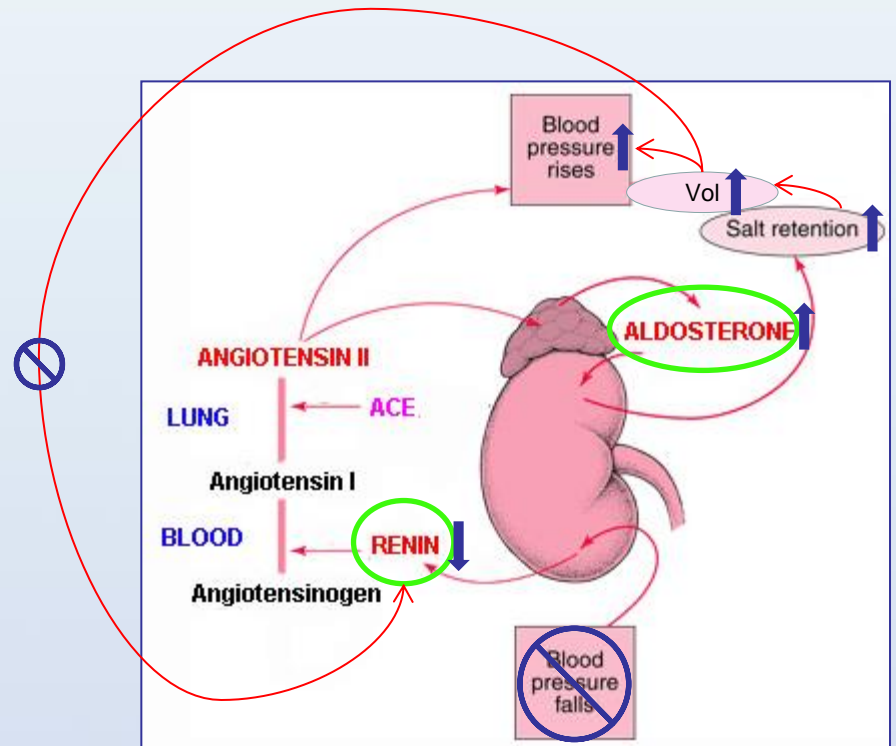


EXPLORATION D'UNE HYPERTENSION

II. Aspects biologiques

Ph. Terry Laurent
terry.laurent@chu.ulg.ac.be

- Aldostérone
- Rénine
 - Activité Rénine
 - Rénine Directe



RENINE

- **Rénine activité vs. Rénine directe**

- Rénine activité :

Mesure de l'activité protéolytique de la rénine sur l'angiotensinogène.

La quantité d'angiotensine I générée est mesurée en un temps donné.

Angiotensinogène $\xrightarrow{\text{Rénine}}$ Angiotensine I

- Rénine directe :

Dosage de la rénine en RIA ou ECLIA

(anticorps spécifiques du site actif)

- Corrélation activité rénine/rénine directe

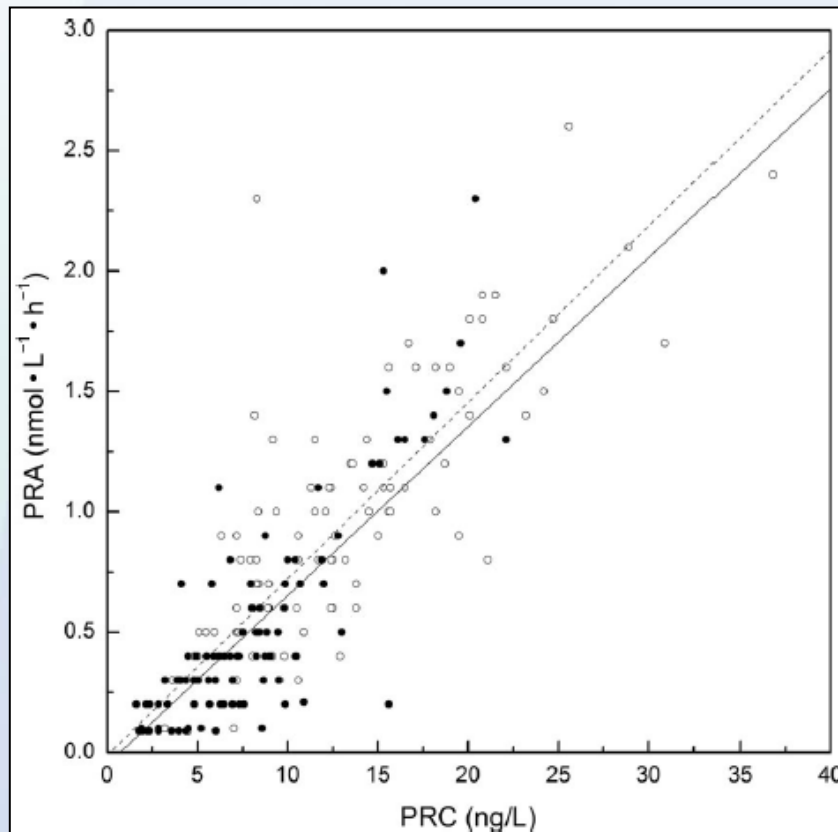


Fig. 1. Passing–Bablok analysis comparing PRA and PRC results before (dashed line) and after (continuous line) the SLT ($r_s = 0.80$ and 0.74 , respectively; $P < 0.001$ for both).

Indicated are data before the SLT (○) ($y = -0.073x - 0.011 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and after the SLT (●) ($y = -0.070x - 0.049 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Activité rénine plasmatique

- **Pré-Analytique**

- **Type d'échantillon** Tubes réfrigérés avant prélèvement (en pratique ?)

- Plasma **EDTA** (⚠ pas sur plasma hépariné)

NB : Si hémolyse importante → demande d'un nouveau prélèvement

(les échantillons contenant 1000 mg/dL donnent des valeurs inférieures d'environ 10%)

- **Conservation de l'échantillon**

- Congeler le plasma le plus rapidement possible (maximum 2 semaines)
- Après décongélation, placer immédiatement les échantillons dans de la glace.

Position couchée : > **2 heures** avant prélèvement !

Position debout : > **1 heure** d'activité debout avant prélèvement !

Orthostatisme

→ 2 à 3 x valeurs en position couchée



But : Angiotensinogène $\xrightarrow[t^\circ \text{ ambiante}]{\text{rénine}}$ Angiotensine I

⚠ température < 4° C
tout au long du processus !

Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration

Zoltan Locsei^a, Karoly Racz^{b,*}, Attila Patocs^{c,d}, Gabor L. Kovacs^{f,g}, Erzsebet Toldy^{e,f}

Clinica Chimica Acta 402 (2009) 203–205

- **Pré-Analytique**
 - Conservation de l'échantillon

Etude récente (2009) :

Conservation à température ambiante pendant 2 heures avant traitement
→ Chute significative de l'activité rénine !




