Les marqueurs biologiques de souffrance cardiaque

Octobre 2012

Les maladies cardiovasculaires

- Une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés
  (incidence = 165/100 000 personnes)
- Source de recrutement importante pour les services des urgences
- Deux pathologies différentes :
  - Cardiopathies ischémiques
    - angor stable
    - angor instable
    - infarctus du myocarde
  - Insuffisance cardiaque

Les cardiopathies ischémiques

- Evolution lente
- Alternances de phases de stabilité et d'instabilité
- A partir de la rupture de la plaque d'athérome peu sténosante (90 %)
- Autres mécanismes (plus rares) : spasmes coronariens, embolie coronaire, dissection coronaire

La plaque d'athérome

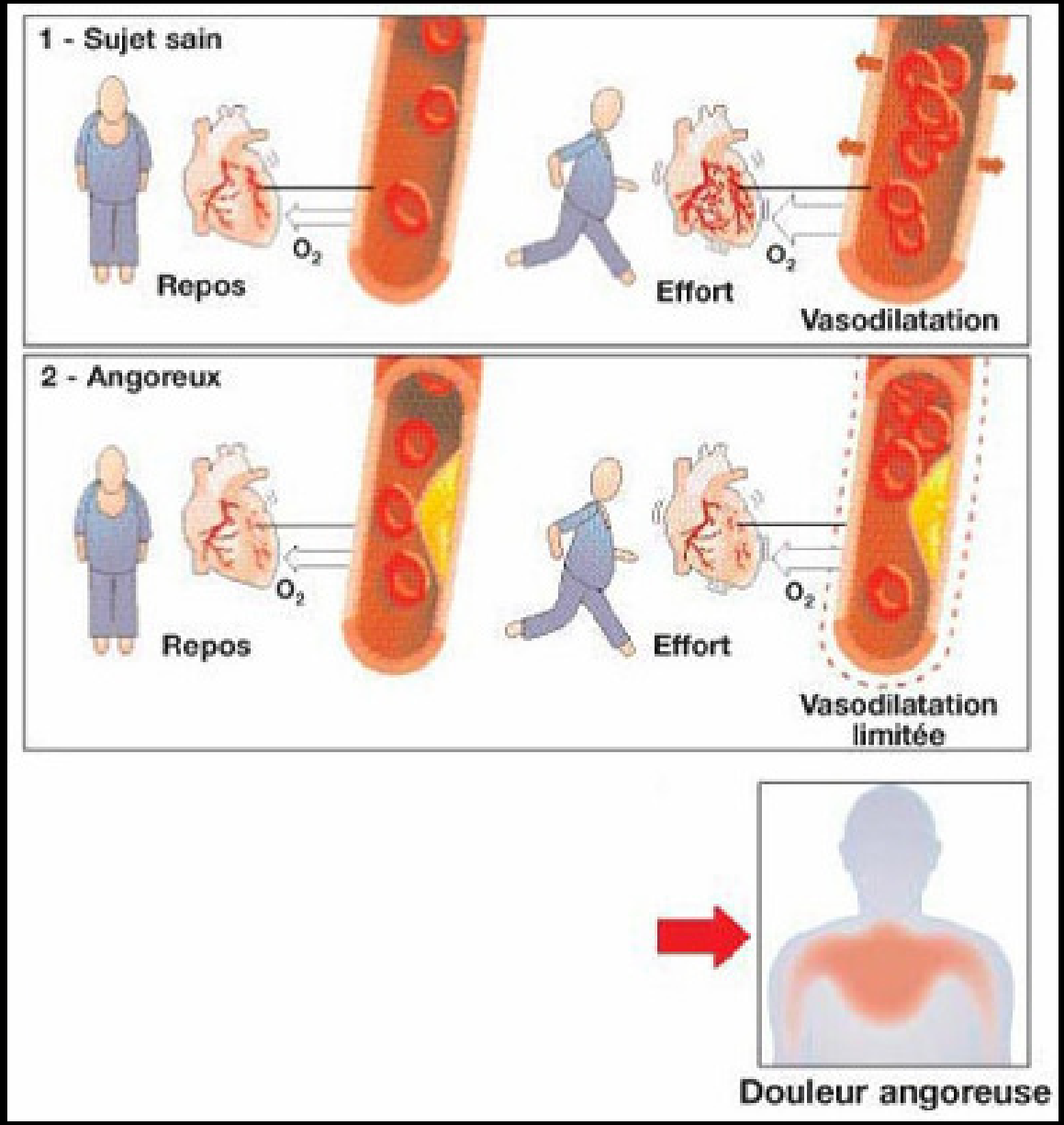
- Début de la formation de la plaque : dépôt de graisse et de cholestérol
- Des cellules musculaires entourent ce dépôt

  ↳ épaississement de la plaque et rétrécissement ou « sténose »
- A partir de la rupture de la plaque d'athérome
  - Mise à nu de la matrice sous-endothéliale
  - Adhésion, activation et agrégation plaquettaire
  - Embolies distales
  - Thrombus : Diminution des apports en oxygène et en substrats au niveau du myocarde

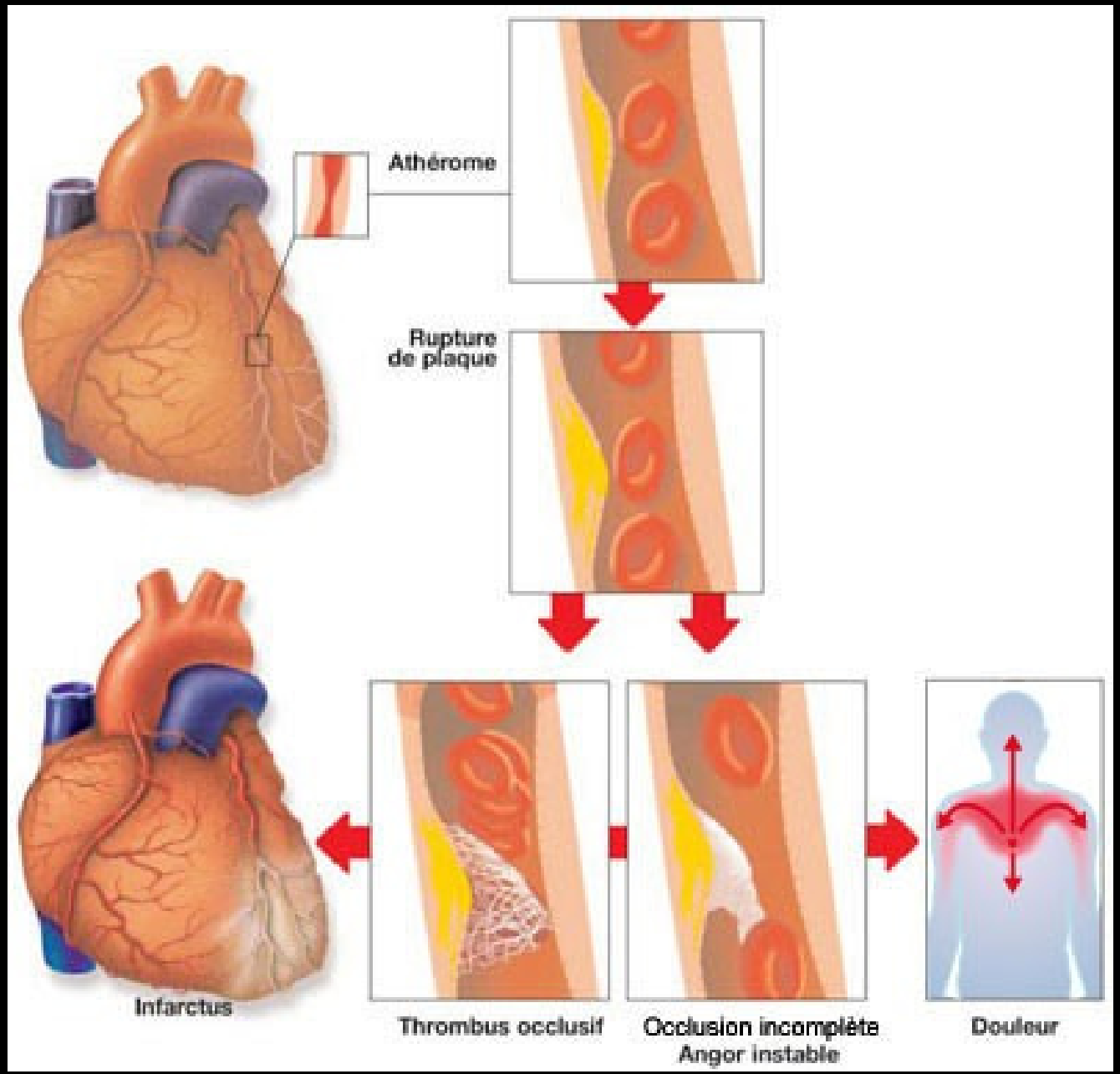
Si la thrombose est non occlusive → angor instable

