

## Intérêt du dosage de la Bilirubine Non Liée à l'albumine (BNL) chez les nouveaux-nés ictériques

Dr Agnès Mailloux, biologiste CNRHP / Dr Anne Cortey, néonatalogiste, responsable activité pédiatrique CNRHP / Dr Marc Larsen, biologiste CNRHP / Dr Yves Brossard, coordonateur CNRHP



Dr Agnès Mailloux

### Intérêt du dosage de la Bilirubine Non Liée à l'albumine (BNL) chez les nouveaux-nés ictériques

L'ictère à bilirubine non conjuguée est un problème quotidien en maternité puisqu'il est présent chez environ 2/3 des nouveau-nés. Il apparaît cliniquement pour des concentrations en bilirubine totale supérieures à 80 µmol/l mais il est le plus souvent bénin et régresse spontanément. Cependant dans un certain nombre de cas, l'hyperbilirubinémie peut être à l'origine d'une encéphalopathie séquellaire, encore appelée ictère nucléaire (1,2). Ces complications sont dues à la bilirubine libre, non conjuguée, (poison interférant à différents niveaux du métabolisme cellulaire), qui après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique particulièrement vulnérable dans ces premiers jours de vie, va se fixer au niveau des noyaux gris centraux. L'hyperbilirubinémie libre ne peut être considérée comme le seul facteur biologique associé au risque d'ictère nucléaire et de nombreux

facteurs cliniques ont été identifiés comme aggravant ce risque : l'hémolyse néonatale (dégradation de l'hème précoce conduisant à une hyperbilirubinémie), la prématurité, l'acidose, la souffrance neurologique périnatale. Les dernières recommandations publiées en 2004 par l'American Academy of Pediatrics (AAP) pour la prise en charge de l'ictère chez le nouveau-né restent basées sur la concentration en bilirubine totale considérée comme facteur prédictif de risque d'ictère nucléaire (3). Toutefois, des observations cliniques montrent qu'au-delà de la valeur seuil de 342 µmol/l, le taux de bilirubine totale analysé isolément est un facteur discriminant insuffisant pour apprécier individuellement le risque de toxicité de la bilirubine. Les ictères nucléaires apparaissent rarement pour des concentrations en bilirubine totale < 428 µmol/l chez le nouveau né à terme et c'est donc à partir de ce seuil que l'AAP recommande une prise en charge invasive avec exsanguino transfusion. Cependant, on observe qu'un certain nombre de nouveau-nés avec des concentrations au delà de 428 µmol/l échappent à toutes complications séquellaires (4,5,6) et qu'à l'inverse certains ictères nucléaires sont décrits pour des concentrations inférieures à 350 µmol/l en particulier chez des nouveau-nés présentant l'un des facteurs de risque suivant : prématurité, déshydratation, acidose. Dans le même ordre d'idée, le taux d'hyperbilirubinémie, considéré isolément est mal corrélé au devenir neurologique dans les études à long terme de suivi. Une autre variable

biologique communément désignée « bilirubine non liée » semble présenter un intérêt prédictif plus grand (7). Plusieurs études expérimentales et cliniques montrent en effet que les effets toxiques de la bilirubine (culture cellulaire, Electroencéphalogramme, Potentiels Evoqués Auditifs...) sont mieux corrélés avec la concentration en bilirubine non liée qu'avec celle de la bilirubine totale (8,9).

### Facteurs déterminant la concentration en bilirubine

La concentration en bilirubine totale dépend de sa production, de son excrétion, et de sa réabsorption intestinale. Ces 3 facteurs déterminent la charge nette de bilirubine qui s'accumule avec le temps et qui est distribuée dans différents compartiments de l'organisme. Le plasma est un des nombreux compartiments (comprenant le foie, la peau, les globules rouges, le cerveau, les phospholipides membranaires, etc) qui sont en concurrence pour les échanges de bilirubine. La répartition de la bilirubine entre les différents compartiments dépend du nombre de sites de liaison dans chaque compartiment et leur affinité pour lier la bilirubine, du pH, etc... Le plasma est un compartiment central pour ces échanges.