Conservation entre 0 – 5° C pendant 2 heures avant traitement
→ Taux restent inchangés

Après 7 semaines de stockage à -20° C
→ Changement significatif des taux

Il est aussi recommandé que le stockage des échantillons destiné au test PRA n'excède pas 2 semaines.

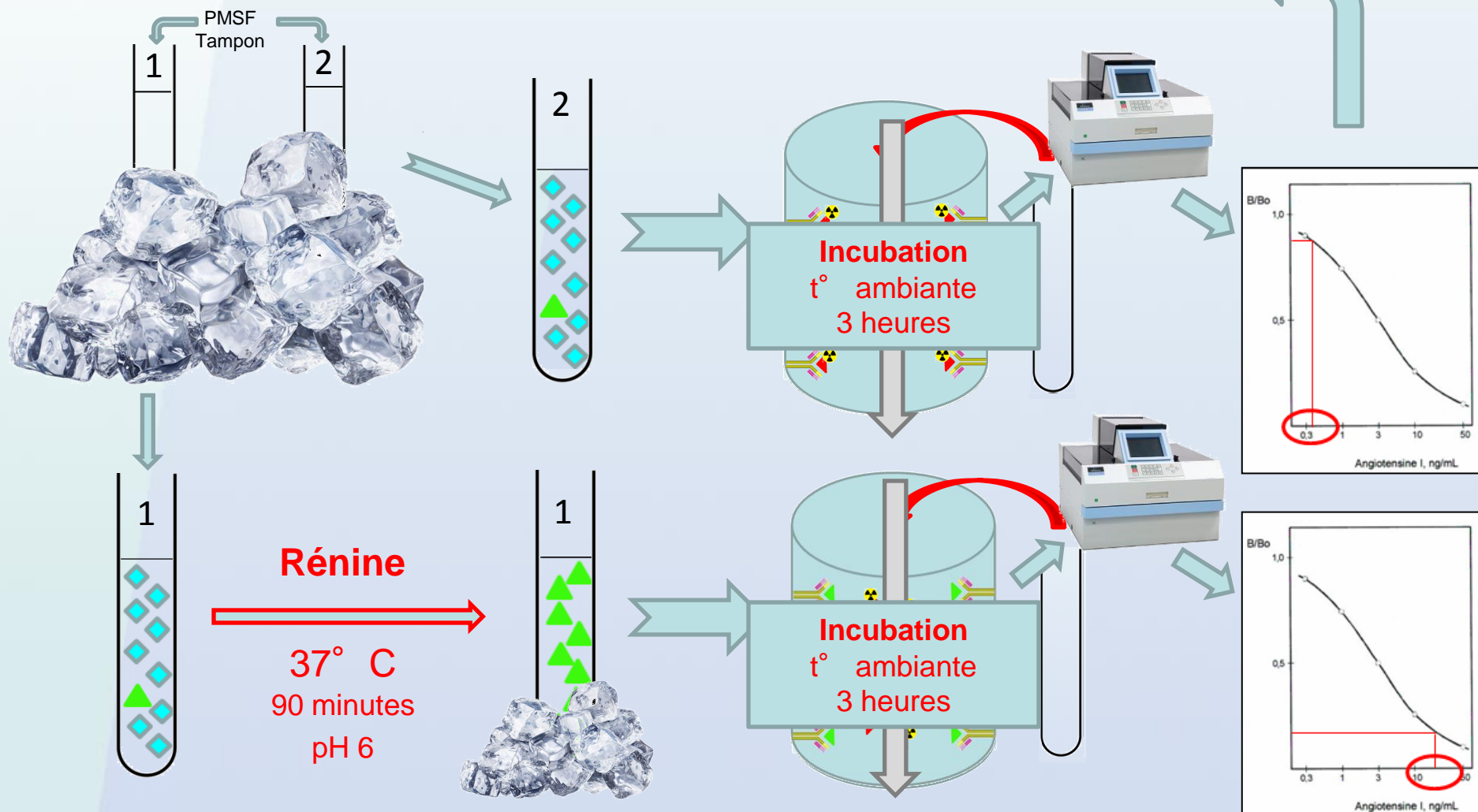
- **Analytique**
 - **Immunoassays**
 - Manuel :
 - RENCTK (DiaSorin)
 - **LC-MS/MS** (home-made)

Dosage de l'activité rénine

-  Angiotensinogène
-  Angiotensine I
-  Angiotensine I marquée

Dosage par
COMPETITION

Activité Rénine = 12 ng/mL/h – 0,2 ng/mL/h = 11,8 ng/mL/h

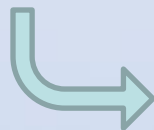


• Inconvénients :

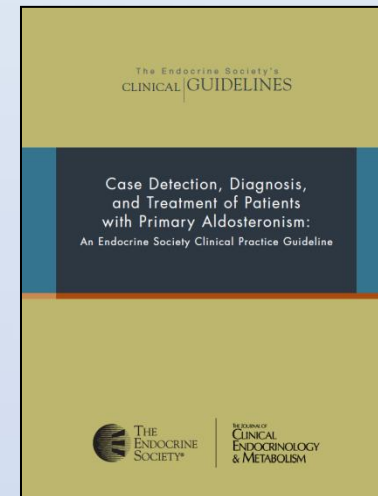
- ✓ Dosage manuel fastidieux (≈ 8 heures)
- ✓ Pré-analytique !
- ✓ Variabilité analytique non-négligeable due aux différentes étapes du dosage
- ✓ Manque de standardisation
- ✓ Pas de Standard International disponible
- ✓ Génération de l'angiotensine I → conditions *in vitro* non physiologiques (pH 6)
- ✓ Certaines pathologies (cirrhose,...) sont associée à de faible niveaux circulants d'angiotensinogène
→ sous-estimation de l'activité rénine
- ✓ En cas de traitement par oestradiol, les taux d'angiotensinogène augmentent
→ surestimation de l'activité rénine

• Avantages :

- ✓ Evaluation fonctionnelle de la rénine circulante
- ✓ Guidelines de la prise en charge de l'hyperaldostéronisme primaire publiées initialement avec ce dosage



Utilisé en routine suite à une concertation avec les différents cliniciens concernés (endocrinologues, néphrologues, chirurgiens des glandes endocrines)



- ✓ Variabilité analytique non-négligeable due aux différentes étapes du dosage

Rappel :

Screening de l'hyperaldostéronisme → Rapport Aldostérone/Activité rénine (ARR)

- < 30 : résultat en défaveur d'un possible hyperaldostéronisme primaire
- > 30 : résultat en faveur d'un possible hyperaldostéronisme primaire

↳ A confirmer par un nouveau AAR

↳ Tests de confirmation

The ARR appears to be more dependent on renin than aldosterone , *especially when renin concentrations* are low (as in patients with primary aldosteronism), in which case small absolute changes can result in large changes in the ARR.

