

CAHIER DE

# Formation

Biologie médicale

N° 02

mai 95

**IMMUNOANALYSE :**

**HORMONES.**

**MARQUEURS TUMORAUX**

BIOFORMA

CAHIER DE

# Formation

## Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.  
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle ( étudiant, interne, biologiste de labm ) est permise.



*Le présent fascicule concerne la onzième opération de Contrôle Nationale en immunoanalyse, organisée en juin 1994 sous l'autorité de l'Agence du Médicament par convention avec Bioforma.*

*A l'orée d'une période au cours de laquelle des modifications dans l'organisation du Contrôle National vont intervenir, il nous a paru intéressant, dans un premier chapitre, de faire le bilan et de soumettre quelques réflexions sur plus d'une décennie de fonctionnement dans le domaine de l'immunoanalyse.*

*L'apparition dans les laboratoires de nouvelles techniques nécessite, de la part des biologistes, une période de familiarisation avec les difficultés analytiques ou l'interprétation. C'est pourquoi, on trouvera ensuite un rappel sur les critères qui permettent d'apprécier la qualité d'un immunodosage et une mise au point générale sur les pièges et problèmes rencontrés dans ce domaine de la biologie, de l'étape préanalytique au rendu du résultat en passant par le marqueur et la mesure du signal en immunoanalyse.*

*Le dernier chapitre comporte l'état de l'art des pratiques biologiques en France et l'état des connaissances sur certains analytes dont le dosage présente des évolutions techniques et/ou pose des problèmes de standardisation. Nous avons choisi d'évoquer dans ce numéro deux marqueurs tumoraux, l'antigène carbohydrate 19-9 (CA 19-9) et l'antigène spécifique de la prostate (PSA), et deux hormones glycoprotéiques, l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) et l'hormone thyroïdienne (TSH).*

## LISTE DES AUTEURS

---

- Professeur René BADOR  
Professeur des Universités  
Laboratoire de Biophysique  
Faculté de Pharmacie – Université Claude Bernard Lyon I  
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON CEDEX 08
  
- Mademoiselle Andrée BEAUDONNET  
Praticien Hospitalier  
Laboratoire de Biologie  
Hôpital de l'Hôtel Dieu – Hôpitaux de Lyon  
1, place de l'Hôpital – 69288 LYON CEDEX 02
  
- Madame Marie-Claude PATRICOT  
Praticien Hospitalier  
Laboratoire d'Hormonologie  
Centre Hospitalier Lyon Sud – Hôpitaux de Lyon  
69310 PIERRE-BENITE
  
- Monsieur Richard COHEN  
Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier  
Laboratoire de Biophysique – Faculté de Pharmacie  
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON CEDEX 08  
Service de Radiopharmacie et Radioanalyse – Hôpital Neuro-Cardiologique  
59, boulevard Pinel – 69394 LYON CEDEX 03
  
- Mademoiselle Anne-Claude RENARD  
Pharmacien  
PROBIOQUAL  
281 C, cours Emile Zola – BP 4016 – 69615 VILLEURBANNE CEDEX

# LE CONTRÔLE DE QUALITE NATIONAL EN IMMUNOANALYSE

## Réflexions après onze années de fonctionnement

R. COHEN, A. BEAUDONNET, A.C. RENARD

L'utilisation de l'immunoanalyse en routine remonte au début des années 1970. Il s'agissait alors de dosages utilisant des radioisotopes, pratiqués par un petit nombre de laboratoires spécialisés en raison de la législation française relative à la détention et à la manipulation des produits radioactifs. Actuellement les laboratoires autorisés à pratiquer ce type de dosages sont au nombre de cent vingt à cent cinquante et se caractérisant encore par des méthodes qui se prêtent mal à une automatisation complète. Très rapidement, les biologistes concernés ont ressenti le besoin d'une évaluation externe de la qualité. C'est pourquoi, dès 1977, un tel programme leur a été proposé dans le cadre d'une association régie par la loi de 1901 et gérée par les biologistes bénévoles : le centre lyonnais d'études pour la PROMotion de la BIOlogie et du contrôle de QUALité (PROBIOQUAL). Une grande majorité (80 à 90%) d'entre eux y adhère de manière volontaire depuis cette époque.