### Caractéristiques de la liaison Bilirubine-Albumine

Dans le plasma, l'albumine est le principal transporteur de bilirubine avec une constante de liaison très forte  $K = 107 \text{ L/mol}$  (similaire à  $K$  dans la réaction  $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ ) (10) ce qui se traduit par une fraction



de Bilirubine Non Liée à l'albumine (BNL) très faible dans le plasma : 0 à 3 µg/dl ou 0 à 50 nmol/l. Il existe plusieurs sites de fixation de la bilirubine à l'albumine : un site principal de forte affinité et des sites secondaires d'affinités plus faibles. Le site principal de liaison de la bilirubine à l'albumine est un site non spécifique ouvert à de

nombreux compétiteurs endogènes (acides gras) et exogènes : les sulfamides, le benzoate, les métabolites de l'alcool benzylique par exemple. Tous ces médicaments ont d'ailleurs été associés à des ictères nucléaires chez des enfants prématurés (11). Enfin la constante de liaison de la bilirubine à l'albumine est très variable d'un nou-

veau-né à l'autre, elle est plus basse chez des enfants malades et semble augmenter avec l'âge post-natal.

Toutes ces caractéristiques font qu'*in vivo* la concentration en BNL ne peut être déduite du rapport bilirubine non conjuguée/albumine.

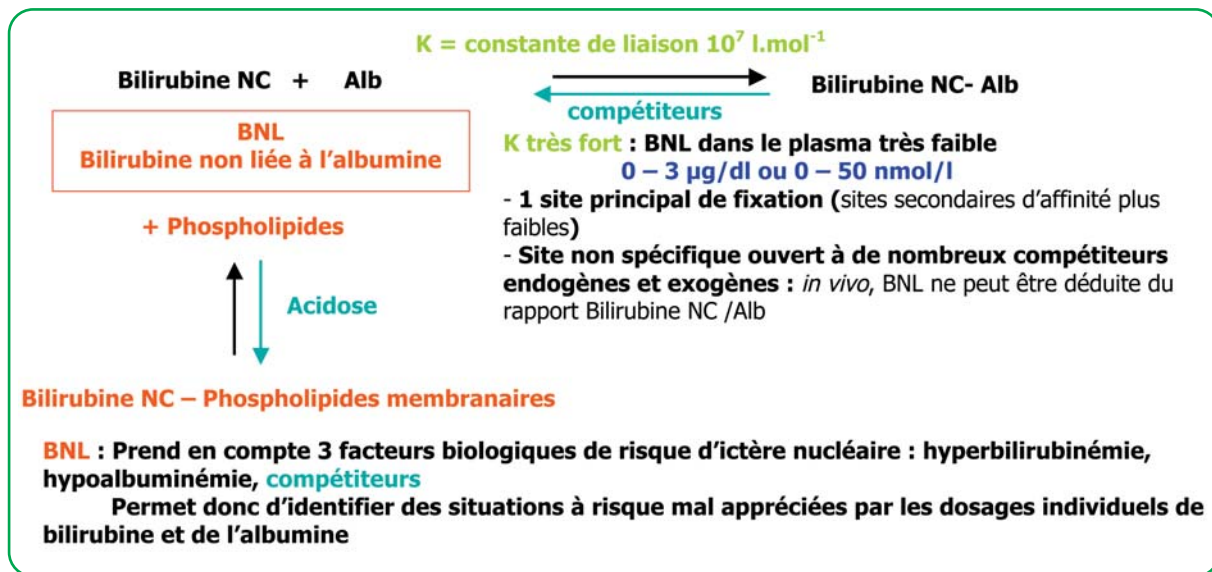


FIGURE 1 : Liaison Bilirubine – Albumine, caractéristiques et intérêt de l'exploration

### Intérêt de l'exploration de la liaison Bilirubine-Albumine

L'exploration de la liaison de la bilirubine-albumine prend en compte 3 facteurs de risque d'ictère nucléaire : l'hyperbilirubinémie, l'hypoalbuminémie et la présence de compétiteurs de la liaison bilirubine-albumine (hème, acides gras, médicaments). Elle permet donc d'identifier des situations à risque mal appréciées par des dosages individuels de bilirubine totale et de l'albumine.

*In vivo* la liaison Bilirubine-Albumine est en concurrence avec les liaisons de la bilirubine avec d'autres ligands notamment les phospholipides membranaires et ces différents équilibres sont reliés entre eux (figure1). Tout ce qui va affaiblir la liaison Bilirubine/Albumine va favoriser la formation du complexe Bilirubine-Phospholipides membranaires. Il est donc essentiel d'identifier ces états en biologie clinique.

