

## Acides biliaires: validation de la méthode et intérêt diagnostique en cas de cholestase gravidique

### [ Bile acids: Method validation and diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy ]

*W. Masri, E. Plouvier, L. Sedrati, M. Bendaoud, and Y. Costa*

Laboratoire de Biochimie, Le Grand Hôpital de L'Est Francilien, France

Copyright © 2020 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The intrahepatic cholestasis is the most common of hepatopathies specific to pregnancy. Serum total bile acids concentration (ACIBI) is the most sensitive and specific diagnostic marker of this disease. The objective of this study is to validate the enzymatic quantification method of ACIBI of Randox on Cobas 6000 c501® Roche Diagnostics™. A retrospective study of 6 months on all patients in the gynecology-obstetric department of the hospital completes the method validation. The repeatability study on ACIBI concentrations at 20 and 40  $\mu\text{mol} / \text{L}$  shows coefficients of variation respectively at 1.1% and 0.9%, that of reproducibility at 2.4% and 1.8%. The linearity is 230  $\mu\text{mol} / \text{L}$  and the limit of quantification is 3  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . The measurement uncertainty is 0.52  $\mu\text{mol} / \text{L}$  for a concentration of 12  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . The statistical analysis of 150 folders shows 9 cases of cholestasis of pregnancy without any other associated anomaly; 5 severe cases at a mean level of ACIBI at  $56 \pm 10 \mu\text{mol} / \text{L}$  with premature delivery and 4 cases of moderate CG with ACIBI at  $26 \pm 8 \mu\text{mol} / \text{L}$  accompanied by a regression of symptoms following treatment with ursodeoxycholic acid. The enzymatic assay method of bile acids of Randox validated in our laboratory showed good performances. In addition to its diagnostic value, the determination of bile acids has a prognostic and therapeutic value. Elevated fasting level  $> 40 \mu\text{mol} / \text{L}$  is considered as a risk factor for fetal complications and it is considered in the decision to to premature inducing of labour.

**KEYWORDS:** Bile acid, method validation, cholestasis of pregnancy.

**RESUME:** La cholestase gravidique est la plus fréquente des hépatopathies spécifiques de la grossesse. La concentration sérique des acides biliaires totaux (ACIBI) constitue le marqueur diagnostique le plus sensible et le plus spécifique de cette maladie. L'objectif de cette étude est de valider la méthode enzymatique de quantification des ACIBI de Randox sur Cobas 6000 c501® Roche Diagnostics™. Une étude rétrospective de 6 mois sur l'ensemble des patientes dans le service de gynécologie-obstétrique du centre hospitalier complète la validation de méthode. L'étude de la répétabilité sur des concentrations d'ACIBI à 20 et à 40  $\mu\text{mol}/\text{L}$  montre des coefficients de variation respectivement à 1.1% et 0.9%, celle de la reproductibilité à 2.4 % et 1.8%. La linéarité est de 230  $\mu\text{mol}/\text{L}$  et la limite de quantification est de 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . L'incertitude de mesure est de 0.52  $\mu\text{mol}/\text{L}$  pour une concentration de 12  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . L'analyse statistique des 150 dossiers montre 9 cas de cholestase gravidique sans autre anomalie associée; 5 cas graves à un taux moyen des ACIBI à  $56 \pm 10 \mu\text{mol} / \text{L}$  avec un déclenchement prématuré d'accouchement et 4 cas de CG modérée avec des ACIBI à  $26 \pm 8 \mu\text{mol} / \text{L}$  accompagnées d'une régression des symptômes suite au traitement par l'acide ursodésoxycholique. La méthode enzymatique de dosage des acides biliaires de Randox validée dans notre laboratoire a montré de bonnes performances. Outre son intérêt diagnostique, le dosage des acides biliaires a un intérêt pronostique et thérapeutique. Un taux à jeun  $> 40 \mu\text{mol}/\text{L}$  est considéré comme un facteur de risque de complications fœtales et pris en compte dans la décision de déclenchement prématuré de l'accouchement.