✓ Variabilité analytique non-négligeable due aux différentes étapes du dosage

Impact sur le ratio Aldo (ng/dL)/PRA (μg/L/h), d'autant plus que la valeur de PRA est basse !

Table 1. Plasma renin activity results for 5 measurements of 2 samples.

	Angiotensin I produced after an incubation of 1 h at 37 °C	Endogenous angiotensin I	PRA result
Sample 1			
Mean (SD), μg/L/h	0.69 (0.14)	0.06 (0.05)	0.63 (0.15)
CV, %	20.1	84.2	23.7
Sample 2			
Mean (SD), μg/L/h	0.88 (0.12)	0.14 (0.03)	0.73 (0.10)
CV, %	14.1	22.3	13.5

⇒ 0,44 – 0,81

⇒ 0,58 – 0,89

Admettons pour ces patients une valeur d'aldostérone couchée = 200 ng/L (>150 ng/L)

→ Aldo/PRA = 22 à 50 (patient 1)

= 20 à 38 (patient 2)

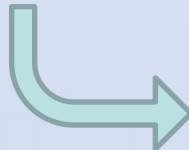
→ En fonction du dosage considéré, un même patient sera soit considéré « normal » ou « pathologique » à partir d'un même prélèvement !

• Inconvénients :

- ✓ Dosage manuel fastidieux (≈ 8 heures)
- ✓ Pré-analytique !
- ✓ Variabilité analytique non-négligeable due aux différentes étapes du dosage
- ✓ Manque de standardisation
- ✓ Pas de Standard International disponible
- ✓ Génération de l'angiotensine I → conditions *in vitro* non physiologiques (pH 6)
- ✓ Certaines pathologies (cirrhose,...) sont associée à de faible niveaux circulants d'angiotensinogène
→ sous-estimation de l'activité rénine
- ✓ En cas de traitement par oestradiol, les taux d'angiotensinogène augmentent
→ surestimation de l'activité rénine

• Avantages :

- ✓ Evaluation fonctionnelle de la rénine circulante
- ✓ Guidelines de la prise en charge de l'hyperaldostéronisme primaire initialement publiées avec ce dosage

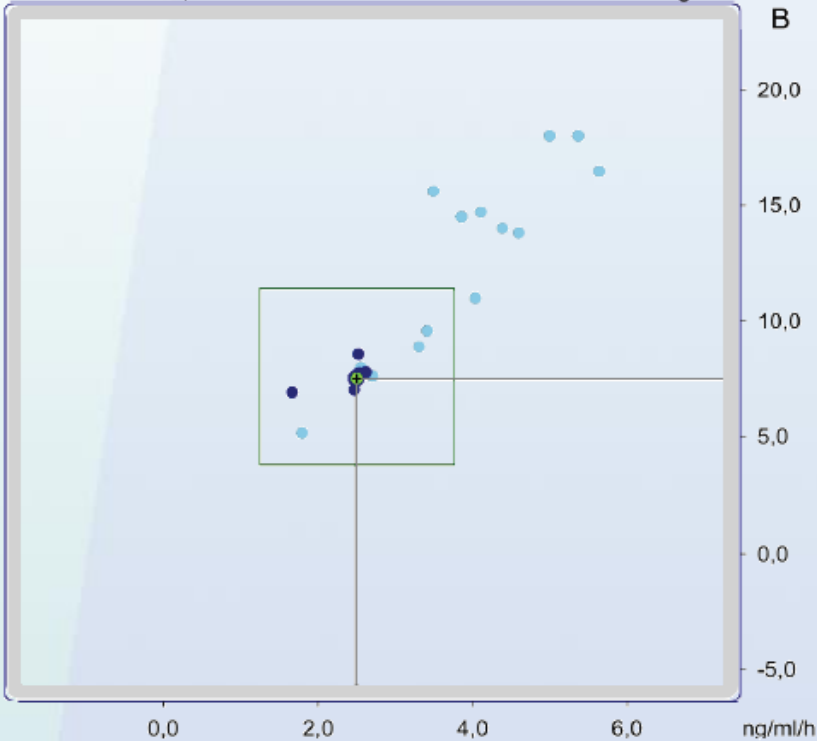


Utilisé en routine suite à une concertation avec les différents cliniciens concernés (endocrinologues, néphrologues, chirurgiens des glandes endocrines)

Analyte **Renin-activity**
 Method all methods

success rate 95,4 %

out of range 0



A

No of participants	22	
sample/unit	A	B
mean	3.35	10.7
standard deviation	1.14	4.06
coefficient of variation	34.0	37.9

Sample A [ng/ml/h]

M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle		22	1.67	2.48	3.01	4.73	5.64
1	13	2	3.31		3.36		3.42
1	77	8	1.67	2.02	2.51	2.58	2.62
DiaSo2		3	3.50		4.11		5.00
1	99	5	3.86		4.39		5.37

B

Sample B [ng/ml/h]

M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle		22	5.15	7.34	8.72	15.9	18.0
1	13	2	8.88		9.22		9.57
1	77	8	6.91	6.95	7.55	8.22	8.56
DiaSo2		3	14.7		15.6		18.0
1	99	5	11.0		14.0		18.0

The deviation of your results from the median of the corresponding sub-collective (kit) is:
 A -0.36 %
 B -0.60 %

Other kits (number):
 1-09(1), 1-75(1), 1-79(1), 1-111(1),

Rénine Directe

• Pré-Analytique

• Type d'échantillon

- Plasma EDTA uniquement ⚠

NB : Si hémolyse importante → demande d'un nouveau prélèvement

• Traitement de l'échantillon

- Traiter le prélèvement à température ambiante
- Séparer le plasma des cellules directement après centrifugation

• Conservation de l'échantillon

- Congeler sous forme d'aliquote pouvant être congelés instantanément
- Eviter les cycles de congélation/décongélation répétés
- Une fois les échantillons dégelés, les doser rapidement

Position couchée : > **2 heures** avant prélèvement !

Position debout : > **1 heure** d'activité debout avant prélèvement !