Si la thrombose devient totalement occlusive → IDM

Angor


1 - Sujet sain
Repos
O_2
Effort
O_2
Vasodilatation
2 - Angoreux
Repos
O_2
Effort
O_2
Vasodilatation limitée
Douleur angoreuse

Angor instable
IDM



Le syndrome biochimique

Déficit d'apport en oxygène

↓

Métabolisme anaérobie

↓

Altérations membranaires et cellulaires du myocyte

↓

Lésions irréversibles

↓

Mort cellulaire

↓

Libération des composants intracellulaires dans la circulation

- Protéines cytoplasmiques
- Enzymes : ASAT, ALAT, LDH, CK
- Myoglobine
- Protéines de l'appareil contractile
  Troponines

Définition OMS de l'IDM

Au moins 2 critères parmi les suivants :

- *Douleur rétrosternale* angoissante, constrictive, irradiant dans les mâchoires et le membre supérieur gauche, durant plus de 20 minutes et ne cédant pas à la trinitrine

- *Electrocardiogramme* (ECG) :

  sus-décalage du segment ST et une onde Q

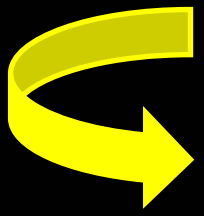
- *Signes biologiques*

Des marqueurs biologiques, pour quoi faire ?

- Marqueurs diagnostiques
- Marqueurs pronostiques
- Efficacité du traitement
- Risque de récidive coronaire

Le marqueur idéal doit avoir certaines caractéristiques :

- Cardio-spécifique
- Sensible (libéré rapidement)
- Dosage rapide et simple



Il n'existe pas de marqueur idéal unique
Utiliser plusieurs tests à interpréter en fonction de leur cinétique et spécificité

Marqueurs biologiques et IDM : approche actuelle

- Des protéines du myocyte localisées dans le cytoplasme

  transaminases, CK

- Des protéines impliquées dans des fonctions métaboliques

  myoglobine

- Des protéines structurales : *troponines*

- Marqueurs « anciens » : ASAT, ALAT, CPK tot, LDH …
- Marqueurs récents :
  - myoglobine
  - troponines (I ou T)
- Enzymes :
  - isoenzymes CK-MB

- Apparition des marqueurs dans la circulation est fonction de :

  - Leur masse moléculaire
  - Leur localisation
  - Leur concentration cellulaire

    - petites molécules (myoglobine) diffusent rapidement et apparaissent précocement
    - molécules plus grosses (LDH) ou peu soluble (troponine) parviennent plus tardivement dans la circulation

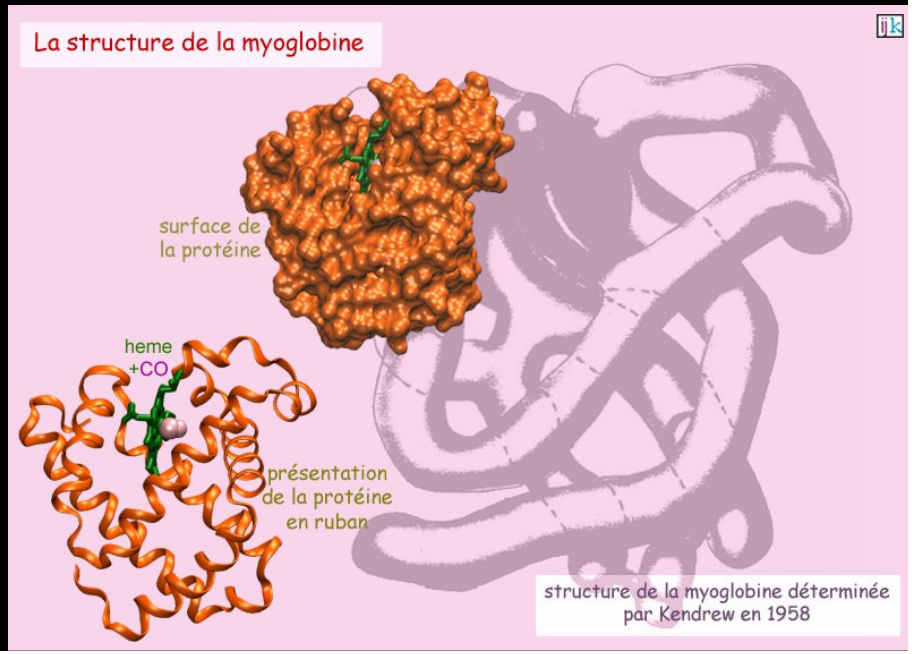
- On étudie la **cinétique** de plusieurs marqueurs
  sur plusieurs échantillons successifs
  pour affirmer le diagnostic d'IDM et suivi des traitements

Myoglobine

- Hétéroprotéine : groupement prosthétique **hémique**

  chaine de globine
- Localisée dans les cellules musculaires (squelettique et myocarde)

  → Aucune spécificité cardiaque
- **Faible poids moléculaire** : 17 800
- **Demi-vie courte** : 1 à 3 heures (reflet étroit dans les 1° h)
- Elimination exclusivement rénale
- Sujets sains : 6 – 80 µg/l



- Intérêts de la myoglobine

  - Marqueur le plus précoce : sensibilité +++
  - Demi-vie courte (1-3 h) : diagnostic de récidives précoces
  - Valeur prédictive négative : l'absence d'augmentation peut exclure un IDM (98%).

    Répéter les tests ++++
  - Suivi de reperfusion (pic 1 h après désobstruction par angioplastie)

- Inconvénients

  - Absence de spécificité : autres causes d'augmentation

    rhabdomyolyses, troubles du rythme, péricardites, chirurgie cardiaque, lésions muscles squelettique, insuffisance rénale, …

Interprétation de la myoglobine

- Au cours de l'IDM
  - Elévation 2-3 h après les douleurs
  - Pic entre 8-12° h
  - Retour à la normale : 24-36 h

En pratique, 3 seuils décisionnels :

- < 50 µg/l à la 3° h : exclusion d'IDM
  (spécificité 98%)
- > 90 µg/l : probable IDM
  (si autres causes d'élévation exclues)
- > 130 µg/l : prédit l'IDM avec bonne sensibilité (77%)

- Suivi de la thrombolyse
  - pic sérique 1-2 h après désobstruction

Méthodes analytiques

- Avant : méthodes radioimmunologiques : abandonnées
- Actuellement :

- Techniques immunoturbidimétriques et immunonéphélométriques
  - Particules revêtues d'Ac antimyoglobine
  - Formation d'un complexe immun myoglobine-antimyoglobine
    - Mesure de l'absorption d'un faisceau lumineux par les immuns- complexes myoglobine-antimyoglobine = immunoturbidimétrie
    - Mesure de l'intensité de la lumière diffusées par les immun complexes = immunonéphélométrie

Techniques très rapides, bien adaptées à l'urgence

Domaine de mesure : 50 – 600 µg/l

Interférences : hyperlipémies (indosable)

facteur rhumatoïde, autoagglutinations des particules → faux +

- Techniques immunoenzymologiques :

  - Basées sur principe ELISA type sandwich

    Formation d'un complexe myoglobine à doser et 2 Ac antimyoglobine, dont l'1 est marqué par une enzyme capable d'hydrolyser un substrat fluorescent

  - Techniques sensibles, rapides

  - Domaine de mesure étendu : 1 – 1000 µg/l

Complexes troponines

Complexe composé de 3 protéines non enzymatiques

Appartiennent au complexe troponine tropomyosine

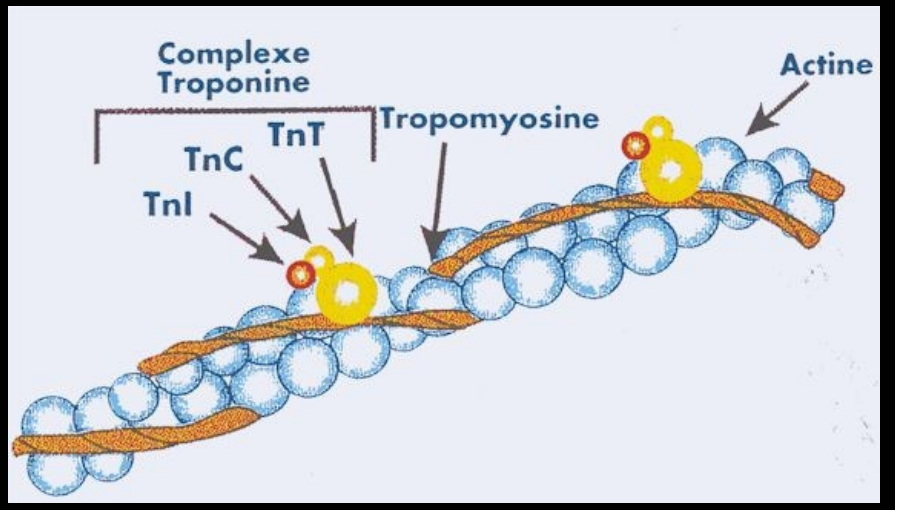
- régule la contraction musculaire
- commun à tous les muscles striés (absent des muscles lisses)