**MOTS-CLEFS:** Acides biliaires, validation méthode, cholestase gravidique.

## 1 INTRODUCTION

Il existe plusieurs hépatopathies qui sont observées au cours de la grossesse: les hépatopathies gravidiques qui sont liées à la grossesse de manière spécifique, les hépatopathies aiguës intercurrentes qui surviennent de façon fortuite au cours de la grossesse et les hépatopathies chroniques qui peuvent être révélées par la grossesse ou plus souvent diagnostiquées fortuitement au cours de la grossesse. Les principales circonstances de diagnostic d'une hépatopathie gravidique: Nausée ou vomissement, hypertension artérielle et protéinurie, douleurs épigastriques, ictère, polyurie et polydipsie sans diabète sucré et la thrombopénie [1].

La grossesse entraîne des modifications du bilan hépatique [2-3]:

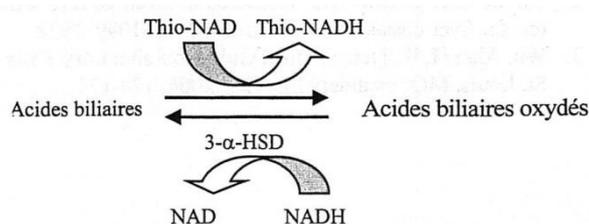
- Une augmentation de l'activité des phosphatases alcalines (3<sup>ème</sup> trimestre) principalement dû au passage dans la circulation maternelle d'une isoenzyme d'origine placentaire.
- Une diminution de la concentration sérique de la protidémie et de l'albumine progressive au cours de la grossesse dû à l'hémodilution.
- Une diminution modérée de la bilirubine dès le 1<sup>er</sup> trimestre et de l'activité des GGT en fin de grossesse.
- L'activité de l'ALAT reste normalement dans les limites des valeurs normales.
- Le taux de certains facteurs de coagulation (I et VIII en particuliers) est augmenté.
- Le taux de prothrombine (TP) n'est pas diminué au cours de la grossesse.
- La concentration sérique des acides biliaires totaux (ACIBI) mesurée à jeun, n'est pas modifiée durant la grossesse.

La cholestase intra-hépatique gravidique (CG) est la plus fréquente des hépatopathies spécifiques de la grossesse. La concentration des ACIBI constitue le marqueur diagnostique le plus sensible et le plus spécifique de diagnostic de CG chez la femme enceinte présentant un prurit typique en l'absence d'autres causes.

L'objectif de notre étude est de présenter la validation de la méthode enzymatique de quantification des ACIBI de Randox sur Cobas 6000 c501<sup>®</sup> Roche Diagnostics<sup>™</sup> mise en place dans notre laboratoire. Une étude rétrospective de 6 mois sur l'ensemble des patientes ayant eu un dosage des ACIBI dans le service de gynécologie-obstétrique du centre hospitalier complète la validation de méthode.

## 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES:

Le dosage quantitatif des ACIBI avec méthode enzymatique colorimétrique (Randox CE de 5<sup>ème</sup> Génération) est mesuré par absorbance à 405 nm sur analyseur Cobas 6000 c501<sup>®</sup> Roche Diagnostics<sup>™</sup> selon la réaction suivante:



La calibration est linéaire en deux points recommandés à chaque chargement de pack ou en cas de dérive des contrôles internes de qualité en utilisant le calibrant Randox (Randox Calibration Sérum Level 3).

Les paramètres de validation de la méthode tels que la répétabilité, la fidélité intermédiaire, l'exactitude, les limites de quantification et de linéarité et l'incertitude de mesure ont été évaluées en utilisant des contrôles internes (ASY: Randox Assayed Multi Level 2 et Level 3) et externes de qualité (EEQ) de Probioqual.

Une comparaison de méthode a été réalisée entre notre technique enzymatique Randox et celle de Diazyme (Total bile acids assay kit, Référence DZ042A-K, Distribué par Sofibel-Fumouze) sur 30 échantillons sériques de patients.

Les données statistiques sont traitées par le SHGTA-04 avec les objectifs du laboratoire. Les 150 dossiers cliniques ont été analysés à partir du serveur interne du laboratoire sur une période de 6 mois.

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 LA RÉPÉTABILITÉ ET LA REPRODUCTIBILITÉ

L'étude de la répétabilité sur des concentrations d'ACBI à 20 et à 40  $\mu\text{mol/L}$  montre des coefficients de variation respectivement à 1.1% et 0.9% et celle de la reproductibilité à 2.4 % et 1.8%. La répétabilité et la reproductibilité sont validé selon les critères du laboratoire respectivement à 4% et 6%.