Orthostatisme

→ 2 à 3 x valeurs en position couchée

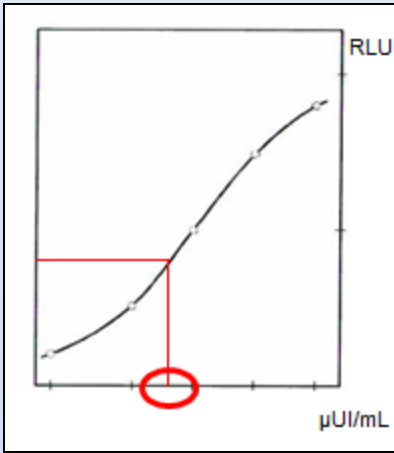
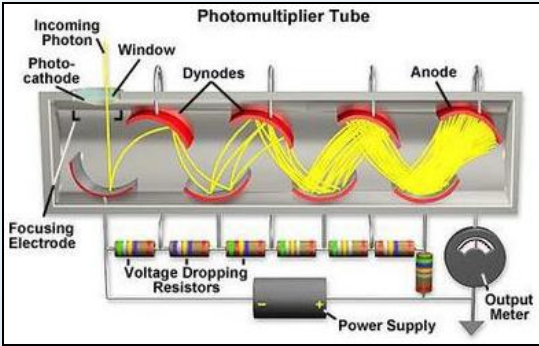
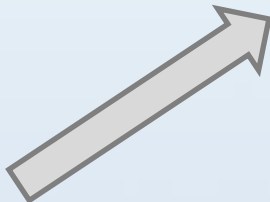
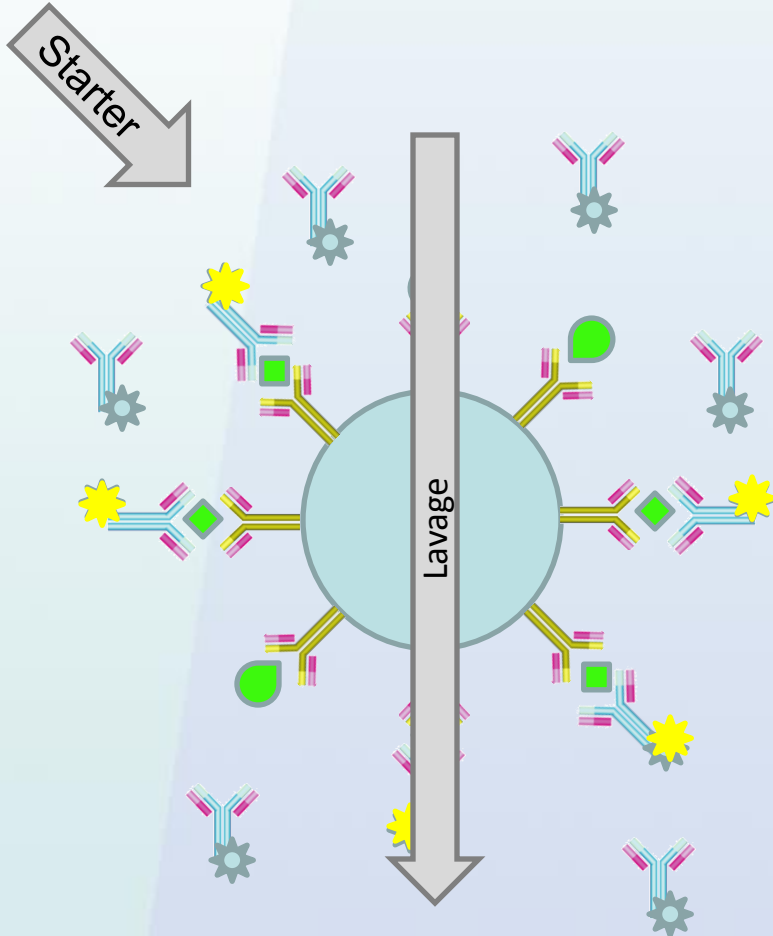


But : prorénine ~~cryoactivation~~ → rénine

- **Analytique**
 - **Manuel**
 - RENINE (Cisbio)
 - **Analyseur**
 - Liaison, Liaison XL (DiaSorin)
 - iSYS (ImmunoDiagnostic System)

Dosage de la rénine directe

- ◆ Rénine
- Prorénine



- Inconvénients :

- ✓ Pré-analytique !

- ✓ Valeur pas prise en compte initialement dans les guidelines initiales de la prise en charge de l'hyperaldostéronisme primaire...

- Avantages :

- ✓ Méthode automatisée (< 1 heure)

- ✓ Random Access

- ✓ Indépendant des conditions de pH, de la production d'angiotensine I,...

- ✓ Performances analytiques élevées

- ✓ Reproductibilité inter-laboratoire

- ✓ WHO International Standard (code : 68/356)

• Inconvénients :

✓ Pré-analytique !

✓ Valeur pas prise en compte **initialement** dans les guidelines de la prise en charge de l'hyperaldostéronisme primaire...

TABLE 5. ARR cut-off values, depending on assay and based on whether PAC, PRA, and DRC are measured in conventional or SI units

Aldostérone/ Activité rénine (ng/L) (ng/mL/h)	PRA (measured in ng/mL/h)	PRA (measured in pmol/L/min)	DRC ^a (measured in mU/L)	DRC ^a (measured in ng/L)
PAC (as ng/dL)	20	1.6	2.4	3.8
	30^b	2.5	3.7	5.7
	40	3.1	4.9	7.7
PAC (as pmol/L)	750^b	60	91	144
	1000	80	122	192

ARR, Aldosterone-renin ratio; PAC, plasma aldosterone concentration; PRA, plasma renin activity; DRC, direct renin concentration; SI, Système International.
a Values shown are on the basis of a conversion factor of PRA (ng/mL/h) to DRC (mU/L) of 8.2. DRC assays are still in evolution, and in a recently introduced and already commonly used automated DRC assay, the conversion factor is 12 (see text).

b The most commonly adopted cut-off values are shown in bold: 30 for PAC and PRA in conventional units (equivalent to 830 when PAC is in SI units) and 750 when PAC is expressed in SI units (equivalent to 27 in conventional units).

Facteur de conversion suivant :
1 ng/mL/h → 8.2 mU/L



Valable pour les techniques de dosage suivantes :

Nichols Institute Diagnostics ECLIA
Bio-Rad Renin II RIA

Aldostérone/**Rénine directe**
(ng/L) (mU/L)

⚠ LIAISON® Direct Renin : facteur de conversion = 1 ng/mL/h → 12 mU/L → Cut-off = >2,5

↳ **Variabilité des cut-off en fonction des techniques et des études ...**

ALDOSTERONE

- **Pré-analytique**

- Type d'échantillon :

- ✓ Serum
 - ✓ Plasma EDTA
 - ✓ Urine de 24 heures

Position couchée : **> 2 heures** avant prélèvement !