- **Troponine T** : lie le complexe actine-myosine à la tropomyosine
- **Troponine C** : fixe le Ca, induit la rupture entre TnI et actine, permet le contact entre actine et myosine
- **Troponine I** :

inhibe l'interaction actine-myosine

empêche la contraction musculaire

en l'absence de Ca



Différentes formes de troponines

- Formes circulantes

  Dans le cardiomyocyte, 2 pools de troponines

  - Troponines libres dans le cytosol (8%) = pool soluble
  - Troponines associées aux protéines du système contractile (92 %) = complexe ternaire (TnI-TnC-TnT)

Lors de la lésion du myocyte, libération dans la circulation

- Du pool soluble (formes libres)
- et des formes complexées (binaire TnI-TnC, TnI-TnT, ternaire TnI-TnC- TnT)

- Isoformes des troponines T et I
  - Muscle cardiaque
  - Muscle strié contraction lente
  - Muscle strié contraction rapide

  (1 seule isoforme pour TnC : non cardiospécifique)

- Intérêts des troponines
  - Très grande cardiospécificité +++
  - Concentrations élevées (13 fois que la CK-MB)
  - Non retrouvée chez le sujet sain
  - Cinétique d'apparition rapide (3 - 6°h)
  - Reste élevée pendant 10 j (diagnostic rétrospectif)

- Autres circonstances d'augmentation de la troponine
  - Toutes souffrances myocardiques (IC, EP, …)
  - Toxicité cardiaque de certaines drogues
  - contusion mécanique, …



Troponines (TnIc,TnTc) spécifiques du myocarde mais pas de l'infarctus ! Corrélation avec la clinique
Troponine Ic la plus utilisée dans les IDM

Interprétation de la troponine (TnIc)

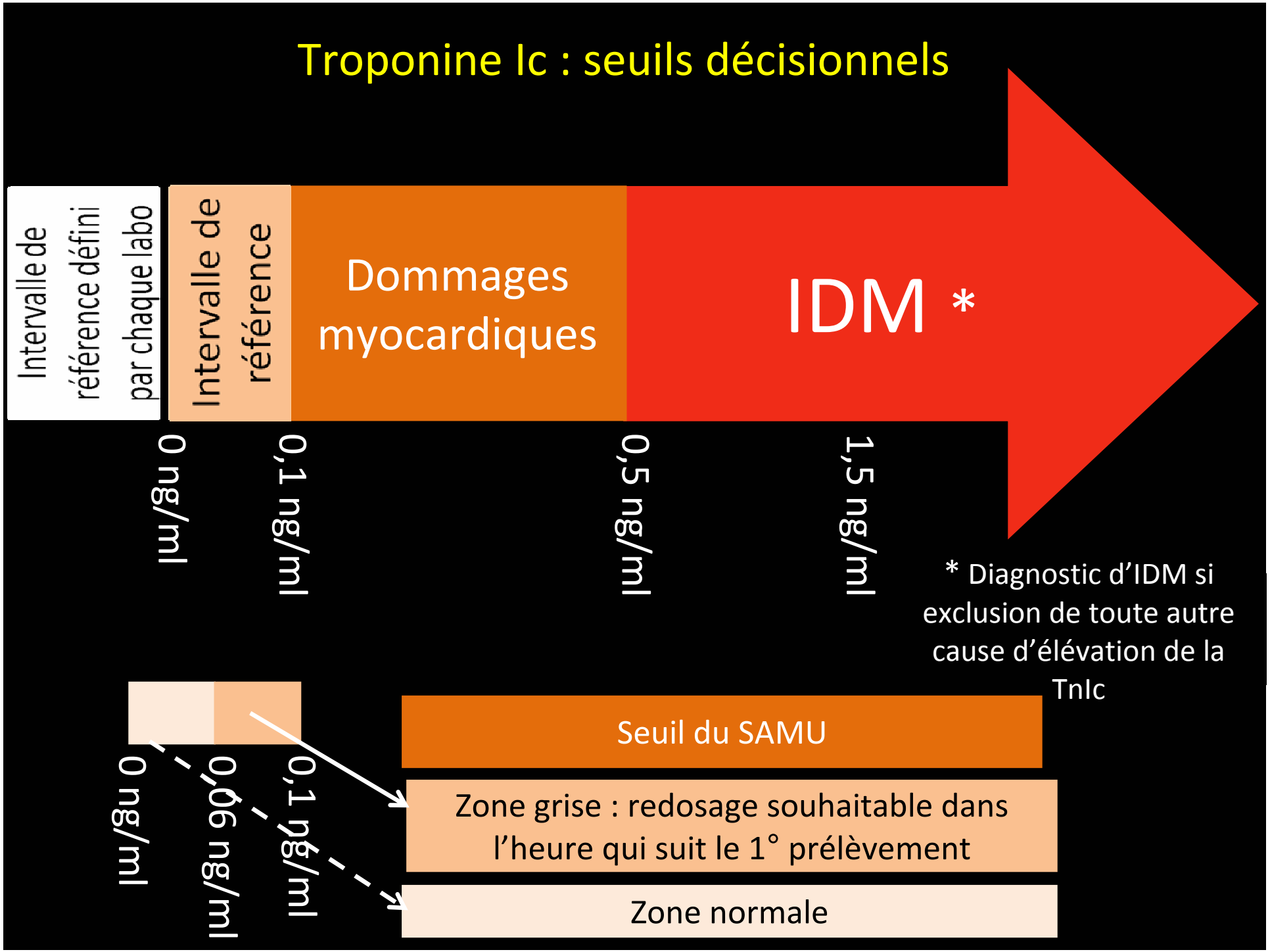
- Au cours de l'IDM
  - Elévation entre 3 – 6 h
  - Pic entre 18 – 24h
  - Normale : 6 – 9 jours

  La durée d'élévation de la troponine est proportionnelle à la taille de l'IDM

  Permet de faire le diagnostic dans les premières heures de l'IDM mais également rétrospectif +++

- Suivi de reperfusion cardiaque

  Si désobstruction efficace, pic 60 à 120 minutes après thrombolyse
- Angor instable : facteur pronostic


Troponine Ic : seuils décisionnels
Intervalle de référence défini par chaque labo
Intervalle de référence
Dommages myocardiques
IDM *
0 ng/ml
0,1 ng/ml
0,5 ng/ml
1,5 ng/ml
* Diagnostic d'IDM si exclusion de toute autre cause d'élévation de la TnIc
0 ng/ml
0,06 ng/ml
0,1 ng/ml
Seuil du SAMU
Zone grise : redosage souhaitable dans l'heure qui suit le 1° prélèvement
Zone normale

Méthodes de dosage

Préanalytique

- Nature du prélèvement
  - Initialement : sérum
    Faux positifs (résidus de fibrine)
  - Actuellement : plasma
    - EDTA
    - Héparine de lithium

Pour le suivi d'un patient :

Effectuer le même type de prélèvement

Utiliser la même trousse de dosage

- Stabilité de l'échantillon +++

Chaque fabricant doit déterminer les conditions de conservation des échantillons

En général : + 4°C = 4 h (peu stable)

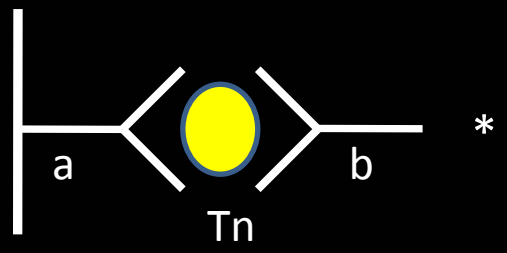
- 20 °C = 2 mois

Analytiques

Immunodosages de type "sandwich »