#### 3.2 L'EXACTITUDE

L'exactitude a été évaluée en utilisant les EEQ de Probioqual sur deux ans (8 échantillons). Le biais observé par rapport au groupe de pairs était toujours inférieur aux limites acceptables du laboratoire. Ainsi tous les résultats sont conformes (tableau 1).

**Tableau 1. Evaluation de l'exactitude de mesure des ACBI**

Valeurs du laboratoire ACBI $\mu\text{mol/L}$	Cible du groupe de pairs ACBI $\mu\text{mol/L}$	Biais (%) / Gp de pairs	Biais (%) limite Laboratoire acceptable	Conclusion Laboratoire
58,3	60,5	-3,6	10	Conforme
17,2	17,37	-1,0	10	Conforme
13,4	14,25	-6,0	10	Conforme
24	24,04	-0,2	10	Conforme
45,3	45,04	0,6	10	Conforme
14	13,8	1,4	10	Conforme
23,4	23,9	-2,1	10	Conforme
42,3	45,46	-7,0	10	Conforme

#### 3.3 LIMITES DE QUANTIFICATION ET DE LINÉARITÉ

La linéarité évaluée sur des échantillons de sérum est de 230  $\mu\text{mol/L}$  et la limite de quantification est de 3  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 3.4 ETUDE D'INTERFÉRENCE D'HÉMOLYSE ET D'ICTÈRE

Notre étude d'interférence confirme les données de fournisseurs. On observe une interférence de l'hémolyse à partir d'une concentration d'hémoglobine à 500 mg /dL et de l'ictère à partir d'une concentration de bilirubine à 60 mg /dL.

#### 3.5 L'INCERTITUDE DE MESURE

L'incertitude de mesure est de 0.52  $\mu\text{mol/L}$  (4%) pour une concentration de 12  $\mu\text{mol/L}$  et de 1,5  $\mu\text{mol/L}$  (5,5 %) pour une concentration de 27  $\mu\text{mol/L}$ . Les performances analytiques de l'incertitude est conforme selon les critères du laboratoire (10%).

#### 3.6 COMPARAISON DE MÉTHODES

Les résultats de la comparaison entre les 2 techniques sont exploités selon la droite de corrélation et le diagramme de différence de Bland Altman avec les critères d'interprétation du laboratoire (Figure 1).

