0,51mmol/l (test Z > à 1,96 and value < 0,05).

Conclusion: It is concluded that the Friedewald formula overestimates the C-LDL level compared to the direct method. It's better to obtain an especial formula for each population.

Key words: Comparison, C-LDL, Direct measurement, Friedewald formula, risk cardiovascular

Director of thesis : Professor RASAMINDRAKOTROKA Andry

Reporter of thesis : Doctor RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie

Author's Address : Lot IIN 81 KA Analamahitsy

Nom et Prénoms : RAZANADRAKOTO Ianja Iorenantsoa

Titre de la thèse : « **TAUX SANGUIN DE C-LDL OBTENU PAR METHODE ENZYMATIQUE DIRECTE ET ESTIME PAR LA FORMULE DE FRIEDEWALD : COMPARAISON** »

Rubrique : BIOLOGIE MEDICALE

Nombre de figures : 25

Nombre de pages : 81

Nombre de tableaux : 14

Nombre de références bibliographiques : 98

Annexe : 01

RESUME

Introduction : L'élément clé dans l'athérogenèse est l'accumulation pré-lésionnelle des formes oxydées de C-LDL au niveau des plaques d'athérome. Les recommandations internationales mettent le dosage du C-LDL en première ligne nécessitant un dosage exact et précis. L'objectif de notre étude est d'évaluer la prescription du dosage direct du C-LDL et ensuite de comparer ceci par rapport au C-LDL estimé par la formule de Friedewald nous permettant de situer le risque cardiovasculaire des patients.

Méthodes : Il s'agit d'une étude prospective comparative réalisée à l'UPFR Biochimie du CHUA-JRA pendant 6 mois. Le C-LDL et les autres (CT, C-HDL, et TG pour le calculer selon l'équation de Friedewald) ont été dosés par méthodes enzymatiques sur l'automate Mindray BS300®. N'ont pas été inclus les patients ayant une hypertriglycémie supérieure à 4,50 mmol/l.

Résultats : Cent quatre patients hospitalisés ont été retenus avec un âge moyen de 57,27 ans et un sex ratio de 0,76. Ils présentent en majorité des pathologies cardiovasculaires. Pour toute la population confondue, on note une différence significative (test Z > à 1,96 et une p value < 0,05) entre les résultats de C-LDL_D (2,07 mmol/l) et C-LDL_F (2,59 mmol/l). La moyenne de différence est de -0,51mmol/l.

Conclusion : La surestimation du C-LDL par la formule de Friedewald par rapport au dosage direct en phase homogène explique l'option du C-LDL_D ou l'utilisation de nouvelles formules de Friedewald.

Mots clés : Comparaison, C-LDL, dosage direct, formule de Friedewald, risque cardiovasculaire.

Directeur de thèse : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Rapporteur de thèse : Docteur RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie

Adresse de l'auteur : Lot IIN81 KA Analamahitsy