- Troisième génération

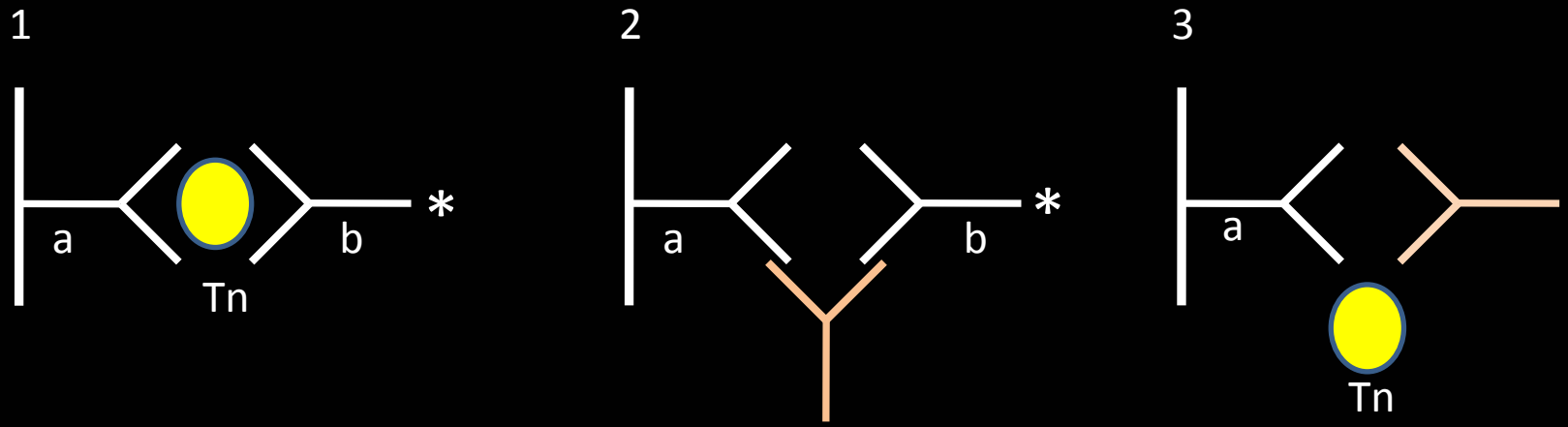
  Dosage ELISA avec 2 Ac monoclonaux cardiospécifiques



a - Ac de capture
b - Ac de révélation
* - signal

Causes d'inexactitude

- Effets de la fibrine
- Présence de certains anticorps
  - **Ac hétérophiles** : faux positifs ou faux négatifs
  - **Facteur rhumatoïde** : faux positifs



1 : déroulement normal du dosage : a - Ac de capture
b - Ac de révélation
* - signal

2 : Présence d'Ac hétérophiles lient l'Ac de capture et l'Ac de révélation : faux positifs

3 : Présence d'Ac hétérophiles se fixant directement sur l'Ac de capture, gène fixation de la Tn = faux négatifs

- Patients insuffisants rénaux : augmentation des troponines (T>I)
- Patients atteints de polymyosites ou dermatomyosite : augmentation des troponines (T>I)

Ces faux positifs se caractérisent par : (<1%)

soit une dissociation entre la clinique et la biologie

soit une mauvaise répétabilité des dosages (concentrations basses)

Post analytique : critères d'interprétation

Expression écrite des résultats indiquant :

- Valeur seuil recommandée (normale)
- Valeur pour nécrose myocardique
- Valeur à interpréter en fonction de la clinique

Difficultés d'interprétation des troponines du fait d'une grande hétérogénéité :

- Présence de trousses de différentes dans les laboratoires
- Hétérogénéité des protocoles d'établissement des seuils décisionnels
- Différentes natures des échantillons

→ Difficultés de comparaison selon les différents laboratoire

En résumé …

- Marqueur le plus cardiospécifique (100%)
  - ↳ Pas de faux positifs en cas de traumatisme des muscles squelettiques
- Diagnostic précoce et rétrospectif d'une nécrose myocardique
  - se positive 3 à 6 heures après le début des douleurs
  - reste élevée jusqu'à 10 jours après l'infarctus du myocarde
- Indications
  - diagnostic de l'IDM, angor instable et micro-infarctus
  - infarctus péri-opératoires
  - suivis de reperfusion
- Dosage pratique et facile
  - 5 ml de plasma
  - résultats réalisés en urgence 24h/24h
  - délai : 1 heure après réception de l'échantillon

Troponines T ultra-sensibles

- « Rien ne change » : la molécule dosée reste la même, mais avec une sensibilité décuplée

- « Tout change » : l'interprétation des résultats nécessite une nouvelle approche

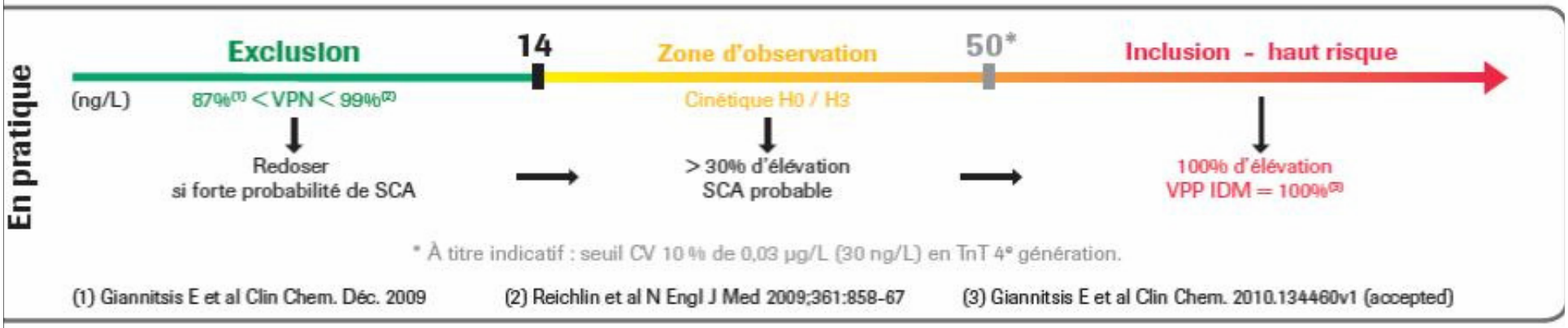
- Optimisation de la sensibilité +++
    - Utilisation de nouveaux Ac diminuant certaines interférences analytiques
    - Diminution du bruit de fond pour la quantification de la luminescence

L'accroissement de la sensibilité permet de doser des concentrations plus faibles de troponines T, les variations du signal analytique étant plus amples pour des variations de concentrations identiques.

Seuils de détections : troponine T ultra-sensible = 14 ng/l
troponine T = 30 ng/l

Intérêts

- Diagnostic plus précoce
- Détection de micro-nécroses cardiaques dans un contexte où les signes cliniques et élèctriques sont encore peu évocateurs



Une cinétique évolutive est en faveur d'une SCA
Un doublement entre H0 et H3 permet d'affirmer l'IDM(3)

La créatine kinase et isoenzymes

- Créatine Kinase (CK totale)

  - Dimère formé de 2 sous unités polypeptidiques :

    M (muscle) B (brain)

  - Rôle dans métabolisme énergétique et contraction musculaire
  - PM = 87 000
  - Présente dans les **muscles squelettique et cardiaque**
  - Passe du cytosol vers le sang après lyse cellulaire
  - Valeurs normales : 30 - 200 UI/l

- Isoenzymes de la créatine kinase
  - 3 isoenzymes de localisations tissulaires différentes
    - CK MM : muscle squelettique et cœur
    - CK MB : muscle cardiaque
    - CK BB : cerveau (prostate, foie, utérus, …)
  - Dans le sang :
    - la fraction MM représente 95 % de l'activité mesurée
    - la fraction MB représente 5 % de l'activité mesurée
    - la fraction BB est absente

- Macro CK
  - Type 1 : association de CK BB avec une Ig (IgG)
  - Type 2 : forme polymérique de la CK mitochondriale

Possible interférences dans le dosage de CKMB ++(CK atypiques)

Interprétation des CK MB

- Variations physiologiques

  - Activité CK fonction de la masse musculaire

  - Variation en fonction de l'âge et le sexe (H>F) en relation avec la masse musculaire (CK enfant > CK adulte)

  - Exercice physique (+ 50 %)

- Au cours de l'IDM

  Apparition entre 4 – 6 h après la douleur

  Pic : 18 – 22 h

  Normal : 60-72 h

- Autres pathologies

  Rhabdomyolyse, atteintes musculaires inflammatoires, dégénératives

  → Marqueur peu spécifique de l'IDM !