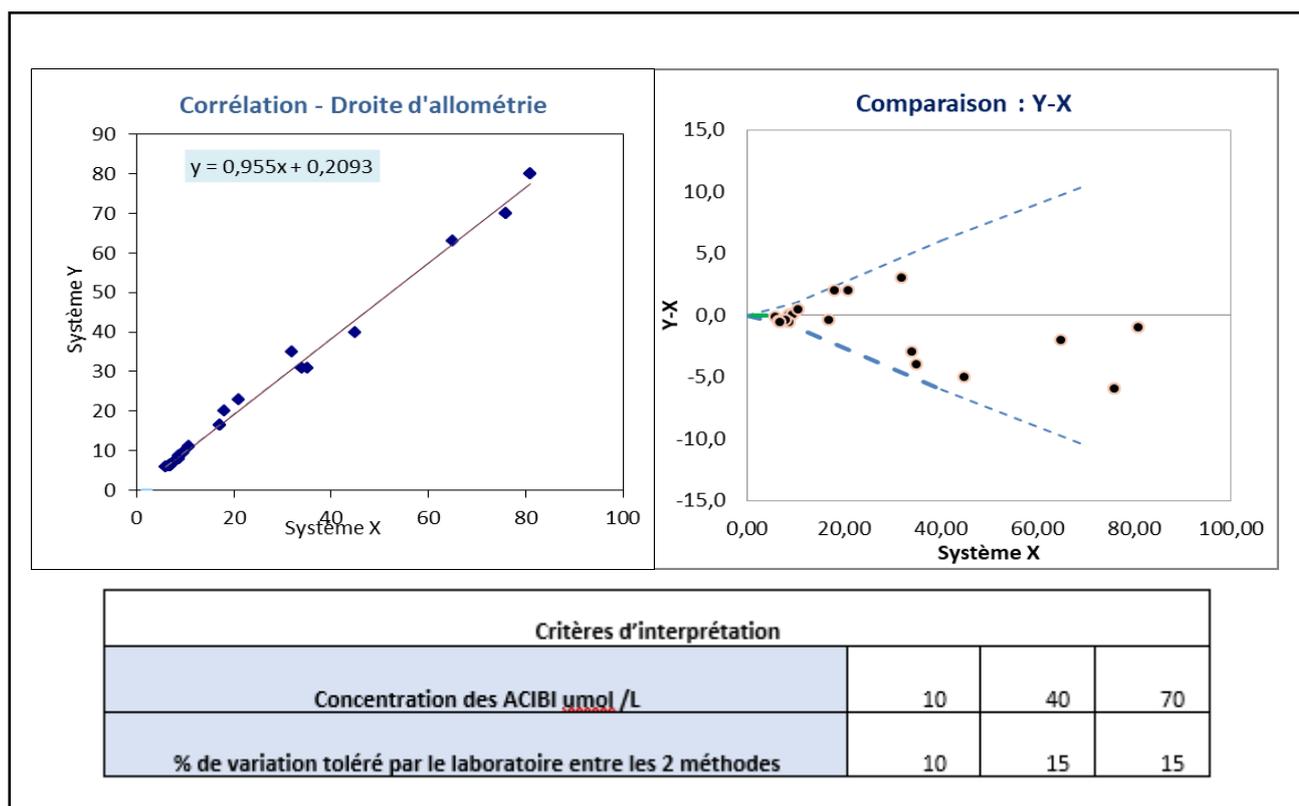


Fig. 1. Droite de corrélation linéaire et diagramme de différence (système X: Radox et système Y: Diazyme)

La comparaison entre les 2 techniques montre une parfaite corrélation avec aucun point discordant entre les deux techniques avec un coefficient de corrélation de 0,998.

### 3.7 VALEURS DE RÉFÉRENCES

Les valeurs de référence chez l'adulte des ACIBI est  $< 10 \mu\text{mol} / \text{L}$ .

### 3.8 APPLICATIONS

150 patientes ont été suivies dans le service de gynécologie entre la deuxième et le troisième trimestre de grossesse. Leurs âges moyens étaient de  $31 \pm 6$  ans.

Toutes les patientes ont eu des dosages des ACIBI depuis la mise en place de la technique dans notre laboratoire. Les prélèvements sont réalisés sur un tube sec ou hépariné à jeun.

L'analyse statistique montre 9 cas de CG sans autres anomalies associées:

- 5 cas graves de CG avec :

- Un taux moyen des ACIBI à  $56 \pm 10 \mu\text{mol} / \text{L}$ .
- Une augmentation des ALAT à  $150 \pm 65 \text{ UI/L}$
- Un taux de prothrombine normal dans tous les cas.
- Symptômes cliniques: Prurit, douleurs épigastriques.

Un déclenchement prématuré d'accouchement pour ces 5 cas; à 37 SA lorsque les signes de maturité pulmonaires étaient atteints.

Les concentrations des ALAT et des ACIBI se sont normalisées après l'accouchement.

- **4 cas de CG modérée avec :**

- Un taux moyen des ACIBI à  $26 \pm 8 \mu\text{mol /L}$ .
- Bilan hépatique normale
- Symptômes cliniques: Prurit

Une régression des symptômes suite au traitement par l'acide ursodésoxycholique avec baisse de taux des ACIBI.

#### **4 DISCUSSION**

Les acides biliaires sont des stéroïdes à 24 carbones synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol. Quatre formes majeures représentent environ 99% des acides biliaires retrouvés dans l'organisme (acide cholique 36-38%, acide chenodésoxycholique 32-34%, acide désoxycholique 26- 28% et acide lithocholique 1-2%). Après un repas, les acides biliaires sont libérés puis absorbés dans l'intestin pour passer dans la circulation sanguine, transportés jusqu'au foie et enfin sécrétés à nouveau dans la bile: il s'agit du cycle entérohépatique. Les acides biliaires qui sont relargués dans l'intestin au moment de la digestion peuvent être soit réabsorbés, soit excrétés soit métabolisés par les bactéries intestinales. La concentration sanguine en acides biliaires résulte de l'équilibre entre leur clairance hépatique et leur réabsorption intestinale [3].

Les acides biliaires ont plusieurs fonctions: formation de la bile au niveau du foie, solubilisation du cholestérol et des phospholipides au niveau biliaire et digestion et absorption des graisses au niveau intestinal.