### Techniques d'exploration de la liaison Bilirubine-albumine

Historiquement, c'est Odell qui en 1969, a cherché à mettre en place une technique d'exploration de la liaison Bilirubine-Albumine par la mesure du Salicylate Index (12) suite à la survenue d'ictères nucléaires chez des prématurés traités par sulfamides antibactériens. Porter et al ont étudié la capacité résiduelle de liaison de l'albumine par le colorant HBABA (13). C'est en 1967 que le dosage de bilirubine intra-érythrocytaire a été introduit, avec à la même époque, le développement des techniques en gel filtration sur Sephadex (14,15). Le développement du dosage de la BNL par une méthode de peroxydation date de 1974 (16). Le principe de ce dosage est une dégradation rapide de la BNL en un leuco-dérivé par l'action d'une peroxydase en présence d'eau oxygénée, source de radicaux libres. L'étude de la cinétique de la réaction

permet, connaissant la constante d'activité de la peroxydase, de calculer la concentration en BNL. Depuis 1989, ce dosage est réalisé au CNRHP par cette méthode sur un instrument dédié à la mesure de la BNL, l'UB Analyser (Arrows, Co, Ltd, Osaka, Japon, dosage non automatisé). Récemment, nous avons adapté et validé cette technique sur 2 automates ouverts de biochimie le CX4CE et le DxC800 de Beckman-Coulter (communication proposée au congrès de l'AACC en Juillet 2008). Nous réalisons quotidiennement ce dosage en même temps que celui de la bilirubine totale sur tous les prélèvements de nouveau-nés qui nous sont adressés pour bilan d'ictère. La figure 2 présente des résultats de bilirubine totale versus ceux de BNL sur 1424 dosages. On observe un indice de dispersion très élevé des résultats de BNL en fonction des concentrations en bilirubine totale. A titre d'exemple pour une con-

centration voisine de 350  $\mu\text{mol/l}$  de bilirubine totale les valeurs de BNL s'étendent de 0,4 à 1,2  $\mu\text{g/dl}$ . La valeur seuil de BNL à partir de laquelle un risque d'ictère nucléaire est présent est fixé à 0,80  $\mu\text{g/dl}$  pour des nouveau-nés prématurés (ou avec un poids < à 1500g) et à 1,20  $\mu\text{g/dl}$  pour des nouveau-nés à terme (ces chiffres appliqués au CNRHP sont également ceux retrouvés dans la littérature). Ces valeurs seuils permettent de repérer des enfants à risque de toxicité neurologique malgré une bilirubine totale < 350  $\mu\text{mol/l}$ . Après analyse rétrospective, tous les enfants identifiés dans cette zone (définie en jaune sur la figure) présentaient des facteurs aggravant de toxicité de bilirubine : prématurité, déshydratation, hypotrophie ce qui illustre bien l'intérêt du dosage de la BNL.

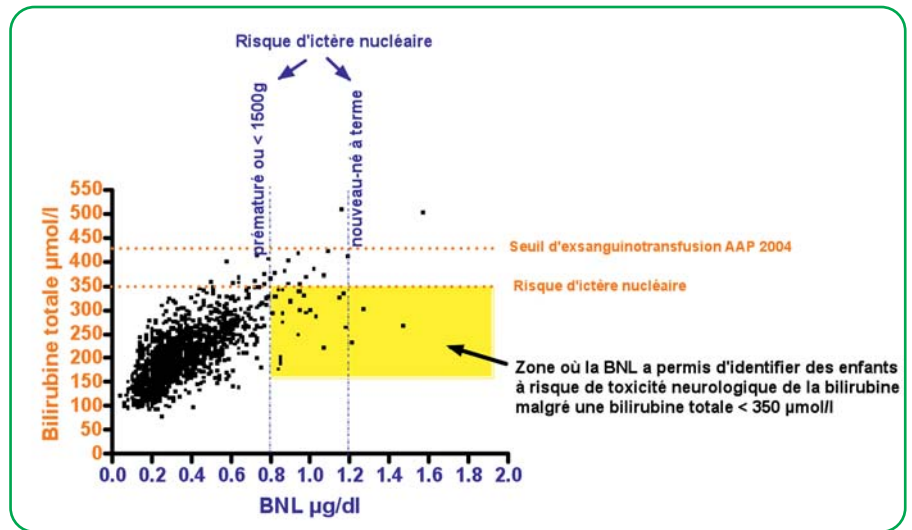


FIGURE 2 : Résultats de Bilirubine totale versus BNL sur 1424 dosages de nouveau-nés réalisés au CNRHP.