Méthodes analytiques

- *La CK totale*

  Mesure de l 'activité catalytique de la CK totale =
  mesure de la vitesse de formation d'ATP quand l'enzyme
  est en présence de créatine phosphate et ADP

  → Mesure de la réduction du NADP en NADPH +H

- *Isoenzymes de la CK (CK MB)*

  - Techniques **électrophorétiques**

    Spécifiques, non adaptées à l'urgence

  - Méthodes par **immunoinhibition**

    Inhibition de la SU M par un Ac spécifique
    Mesure de l'activité résiduelle de la SU B X 2
    Peu sensible
    Erreurs par excès : présence de macroCK, CK BB
    Interférence : hémolyse

- Détermination des **CK " masse "** +++

→ Dosage de la CK MB « protéine »

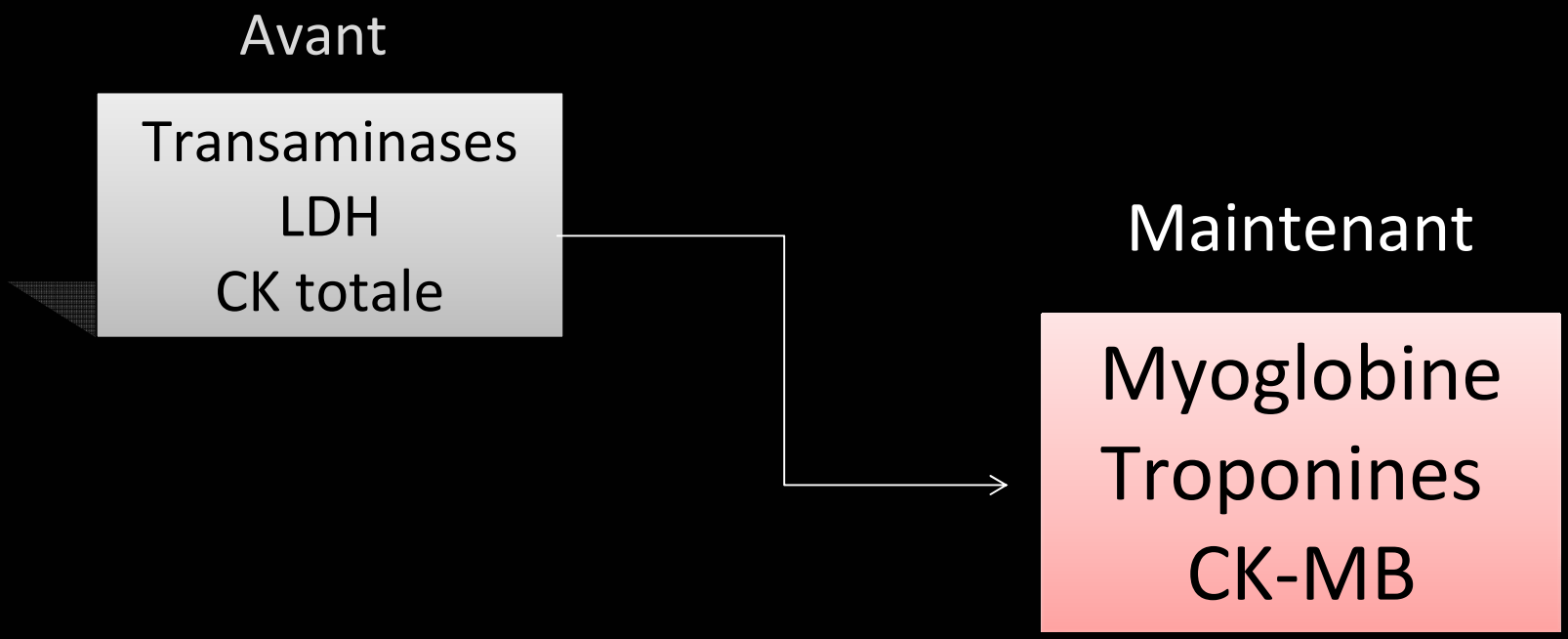
Méthode immunométrique :

- Utilisation de 2 Ac monoclonaux dirigés contre 2 épitopes différents de la CK MB
- Un des Ac est marqué par une enzyme ou un fluorophore permettant la quantification

→ Méthode rapide, automatisée, sensible et spécifique

Pas d'interférence avec CK MM, CK BB et macro CK

Marqueurs biologiques de la nécrose myocardique



Quels marqueurs cardiaques utiliser et quand ?