Le dosage sanguin des ACIBI permet l'évaluation de la fonction hépatobiliaire (cholestase hépatique, ictère, insuffisance hépatocellulaire), le diagnostic et le suivi de cholestase gravidique, l'évaluation du pronostic pour les patients infectés par l'hépatite C traités par l'Interféron et permet aussi d'aider à la détection de la maladie de reflux gastro-œsophagien chez des patients ayant eu une greffe de poumon [4-5-6].

Il existe différentes méthodes pour mesurer les sels biliaires dans le sang. Il est possible de les mesurer séparément par des méthodes analytiques sophistiquées telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), le couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) ou autres MS (FAB-MS) ou GC-MS en tandem [7-8-9]. Les acides biliaires totaux peuvent être quantifiés aisément par des méthodes conventionnelles de spectrophotométrie enzymatique en se basant sur leur structure biochimique commune à l'aide de l'enzyme 3- $\alpha$  hydroxystéroïde déshydrogénase (3- $\alpha$  HSD). Plusieurs trousseaux commerciaux sont offerts pour effectuer cette mesure par autoanalyseur avec lecteur optique. La cinquième génération de mesure enzymatique est la plus couramment utilisée.

La technique Diazyme utilise le même principe enzymatique que celle de Randox mais présente un inconvénient pour les échantillons des patients traités avec l'acide ursodésoxycholique qui ne conviennent pas pour une utilisation avec le dosage des ACIBI.

La technique enzymatique de Randox mise en place dans notre laboratoire a l'avantage de mesurer l'ensemble des acides biliaires par une technique automatisée dont la lecture prend moins d'une minute. Cette technique montre une bonne performance et est maintenant reconnue comme la plus simple, la plus rapide. Le dosage des ACIBI est validé en Porté A d'accréditation selon nos propres objectifs et en absence des critères SFBC et Ricos.

La CG survient durant le troisième trimestre de la grossesse et disparaît après l'accouchement d'origine multifactorielle, liée à des facteurs hormonaux et génétiques. La cholestase se révèle par un prurit, le plus souvent généralisé mais prédominant au niveau du tronc, de la paume des mains et de la plante des pieds. L'examen clinique est normal en dehors des lésions cutanées de grattage. L'activité sérique de l'ALAT est plus souvent augmentée et fréquemment supérieure à 10 fois la valeur supérieure de la normale [1].

La concentration sérique des ACIBI est augmentée. Sa mesure est surtout utile pour le diagnostic lorsqu'il existe un prurit et que le bilan hépatique est normal. C'est ce qu'on a observé pour les 4 cas de CG modéré. Le traitement de ce groupe par l'acide ursodésoxycholique (AUDC) a un effet bénéfique pour la femme enceinte entraînant une diminution du prurit et du taux des ACIBI.

L'AUDC par sa composition moléculaire et son caractère hydrophile; il possède des particularités très utilisées dans les cholestases en inhibant la biosynthèse du cholestérol, en facilitant la solubilisation du cholestérol dans la bile et en favorisant l'élimination des sels biliaires au niveau du compartiment fœtal. En effet, l'AUDC est un médiateur efficace sur l'action des protéines membranaires favorisant le transport membranaire au niveau plasmatique et permet ainsi une meilleure excrétion placentaire des sels biliaires du compartiment fœtal. C'est le traitement standard et le plus efficace à la fois pour les signes cliniques ou biologiques et surtout pour le pronostic fœtal. La surveillance du traitement se fait en hospitalisation à partir de

36 SA en raison du risque fœtal. Les éléments de surveillance habituels sont: Quantification du prurit, RCF trois fois par jour, examens biologiques sanguins (TP, transaminases, bilirubine, et ACIBI) deux fois par semaine [10-11-12].

On parle d'une CG sévère lorsque les niveaux sériques atteignent 40 ou 100  $\mu\text{mol/L}$ , et c'est à partir de 40  $\mu\text{mol/L}$  que la mortalité et la morbidité périnatales deviennent un risque majeur.

Le pronostic maternel est toujours favorable. En revanche, le pronostic fœtal est plus réservé et la mortalité périnatale est augmentée : prématurité et la mort in utero brutale. Les ACIBI semblent rejoindre le compartiment fœtal par le cordon ombilical et par voie transplacentaire. On a d'un côté une augmentation du flux vers le fœtus et, de l'autre côté, les possibilités réduites du fœtus à éliminer certains acides biliaires hydrophobes en raison d'une immaturité hépatique et d'une défaillance du système placentaire à assurer un flux fœto-maternel efficace [13].