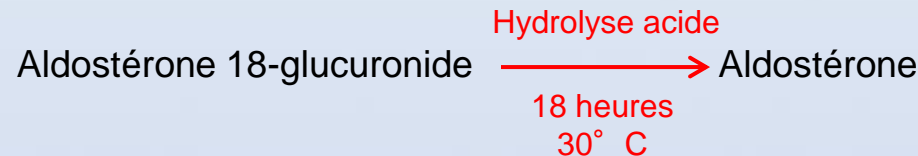
Position debout : **> 1 heure** d'activité debout avant prélèvement !

Orthostatisme

→ 2 à 3 x valeurs en position couchée



- **Dosage urinaire** : Préparation de l'échantillon



- **Dosage sérique/plasmatique** : importance de la position du patient lors du prélèvement

- Analytique

- Immunoassays

- Manuels :

- ALDOCTK-2 (DiaSorin)
 - Aldosterone Coat-A-Count (Siemens)
 - ALDO-RIACT (Cisbio)



RIA

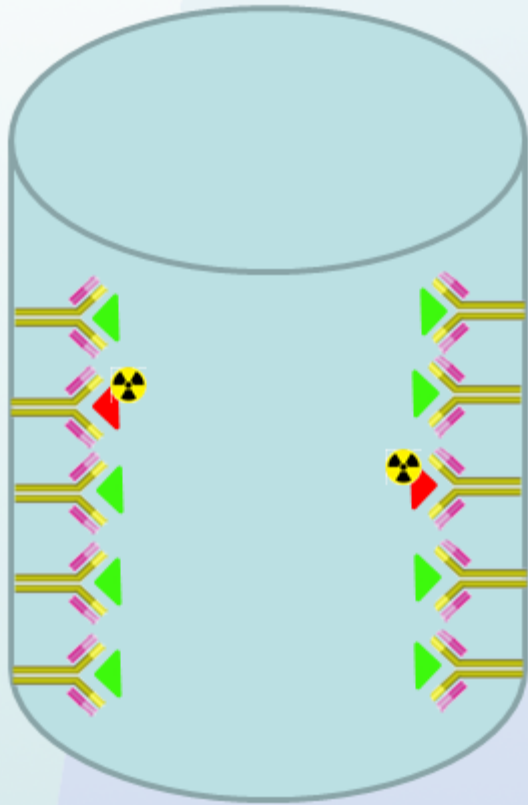
- Analyseurs :

- Liaison, Liaison XL (DiaSorin)
 - iSYS (ImmunoDiagnostic System)

- LC-MS/MS (home-made)

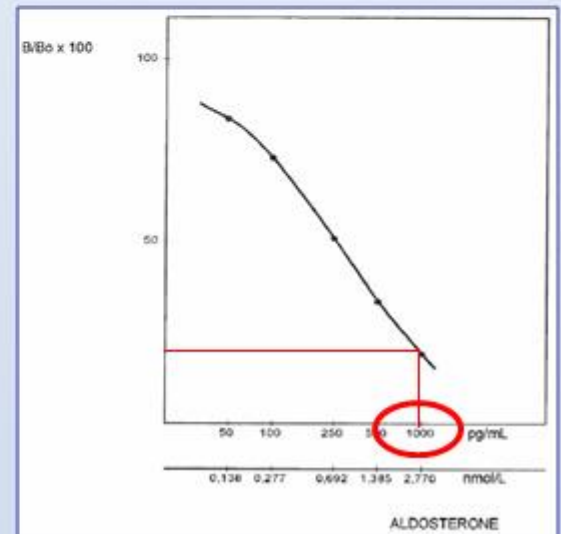


-  Aldostérone
-  Aldostérone marquée



Dosage par
COMPETITION

Echantillon
(Aldostérone marquée)



- ✓ Performances analytiques faibles dans les valeurs basses pour certaines trouses

Rappel :

Screening hyperaldostéronisme primaire :

- Rapport aldostérone/PRA > 30 confirmé sur un second prélèvement

Test de confirmation (test de freinage de la sécrétion d'aldostérone) :

- Oral Sodium loading test
- Saline infusion test
- Fludrocortisone suppression test
- Captopril challenge test

Exemple : Perfusion intraveineuse de 500 ml/h de serum salé normal pendant 4 heures

- ↑ volume liquide extracellulaire
- ↓ rénine plasmatique circulante
- ↓ sécrétion/excrétion d'aldostérone

Réponse normale :

aldostérone < 50 ng/L

Hyperaldostéronisme probable :

aldostérone > 100 ng/L

- ✓ Performances analytiques faibles dans les valeurs basses pour certaines trousse

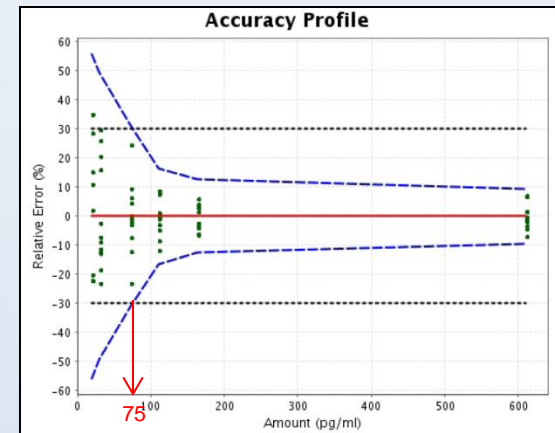
Exemple 1 : LoQ ALDOCTK-2 (RIA) = 75 ng/L



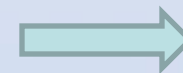
Résultats rendus < 75 ng/L ...



Freinage effectif ?

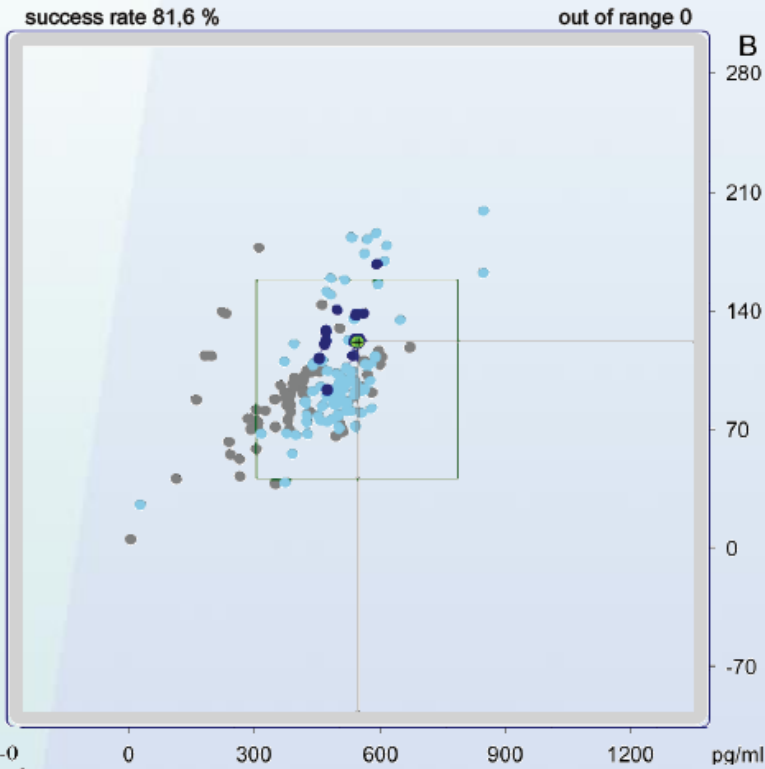


Exemple 2 : LoQ Liaison[®] ALDOSTERONE (Liaison XL) = 31 ng/L



LC-MS/MS ?