Troponine Ic

Spécifique
Sensible
Large fenêtre diagnostique

IDM
Angor instable : stratification du risque
Tout type de chirurgie

Myoglobine

Précoce
Excellente VPN
Non spécifique

Début d'IDM
Exclusion d'IDM
Suivi de thrombolyse
Récidive d'IDM

CK-MB

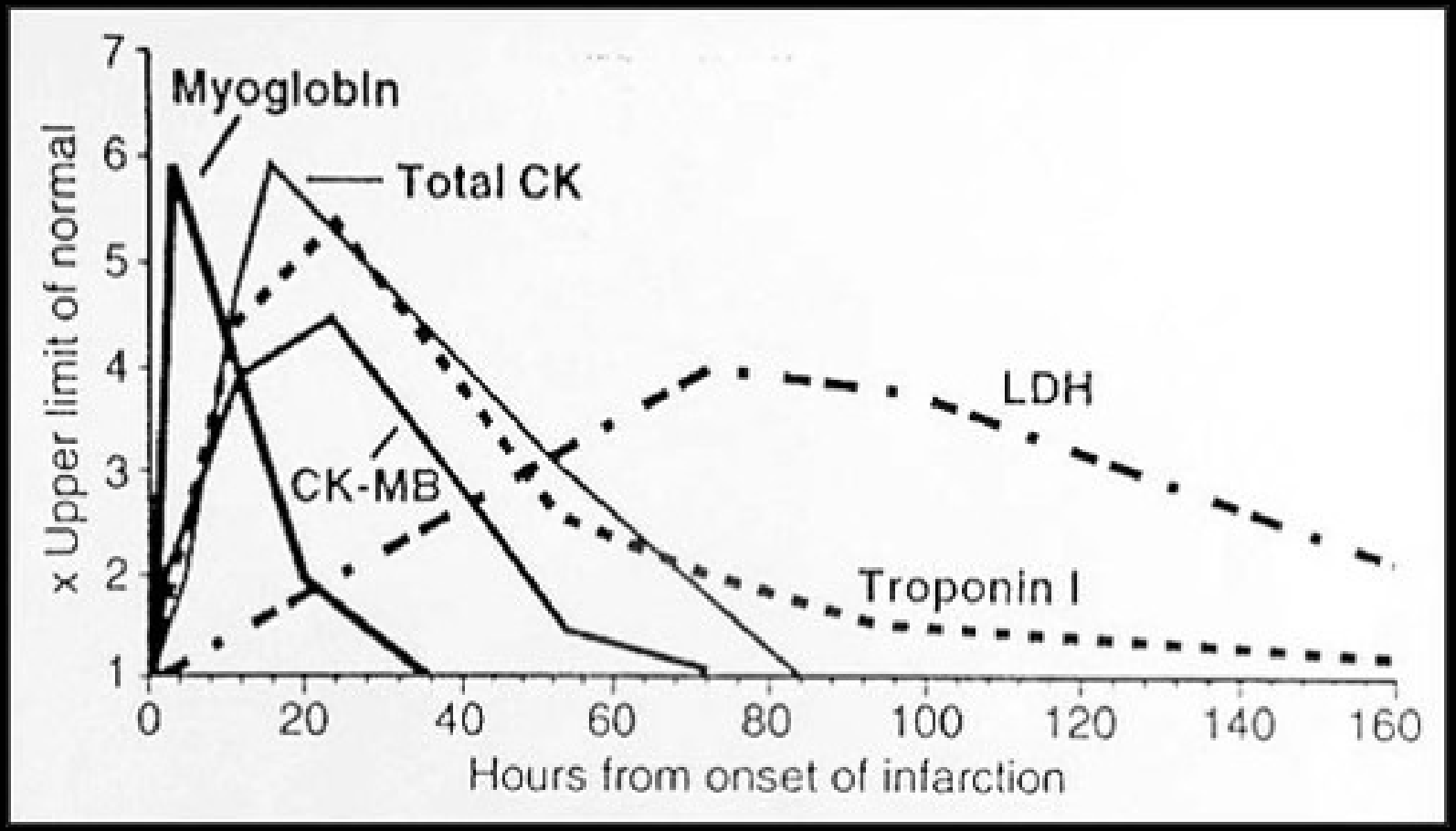
Moins spécifique que TnIc

Recommandations du ESC et ACC

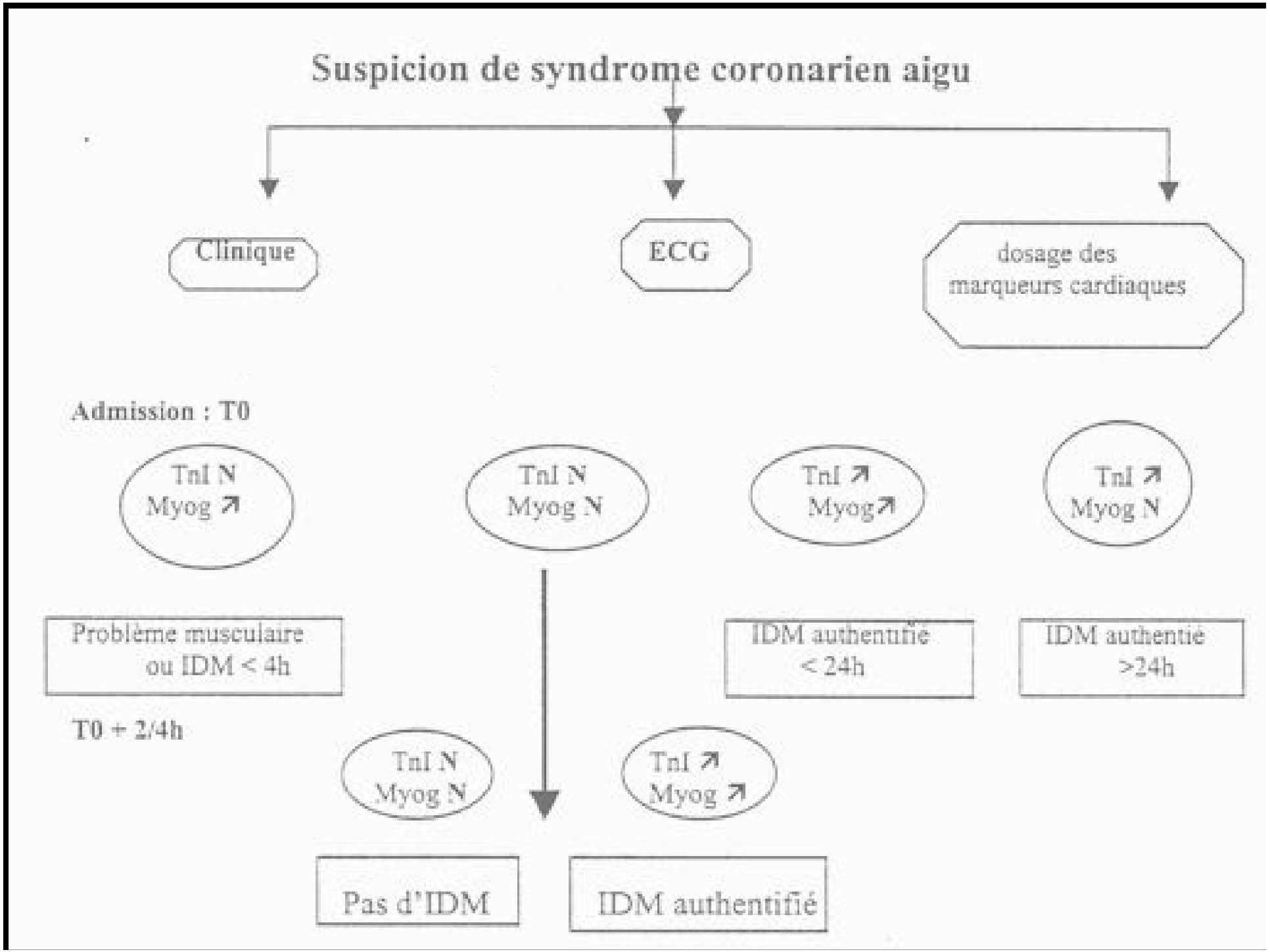
- Utiliser un marqueur précoce (myoglobine, CK-MB) et un marqueur plus tardif
- La troponine est le marqueur préféré pour le diagnostic des atteintes myocardiques
- ASAT, LDH ne devraient plus être utilisées dans le diagnostic des atteintes myocardiques
- Les prélèvements sanguins doivent être répétés : réalisés à l'admission, entre 6 – 9 h, puis entre 12-24h

ESC : European Society of cardiology
ACC : American College of cardiology

Cinétique des marqueurs cardiaque dans l'IDM



	Montée	Pic	Normale
Myoglobine	2-3 h	8-21 h	24-36 h
Troponine	3-6 h	18-24 h	5-10 j
CK-MB	4-6 h	18-22 h	60-72 h


Suspicion de syndrome coronarien aigu
Clinique
ECG
dosage des marqueurs cardiaques
Admission : T0
TnI N Myog ↗
TnI N Myog N
TnI ↗ Myog ↗
TnI ↗ Myog N
Problème musculaire ou IDM < 4h
IDM authentifié < 24h
IDM authentié >24h
T0 + 2/4h
TnI N Myog N
TnI ↗ Myog ↗
Pas d'IDM
IDM authentifié

Insuffisance cardiaque

Insuffisance cardiaque

Incapacité de la pompe cardiaque à assurer un débit sanguin suffisant aux différents tissus de l'organisme dans des conditions de repos ou à l'effort

Principales causes : (maladie du sujet âgé)

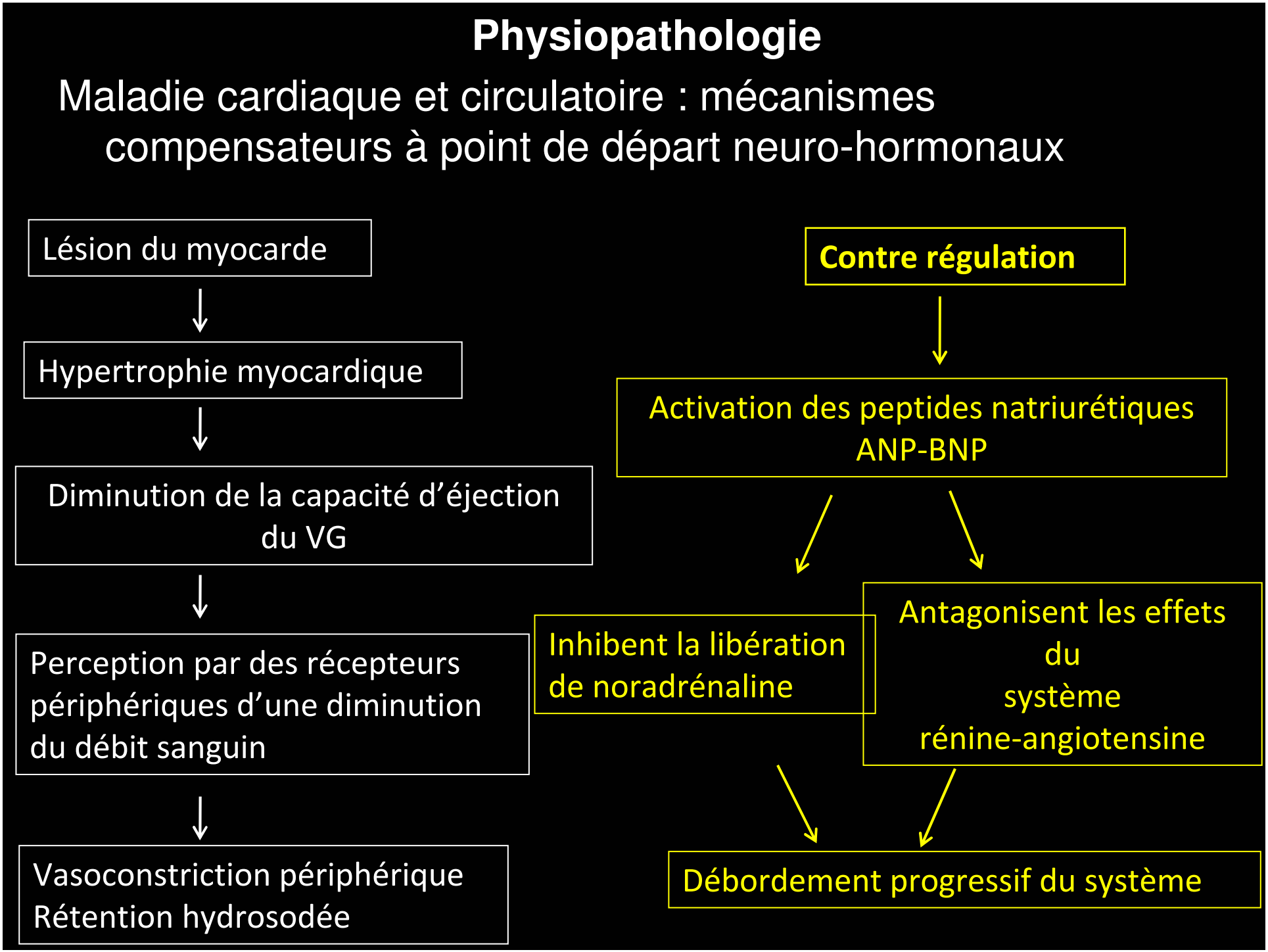
- Maladies coronaires
- HTA
- Cardiomyopathies
- Valvulopathies