Les choix thérapeutiques sont soit la prolongation de la grossesse, qui est privilégiée lorsqu'il y a amélioration de la condition et diminution de la concentration sérique des acides biliaires, soit l'accouchement prématuré iatrogénique dans le cas contraire. La normalité des différents examens de bien-être fœtal est la règle. La décision de déclenchement de l'accouchement est souvent posée sur l'élévation des sels biliaires supérieurs à 40  $\mu\text{mol/L}$ . La majorité des auteurs préconisait donc un déclenchement à 37 SA lorsque les signes de maturité pulmonaires étaient atteints [14].

## 5 CONCLUSION

La méthode enzymatique de dosage des ACIBI de Randox validée dans notre laboratoire a montré de bonnes performances pour la quantification des taux sériques des ACIBI.

L'augmentation isolée des acides biliaires sans autre signe de cholestase suggère la possibilité d'une hypercholanémie gravidique. Outre son intérêt diagnostique, le dosage des acides biliaires a un intérêt pronostique et thérapeutique lors du traitement par l'AUDC. Un taux à jeun > 40  $\mu\text{mol/L}$  est considéré comme un facteur de risque de complications fœtales et pris en compte dans la décision de déclenchement prématuré de l'accouchement.

## REFERENCES

- [1] Chazouillères O, Bacq Y. foie et grossesse. *Gastroenterol Clin Bio* 2004; 28: 84-91.
- [2] Bacq Y, Zarka O, Brechot JF, Mariotte N et al. Function test in normal pregnancy: a prospective study of 103 pregnant women and 103 matched controls. *Hepatology* 1996; 23: 1030-4.
- [3] Anne Myara. *Acides biliaires*. EMC biologie médicale 2007.
- [4] NM Lee, CW Brady. Liver disease in pregnancy, *World J Gastroenterol* 2009; 15 (8): 897-906.
- [5] Shlomai A1, Halfon P, Goldiner I, Zelber-Sagi S, Halpern Z, Oren R, Bruck R. Serum bile acid levels as a predictor for the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* 2013; 20 (2): 95-102.
- [6] NP Reder, Davis Ds, Kovacs J, Fisichella M. The diagnostic value of gastrooesophageal reflux disease (GERD) symptoms and detection of pepsin and bile acids in bronchoalveolar lavage fluid and exhaled breath condensate for identifying lung transplantation patients with GERD-induced aspiration, *Surgical Endoscopy* 2014; 28: 1794-1800.
- [7] Ducroq D H, Morton MS, Shadi N, Fraser HL, Strevens C, Morris J, et al. Analysis of serum bile acids by isotope dilution-mass spectrometry to assess the performance of routine total bile acid methods. *Ann Clin Biochem* 2010; 47 (6): 535-40.
- [8] Rani K, Garg P, Pundir CS. Discrete analysis of bile acid in serum and bile with 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and diaphorase immobilized onto alkylamine glass beads. *Indian J Biochem Biophys* 2006; 43 (2): 98-104.
- [9] Azer SA, Klaassen CD, Stacey NH. Biochemical assay of serum bile acids: Methods and applications. *Br J Biomed Sci* 1997; 54 (2): 118-32.
- [10] Brites D. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: changes in maternal-fetal bile acid balance and improvement by ursodeoxycholic acid. *Ann Hepatol*. 2002 Jan-Mar; 1 (1): 20-8.
- [11] Bhabani P, Manju M, Anita Y, Pinky S. K. Sahoo. Cholestasis of pregnancy: a prospective analysis from a South Andaman. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2019 May; 8 (5): 1895-1898.
- [12] Arlicot C, Le Louarn A, Bacq Y, Potin J, Denis C, Perrotin F. Management of obstetric cholestasis in France: A national survey of obstetrical practice. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2012 Apr; 41 (2): 182-93..
- [13] Chen J, Deng W, Wang J, Shao Y, Ou M, Ding M. Primary bile acids as potential biomarkers for the clinical grading of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* 2013; 122 (1): 5-8.
- [14] C.Labbe, C.delesalle, C.Creveil, M.Dreyfus Cholestases intrahepatiques gravidiques (CIG) précoces et tardives: étude des complications materno-fœtales. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*. 2018 Volume 46, Issue 4, Pages 388-394.