### Conclusion

La pratique de l'exploration de la liaison de la Bilirubine à l'Albumine en biologie clinique jusqu'à maintenant limitée à quelques laboratoires est en passe de devenir une recommandation généralisable à toute exploration biologique d'un ictère néonatal (7).

La technique automatisée présentée ici permet en grande partie de répondre à cette attente. Toutefois, elle con-

naît des limites comme par exemple les interférences avec certaines espèces moléculaires (bilirubine glycuronoconjugée et photodérivée) nettement plus hydrosolubles et plus sensibles que la bilirubine libre à l'oxydation générée par la réaction de peroxydation (17). Cependant, l'accumulation de ces différentes espèces est rarement rencontrée chez le nouveau-né et le dosa-

ge de la bilirubine directe permet alors d'identifier ces cas. D'autres techniques peuvent alors être utilisées comme le dosage de la bilirubine intra-érythrocytaire comme indicateur du risque neurotoxique de la bilirubine non conjuguée mais il s'agit d'une technique manuelle et lourde. ☹

### Bibliographie :

- 1- Mollison PL, Walker W. Controlled trials of the treatment of hemolytic disease of the newborn. *Lancet*. 1952;1 (9):429-433
- 2- Hsia DY, Allen FH Jr, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis VIII: studies of serum bilirubin in relation to kernicterus. *N Engl J Med*. 1952;247:668-671
- 3- American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation [published correction appears in *Pediatrics*. 2004;114:1138]. *Pediatrics*. 2004;114:297-316
- 4- Johnson LH, Bhutani VK, Brown AK. System-based approach to the management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. *J Pediatr*. 2002;140:396-403
- 5- Ip S, Chung M, Kulig J, et al. An evidence-based review of important issues concerning neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics*. 2004;114(1)
- 6- Newman TB, Liljestrand P, Escobar GJ. Infants with bilirubin levels of 30 mg/dL or more in a large managed care organization. *Pediatrics*. 2003;111:1303-1311
- 7- Wennberg RP, Ahlfors CE, Vinod K, Bhutani, Johnson LH, and Shapiro SM. Toward Understanding Kernicterus: A Challenge to Improve the Management of Jaundiced Newborns. *Pediatrics*. 2006;117(2):474-485
- 8- Funato M, Tamai H, Shimada S, Nakamura H. Vigintiphobia, unbound bilirubin, and auditory brainstem responses. *Pediatrics*. 1994;93:50-53
- 9- Nakamura H, Yonetani M, Uetani Y, Funato M, Lee Y. Determination of serum unbound bilirubin for prediction of kernicterus in low birthweight infants. *Acta Paediatr Jpn*. 1992;34:642-647
- 10- Jacobsen J. Binding of bilirubin to human serum albumin: determination of the dissociation constants. *FEBS Lett*. 1969;5:112-111
- 11- Silverman WA, Andersen DG, Blanc WA, Crosier DN. A difference in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regimens. *Pediatrics*. 1956;18:614-624
- 12- Odell GB, Cohen SN, Kelly PC. Studies in kernicterus: II. The determination of the saturation of serum albumin with bilirubin. *J Pediatr*. 1969;74:214-230
- 13- Porter EG, Waters WJ. A rapid micromethod for measuring the reserve albumin binding capacity in serum from newborn infants with hyperbilirubinemia. *J Lab Clin Med*. 1966;67:660-668
- 14- Kaufmann NA, Simeha AJ, Blondheim SH. The uptake of bilirubin by blood cells from plasma and its relationship to the criteria for exchange transfusion. *Clin Sci*. 1967;33:201-208
- 15- Kaufmann NA, Kapitunik J, Blondheim SH. Bilirubin binding affinity of serum: comparison of qualitative and quantitative Sephadex gel filtration methods. *Clin Chem*. 1973;19:1276-1279
- 16- Jacobsen J, Wennberg RP. Determination of unbound bilirubin in the serum of newborns. *Clin Chem*. 1974;33:783-789
- 17- McDonagh AF, Maisels MJ. Bilirubin Unbound: Déjà Vu All Over Again? *Pediatrics*. 2006;117(2):523-525.