Insuffisance cardiaque et biologie

- Permet un diagnostic précoce
- Suivi de l'insuffisance cardiaque

Physiopathologie

Maladie cardiaque et circulatoire : mécanismes compensateurs à point de départ neuro-hormonaux



Classification internationale de l'insuffisance cardiaque NYHA

Classe 1

- aucune limitation des activités physiques
- ni dyspnée ni fatigue lors des activités de la vie courante

Classe 2

- limitation modérée des activités physiques
- gêne lors des activités physiques importantes
- pas de gêne au repos

Classe 3

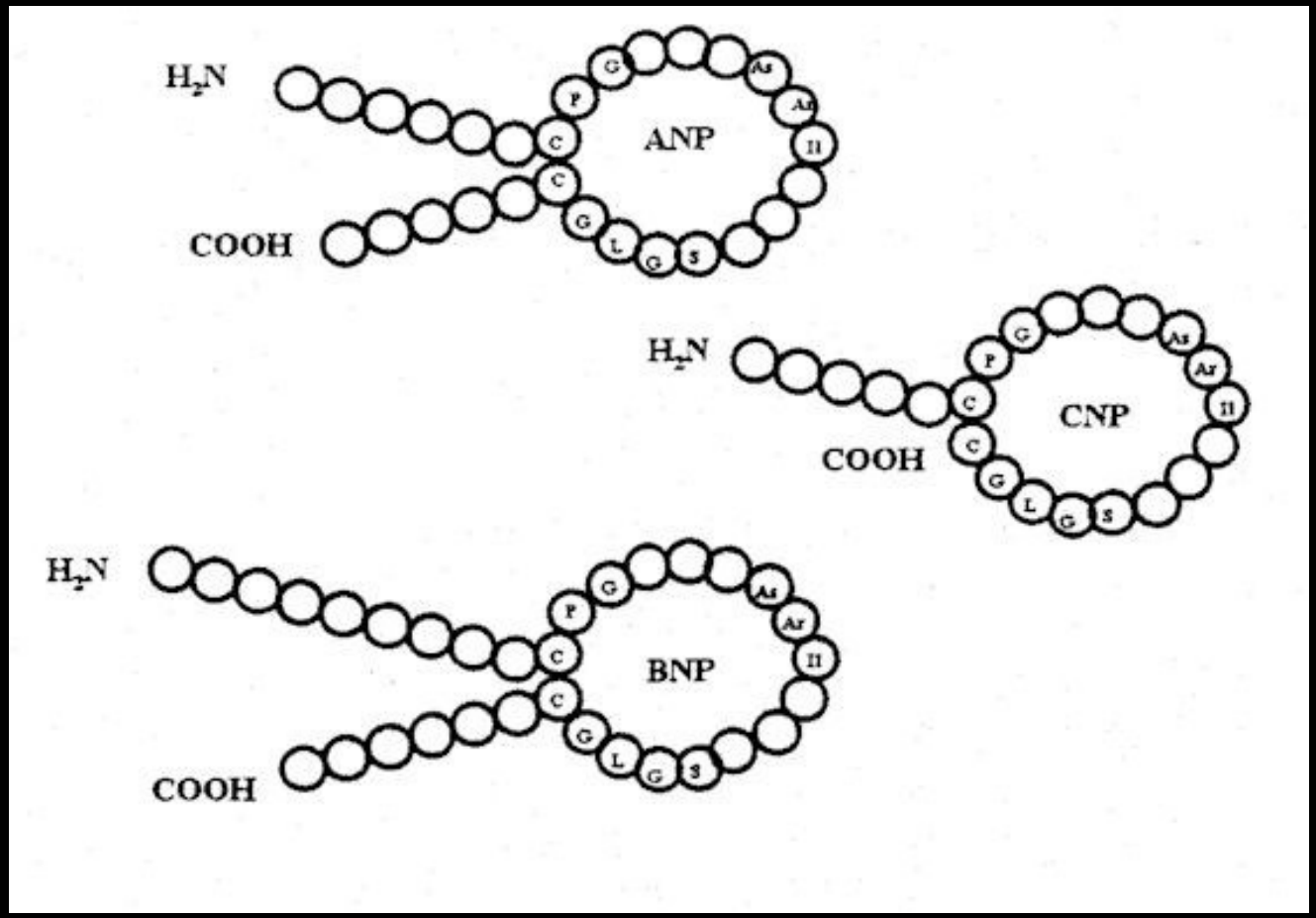
- Limitation franche des activités physiques
- gêne lors des activités, même modérées, de la vie courante
- pas de gêne au repos

Classe 4

- incapacité d'effectuer la plupart des activités de la vie courante sans une gêne importante
- gêne au repos

Marqueurs biologiques de l’insuffisance cardiaque

Peptides natriurétiques



BNP : peptide natriurétique de type B

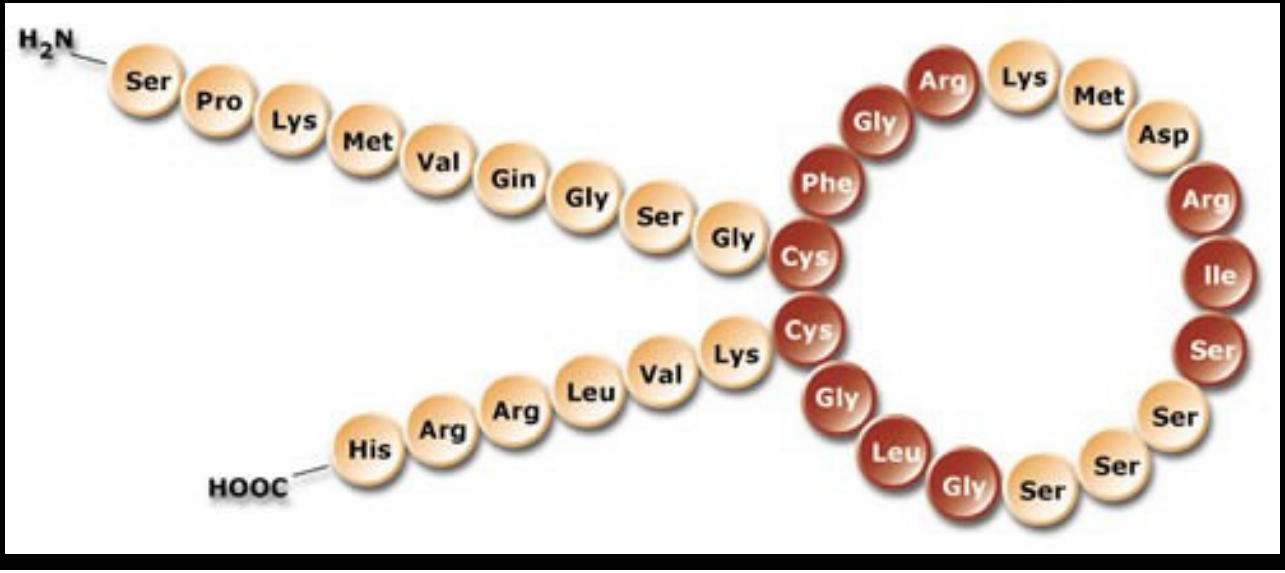
Hormone polypeptidique (32 AA)