Analyte **Aldosterone**
Method all methods



No of participants	158	
sample/unit	A	B
mean	458	99.2
standard deviation	122	32.1
coefficient of variation	26.6	32.4

Sample A (RMW = 545 pg/ml)

M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle		158	3.26	366	474	559	848
1	44	55	26.2	441	504	542	587
1	77	12	457	468	488	559	592
1	99	5	463		570		848
1	111	13	374	414	533	615	848
2	35	7	305		350		462
2	41	10	113	149	254	314	326
4	23	10	495	502	546	599	604
4	77	25	3.26	375	417	447	505
10	99	3	580		601		671

Sample B (RMW = 99.3 pg/ml)

M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle		158	4.43	73.3	93.6	128	199
1	44	55	25.0	75.8	90.3	102	121
1	77	12	93.4	112	125	140	167
1	99	5	82.0		110		199
1	111	13	38.2	123	158	177	183
2	35	7	69.4		80.0		143
2	41	10	40.1	41.2	65.7	128	177
4	23	10	65.2	67.3	92.0	114	116
4	77	25	4.43	84.7	95.4	105	129
10	99	3	91.0		108		118

The deviation of your results from the median of the corresponding sub-collective (kit) is:
A 12 %
B -2.33 %

Other kits (number):
1-09(1), 1-40(2), 1-68(1), 1-75(1), 1-76(1), 1-143(1), 2-99(2), 2-104(1), 2-111(1), 2-151(1), 2-154(1), 3-77(1), 10-91(1), 11-99(2),

NB : Pas de Standard International disponible!



Valeurs de référence

• Aldostérone

Sujets normo-sodés

Population normale
Apport sodique de 100-150 mEq/24 heures

Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence

92 sujets en apparence bonne santé de 18 à 65 ans
PA et glycémie à jeun N
Régime alimentaire restreint contrôlé
Pas de grossesse, allaitement, pilule contraceptive
Plasma EDTA – 30 min debout/assis

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeur attendues pour la population prise en compte

	Tietz NW, 1995		ALDOCTK-2 (RIA; Diasorin)	Liaison® ALDOSTERONE (Liaison; Diasorin)	IDS-iSYS Aldostérone (iSYS; IDS)
Aldostérone Couché	30 – 160 ng/L		7,5 – 150 ng/L	19,7 – 260 ng/L	37 – 310 ng/L
Aldostérone Debout	70 – 300 ng/L		35 – 300 ng/L	25,6 – 445 ng/L	37 – 432 ng/L
Aldostérone Urinaire	Natriurie (mmol/24h)	Aldostérone (µg/24h)	2,8 – 30 µg/24h	1340 – 12490 ng/L	
	<20	35 – 80			
	50	13 – 33			
	100	5 – 24			
	150	3 – 19			
	200	1 – 16			

243 sujets de 18 à 65 ans
PA N et IMC N
30 min debout/assis

Chaque laboratoire devra déterminer ses propres valeurs normales. L'intervalle suivant a été déterminé à l'aide du dosage IDS-iSYS Aldostérone et est fourni uniquement à titre d'information.

Diurèse?

• Aldostérone

Les valeurs de références utilisées en routine (Tietz NW, 1995) sont valables pour un régime normo-sodé (= 100 à 150 mmol Na/jour !)

Régime hypo-sodé → 3 à 5 x les valeurs rencontrées en cas de régime normo-sodé !

Eur J Clin Nutr. 2010 Nov;64(11):1260-5. doi: 10.1038/ejcn.2010.148. Epub 2010 Aug 18.

Estimate of total salt intake in two regions of Belgium through analysis of sodium in 24-h urine samples.

Vandevivere S, De Keuzer W, Chapelle JP, Jeanne D, Mouillet G, Huybrechts J, Hulshof P, Van Oyen H.

Unit of Epidemiology, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium. stefanie.vandevivere@iph.fgov.be

Intake of sodium :

- in Flanders (n=114) was 186,5 ± 56,1 mmol/day
- in Walloon region (n=135) was 171,3 ± 62,6 mmol/day.

In both regions, sodium intake in men was higher than in women.



Population générale ne répond pas au critère de régime normo-sodé ...

• Rénine Activité

- Couché : 0,20 – 2,80 ng/mL/h
- Debout : 1,50 – 5,70 ng/mL/h

• Rénine Directe

- Couché : 2,8 – 39,9 μ UI/mL
- Debout : 4,4 – 46,1 μ UI/mL

• Ratio Aldostérone/Activité Rénine

- ratio < 30

Population normale
Apport sodique de 100-150 mEq/24 heures

Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence

(Valeurs DiaSorin)

(Valeurs DiaSorin)

89 sujets en apparente bonne santé de 18 à 65 ans
PA et glycémie à jeun N
Régime alimentaire restreint contrôlé
Pas de grossesse, allaitement, pilule contraceptive
Plasma EDTA

(Valeurs DiaSorin)

(Valeurs DiaSorin)

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeur attendues pour la population prise en compte

(Kaplan NM, Lancet, 2001)

Vu la difficulté d'établir soi-même ses propres valeurs de référence chez des individus en position debout et, surtout, en position couchée, nombreux sont les laboratoires à se tourner :

- soit vers les valeurs des fabricants (**données à titre indicatif !**)
- soit vers celles retrouvées dans la littérature

Faiblesse relative des valeurs de références...



Quid des populations particulières ?
(enfants, pilules contraceptives, ...)



Valeurs fabricant : Protocole de préparation des sujets pas toujours optimaux. Temps passés en position couchée souvent trop faibles par rapport aux recommandations. Patients normo-sodés ?

Valeurs littérature : déterminées au moyen d'une technique donnée et pas forcément transposables à d'autres techniques. Valables pour des populations normosodées.

Projet en cours : établissement de valeurs de référence pour différentes techniques.