Produite par les ventricules

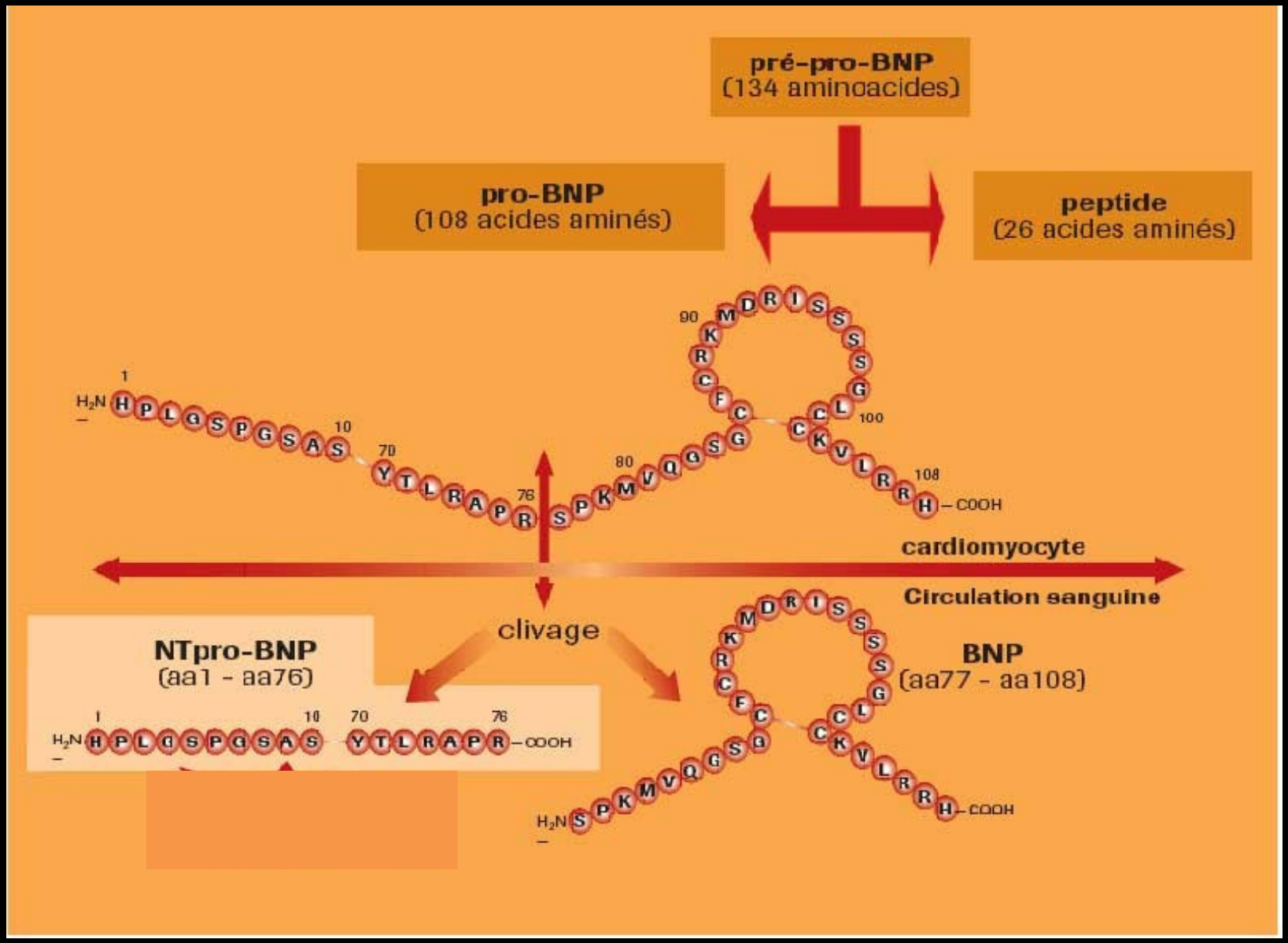
Sa concentration augmente dans les insuffisances cardiaques

Demi-vie = 20 min

Grande hétérogénéité des formes circulantes +++



Libération du BNP



Rôle physiologique du BNP

- Peptide natriurétique à action diurétique et vasodilatatrice
- Sécrété par les myocytes suite à :
  - Augmentation de l'étirement ventriculaire
  - Une pression intracardiaque trop forte (hypervolémie)
  - Hypertension artérielle
- Actions (inhibe le système rénine-angiotensine-aldostérone)
  - Rein : augmente diurèse et Natriurèse
    augmente la filtration glomérulaire
    diminue la résorption sodée
  - Vaisseaux : vasodilatation périphérique
  - Cœur : vasodilatation coronaires
  - Surrénales : diminution de la sécrétion d'aldostérone
- Compensation de la surcharge hydrique et de l'hypertension induites par l'insuffisance cardiaque

Intérêt diagnostique du BNP

- Diagnostic étiologique des dyspnées
  - Cardiaque ou pulmonaire
  - Valeur prédictive négative +++

- Evaluation du pronostic
  - Sévérité de l'IC : augmentation proportionnelle à la gravité
  - Stratification de risque des syndromes coronariens aigus :
    - suivi post infarctus (pronostic)
    - angor instable
- Suivi thérapeutique
  - → Evaluation de l'efficacité du traitement de l'IC

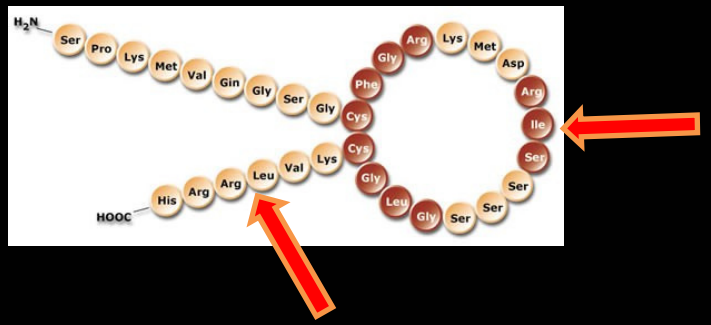
Méthodes de dosage

- Pré-analytique
  - EDTA : Activation des facteurs de coagulation
    (augmente la dégradation du BNP)
    BNP sensible aux protéases
    (inhibées par EDTA)
  - Stabilité : 4 h à 4°C
    1 mois à – 20°C

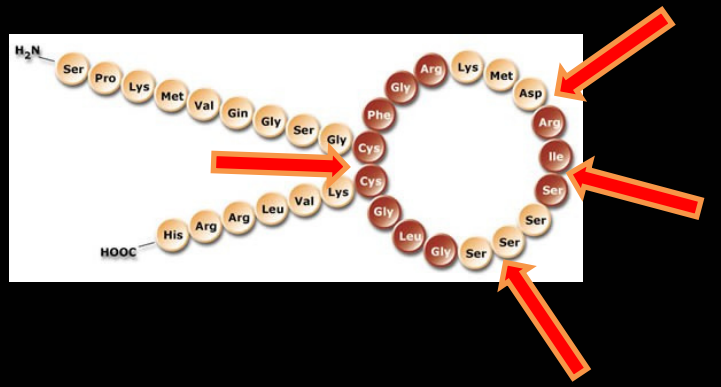
- Analytique : techniques **immunométriques type sandwich**

Différents anticorps utilisés pour le dosage du BNP

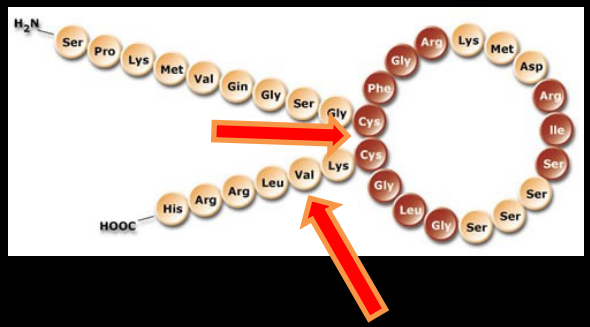
2 Ac : partie C terminale
boucle



Plusieurs Ac : pont dissulfure
panel d'Ac reconnaissent
plusieurs épitopes



2 Ac : pont dissulfure
extrémité C terminale



Problèmes analytiques

- Homologie entre les différents peptides natriurétiques

  utilisation d'anticorps spécifiques, reconnaissant la partie active vis-à-vis du récepteur

- Utilisation d'anticorps monoclonaux, différents selon les trousses de dosage

- Risque : dosage du BNP et aussi proBNP

  Hétérogénéité des dosages, non standardisés

NT-Pro BNP

Provient du clivage du proBNP

Intérêts :

- Valeur diagnostique : insuffisance cardiaque
- Valeur pronostique : taux corrélés à la sévérité de l'IC
- Etiologique : différencie dyspnée d'origine pulmonaire de cardiaque
- Suivi thérapeutique

Comparaison BNP / NT-proBNP

	BNP	NT-proBNP
Taille	32 aa	76 aa
Actif	+	-
1/2 vie	22 min	120 min
Insuff rénale	+/-	+
Prélèvement	EDTA	Sérum ou plasma
Stabilité t° ambiante	4 h	24 h à 72 h
Cut off	100 ng/l	Voir ci dessous

BNP

<100 ng/l : écarte IC (96%)
100-400 ng/l faible spé (79 %)
> 400 ng/l : IC

NT-proBNP

Dyspnées chroniques
<75 ans : 125 ng/l
>75 ans : 450 ng/l
Dyspnées aigües : **exclusion IC <300 ng/l**
Inclusion IC : <50 ans : 450 ng/l
50-75 ans : 900 ng/l
>75 ans : 1800 ng/l

Conclusions

- Difficultés d'interprétation des marqueurs cardiaques +++
- La responsabilité du biologiste impose au laboratoire de
  - Maîtriser l'ensemble des problèmes pré-analytiques et analytiques du dosage des marqueurs cardiaques.
- Il est important de connaître les limites de ces tests de façon à les utiliser à bon escient.
- Tout résultat rendu avec un prélèvement présentant des qualités analytiques non conformes doit être signalé