Interférences thérapeutiques

Factor	Effect on aldosterone levels	Effect on renin levels	Effect on ARR
Medications			
Beta-adrenergic blockers	↓	↓ ↓	↑ (FP)
Central alpha-2 agonists (e.g., clonidine, alpha-methyl dopa)	↓	↓ ↓	↑ (FP)
NSAIDs	↓	↓ ↓	↑ (FP)
K ⁺ -wasting diuretics	→ ↑	↑ ↑	↓ (FN)
K ⁺ -sparing diuretics	↑	↑ ↑	↓ (FN)
ACE inhibitors	↓	↑ ↑	↓ (FN)
ARBs	↓	↑ ↑	↓ (FN)
Ca ²⁺ blockers (DHPs)	→ ↓	↑	↓ (FN)
Renin inhibitors	↓	↓ ↑ *	↑ (FP)*
			↓ (FN)*
Potassium status			
Hypokalemia	↓	→ ↑	↓ (FN)
Potassium loading	↑	→ ↓	↑ (FP)
Dietary sodium			
Sodium restricted	↑	↑ ↑	↓ (FN)
Sodium loaded	↓	↓ ↓	↑ (FP)
Advancing age			
	↓	↓ ↓	↑ (FP)
Other conditions			
Renal impairment	→	↓	↑ (FP)
PHA-2	→	↓	↑ (FP)
Pregnancy	↑	↑ ↑	↓ (FN)
Renovascular HT	↑	↑ ↑	↓ (FN)
Malignant HT	↑	↑ ↑	↓ (FN)

Médications pouvant impacter le rapport Aldostérone/rénine

NB : Médications ayant peu d'impact sur le résultat du rapport aldostérone/rénine

TABLE 2. Medications that have minimal effects on plasma aldosterone levels and can be used to control hypertension during case finding and confirmatory testing for primary aldosteronism

Drug	Class	Usual dose	Comments
<i>Verapamil slow-release</i>	<i>Non-dihydropyridine antagonist calcium channel</i>	<i>90–120 mg twice daily</i>	<i>Use singly or in combination with the other agents listed in this Table.</i>
<i>Hydralazine</i>	<i>Vasodilator</i>	<i>10–12.5 mg twice daily, increasing as required</i>	<i>Commence verapamil slow-release first to prevent reflex tachycardia. Commencement at low doses reduces risk of side effects (including headaches, flushing, and palpitations).</i>
<i>Prazosin hydrochloride</i>	<i>Alpha-adrenergic blocker</i>	<i>0.5–1 mg two to three times daily, increasing required</i>	<i>Monitor for postural hypotension.</i>
<i>Doxazosin mesylate</i>	<i>Alpha-adrenergic blocker</i>	<i>1–2 mg once daily, increasing as required</i>	<i>Monitor for postural hypotension.</i>
<i>Terazosin hydrochloride</i>	<i>Alpha-adrenergic blocker</i>	<i>1–2 mg once daily, increasing as required</i>	<i>Monitor for postural hypotension.</i>

TABLE 3. Measurement of the aldosterone-renin ratio: a suggested approach

A. Preparation for aldosterone-renin ratio (ARR) measurement: agenda

1. Attempt to correct hypokalemia, after measuring plasma potassium in blood collected slowly with a syringe and needle [preferably not a Vacutainer to minimize the risk of spuriously raising potassium], avoiding fist clenching during collection, waiting at least 5 seconds after tourniquet release (if used) to achieve insertion of needle, and ensuring separation of plasma from cells within 30 minutes of collection.
2. Encourage patient to liberalize (rather than restrict) sodium intake.
3. Withdraw agents that markedly affect the ARR (48) for at least 4 weeks:
 - a. Spironolactone, eplerenone, amiloride, and triamterene
 - b. Potassium-wasting diuretics
 - c. Products derived from liquorice root (e.g., confectionary licorice, chewing tobacco)
4. If the results of ARR off the above agents are not diagnostic, and if hypertension can be controlled with relatively non-interfering medications (**see Table 2**), withdraw other medications that may affect the ARR (48) for at least 2 weeks:
 - a. Beta-adrenergic blockers, central alpha-2 agonists (e.g., clonidine, alpha-methyldopa), nonsteroidal anti-inflammatory drugs
 - b. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, renin inhibitors, dihydropyridine calcium channel antagonists
5. If necessary to maintain hypertension control, commence other antihypertensive medications that have lesser effects on the ARR (e.g., verapamil slow-release, hydralazine [with verapamil slow-release, to avoid reflex tachycardia], prazosin, doxazosin, terazosin; see **Table 2**).
6. Establish oral contraceptive (OC) and hormone replacement therapy (HRT) status, as estrogen-containing medications may lower direct renin concentration (DRC) and cause false positive ARR when DRC (rather than plasma renin activity) is measured. Do not withdraw OC unless confident of alternative effective contraception.

Interprétation des résultats

Facteurs à prendre en compte lors de l'interprétation du rapport aldostérone/rénine

Le rapport aldostérone/rénine est le moyen de screening le plus fiable de l'hyperaldostéronisme :

- ✓ Plus sensible que le dosage du potassium ou de l'aldostérone isolément
- ✓ Plus spécifique que le dosage de la rénine isolément

Comme pour tout autre test de screening, des faux positifs et des faux négatifs peuvent se révéler !

- ✓ Résultat de médicaments particulières
- ✓ Résultat de conditions physiologiques/pathologiques particulières
- ✓ Résultat de conditions non-optimales lors du prélèvement/traitement de l'échantillon

→ En cas de résultats difficiles à interpréter, répéter le test en s'assurant de l'absence de médicaments interférentes et du respect du pré-analytique !

Certains auteurs considèrent un test de screening positif lorsque :

- Rapport aldostérone/rénine > cut-off
- Aldostérone > 150 ng/L

Une approche alternative consiste à ne pas fixer cut-off pour le taux d'aldostérone, tout en reconnaissant que la probabilité de rencontrer un rapport faux positif augmente lorsque le niveau d'activité rénine (ou de rénine directe) est très faible.

→ L'interprétation finale est laissée à la flexibilité de jugement du clinicien !

Facteurs à prendre en compte lors de l'interprétation du rapport aldostérone/rénine

1. Age: in patients aged >65 years, renin can be lowered more than aldosterone by age alone, leading to a raised ARR
2. Time of day, recent diet, posture, and length of time in that posture
- 3 Medications
4. Method of blood collection, including any difficulty doing so
5. Level of potassium
6. Level of creatinine (renal failure can lead to false positive ARR)

Facteurs à prendre en compte lors de l'interprétation des tests de confirmation

Confirmatory test	Procedure	Interpretation	Concerns
Oral sodium loading test	Patients should increase their sodium intake to >200 mmol (~6 g) per day for 3 days, verified by 24-hour urine sodium content. Patients should receive adequate slow-release potassium chloride supplementation to maintain plasma potassium in the normal range. Urinary aldosterone is measured in the 24-hour urine collection from the morning of day 3 to the morning of day 4.	PA is unlikely if urinary aldosterone is lower than 10 mcg/24-hr (27.7 nmol/day) in the absence of renal disease where PA may co-exist with lower measured urinary aldosterone levels. Elevated urinary aldosterone excretion (>12 mcg/24-hr [>33.3 nmol/d] at the Mayo Clinic, >14 mcg/24-hr (38.8 nmol/d) at the Cleveland Clinic) makes PA highly likely.	This test should not be performed in patients with severe uncontrolled hypertension, renal insufficiency, cardiac insufficiency, cardiac arrhythmia, or severe hypokalemia. 24-hour urine collection may be inconvenient. Laboratory-specific poor performance of the radio-immunoassay for urinary aldosterone (aldosterone 18-oxo-glucuronide or acid-labile metabolite) may blunt diagnostic accuracy—a problem obviated by the currently available HPLC-tandem mass spectrometry methodology (52). Aldosterone 18-oxo-glucuronide is a renal metabolite, and its excretion may not rise in patients with renal disease.
Saline infusion test	Patients stay in the recumbent position for at least 1 hour before and during the infusion of 2 liters of 0.9% saline i.v. over 4 hours, starting at 8:00–9:30 a.m. Blood samples for renin, aldosterone, cortisol, and plasma potassium are drawn at time zero and after 4 hours, with blood pressure and heart rate monitored throughout the test.	Post-infusion plasma aldosterone levels <5 ng/dL make the diagnosis of PA unlikely, and levels >10 ng/dL are a very probable sign of PA. Values between 5 and 10 ng/dL are indeterminate (57–60).	This test should not be performed in patients with severe uncontrolled hypertension, renal insufficiency, cardiac insufficiency, cardiac arrhythmia, or severe hypokalemia.

Confirmatory test	Procedure	Interpretation	Concerns
Fludrocortisone suppression test	Patients receive 0.1 mg oral fludrocortisone every 6 hours for 4 days, together with slow-release KCl supplements (every 6 hours at doses sufficient to keep plasma K ⁺ , measured 4 times a day, close to 4.0 mmol/L), slow-release NaCl supplements (30 mmol three times daily with meals) and sufficient dietary salt to maintain a urinary sodium excretion rate of at least 3 mmol/kg body weight. On day 4, plasma aldosterone and PRA are measured at 10 a.m. with the patient in the seated posture, and plasma cortisol is measured at 7 a.m. and 10 a.m.	Upright plasma aldosterone >6 ng/dL on day 4 at 10 a.m. confirms PA, provided PRA is <1 ng/mL/h and plasma cortisol concentration is lower than the value obtained at 7 a.m. (to exclude a confounding ACTH effect) (42, 43, 56, 61–63).	While some centers (10, 16) conduct this test in the outpatient setting (provided that patients are able to attend frequently to monitor their potassium), in other centers several days of hospitalization are customary. Most of the data available come from the Brisbane group (42, 43, 56, 61–63) who have established, on the basis of a very large series of patients, a cut-off of a plasma aldosterone concentration of 6 ng/dL at 10 a.m. in an ambulatory patient on day 4. Proponents of the FST argue that (1) it is the most sensitive for confirming PA, (2) it is a less intrusive method of sodium loading than SIT and therefore less likely to provoke non-renin-dependent alterations of aldosterone levels, (3) it allows for the potentially confounding effects of potassium to be controlled, and for ACTH (via cortisol) to be monitored and detected, and (4) it is safe when performed by experienced hands.
Captopril challenge test	Patients receive 25–50 mg of captopril orally after sitting or standing for at least 1 hour. Blood samples are drawn for measurement of PRA, plasma aldosterone, and cortisol at time zero and at 1 or 2 hours after challenge, with the patient remaining seated during this period.	Plasma aldosterone is normally suppressed by captopril (>30%). In patients with PA it remains elevated and PRA remains suppressed. Differences may be seen between patients with APA and those with IHA, in that some decrease of aldosterone levels is occasionally seen in IHA (23, 64–66).	There are reports of a substantial number of false negative or equivocal results (67, 68).

Perspectives à court-terme ?

Dosages automatisés

- Dosage sur automates :
 - Performances analytiques +++
 - Meilleure standardisation



A évaluer avec un peu plus de recul

LC-MS/MS

- Pourquoi passer ces analyses en LC-MS/MS ?

- Alternative au RIA
- Sensibilité et Spécificité +++
- Prélèvements très concentrés (aldostérone dans certains prélèvement de cathétérisme surrénalien)

Aldo : jusqu'à 40.000 ng/L dans la veine surrénalienne considérée après Synacthen !



Nécessitent une **dilution +++**

- Modification très importante de la matrice de l'échantillon (protéines, autres constituants du sérum, viscosité,...)
- Impact sur le dosage par immunoassay
- Pas d'impact sur l'analyse LC-MS/MS

- Quels dosages passer en LC-MS/MS ?
 - Aldostérone

Determination of serum aldosterone by liquid chromatography and tandem mass spectrometry: a liquid–liquid extraction method for the ABSCIEX API-5000 mass spectrometry system

Jessica Grace Van Der Gugten,¹ Joshua Dubland,¹ Hua-Fen Liu,² Alex Wang,² Christine Joseph,¹ Daniel T Holmes^{1,3}

[J Clin Pathol](#). 2012 May;65(5):457-62.

- Activité Rénine

Development and validation of an ultra-sensitive method for the measurement of plasma renin activity in human plasma via LC-MS/MS

Derek L Chappell¹, Thomas McAvoy², Barbra Weiss¹, Russell Weiner¹ & Omar F Laterza^{*1}

[Bioanalysis](#). 2012 Dec;4(23):2843-50. doi: 10.4155/bio.12.268.

- MAIS ...
 - Pas de standards internationaux
 - Pas de standardisation des techniques (home-made!)
 - Reproductibilité inter-laboratoire ...

Conclusions

Take home messages ...

- Importance du pré-analytique +++
(posture, moment de la journée, médicaments, traitement de l'échantillon)
- Faiblesse des valeurs de référence... (patients normo-sodés ?, etc...)
- Test de screening le plus fiable = rapport aldostérone/rénine
MAIS FP et FN possibles
 - Médications particulières
 - Conditions physiologiques/pathologiques particulières
 - Conditions non-optimales lors du prélèvement
 - Conditions non-optimales lors du traitement de l'échantillon→ Interprétation finale laissée au jugement du clinicien !
- Performances analytiques moyennes de certaines troussees...
→ Avenir = Standardisation, automatisation, LC-MS/MS ?



Merci pour votre attention