Les techniques d'immunoanalyse avec marqueur non radioactif sont apparues au début des années 1980 sous forme de trousse de réactifs prêts à l'emploi, utilisées d'abord manuellement puis sur automates. La nomenclature des actes de biologie médicale a fait l'objet des modifications nécessaires en avril 1985 et une large diffusion de l'immunoanalyse à tous les laboratoires publics ou privés français en a résulté.

Le laboratoire National de la Santé, devenu depuis un service de l'Agence du Médicament, a alors décidé de mettre en œuvre, en "hormonologie" plasmatique », un contrôle de qualité externe semblable à celui qui fonctionnait déjà dans d'autres secteurs de la biologie médicale. L'exécution technique en a été confiée, par arrêté ministériel du 1<sup>er</sup> février 1983, renouvelé le 23 novembre 1988, à l'association PROBIOQUAL en raison de l'expérience qu'elle avait acquise dans ce domaine depuis plusieurs années. Les lignes qui suivent sont consacrées à la description des caractéristiques, aux problèmes rencontrés et au bilan du contrôle de qualité obligatoire en "hormonologie plasmatique", instauré en 1984.

### I. CARACTERISTIQUES DE L'ECHANTILLON STATISTIQUE DE PARTICIPANTS

---

Tout d'abord, comme le montre le **tableau I** des Annales du Contrôle National de Qualité, (n° 2, Avril 1995), l'augmentation du nombre de participants a été considérable pendant les onze années de fonctionnement de ce contrôle : on est passé d'un peu moins de cinq cents laboratoires en 1984 à près de quatre mille laboratoires en 1994, ce qui est voisin de la participation aux opérations de contrôle national menées en biochimie, hématologie, bactériologie-virologie ou parasitologie. La stabilisation notée au cours des trois ou quatre dernières années semble indiquer que le maximum est atteint.

Si l'on excepte les années de mise en place, l'assiduité des participants, traduite par le pourcentage de réponses, oscille entre 80% et 87%. La diminution observée en 1994, résulte des laboratoires travaillant dans le cadre de groupements : selon nos indications, en effet, seuls les laboratoires réalisant effectivement les dosages devaient faire parvenir les valeurs trouvées. De plus, pour interpréter les données concernant l'assiduité des participants, il est nécessaire d'avoir à l'esprit que les analyses effectuées par chaque laboratoire et, par conséquent, que la participation à telle ou telle opération de contrôle national sont déterminées à partir d'un questionnaire. Ce dernier, établi et envoyé par l'Agence du Médicament, est rempli périodiquement par les biologistes.

Les analyses soumises au contrôle ont évolué parallèlement à l'apparition sur le marché français des trousse correspondantes et à leur introduction à la nomenclature des actes de biologie médicale. Actuellement, l'immunoanalyse permet de réaliser le dosage de vingt à vingt-cinq analytes relevant non seulement de l'«hormonologie plasmatique» mais aussi de l'oncologie ou de l'allergologie. Parmi les analytes les plus couramment dosés on peut citer : ACE, AFP et PSA pour les marqueurs tumoraux , hCG, FSH, LH, prolactine et

TSH pour les hormones glycoprotéiques, cortisol et estradiol pour les hormones stéroïdiennes, T4 libre pour les hormones thyroïdiennes ainsi que ferritine et IgE totales. En raison du faible nombre de trousse disponibles (**tableau II** des Annales du Contrôle Nationale de Qualité, n° 2, Avril 1995), les dosages de CA 15-3, CA19-9, CA125, B2-microglobuline, progestérone et testostérone sont moins répandus. Enfin dans l'évaluation de la fonction thyroïdienne, la mesure de la forme libre, a en grande partie, remplacé celle de l'hormone totale pour T4. Le dosage de T3 suit une tendance analogue avec un décalage dans le temps.

## ■ II. SCHEMA D'ORGANISATION

---

La non-linéarité de la relation d'étalonnage de la plupart des immunodosages, ainsi que la forme de l'erreur commise sur la mesure du signal en fonction de l'intensité de celui-ci, rendent nécessaire un contrôle à plusieurs niveaux de concentration. C'est pourquoi, au cours des trois premières enquêtes interlaboratoires, trois spécimens de contrôle ont été distribués. Des raisons matérielles liées à l'augmentation importante du volume nécessaire nous ont conduits à proposer par la suite un seul spécimen par opération. En 1994, la collaboration avec Bioforma a permis de proposer deux spécimens à deux niveaux de concentration et de réaliser pour la première fois deux opérations au cours de l'année, l'une en juin et l'autre en décembre. Les prochaines opérations devraient se dérouler à la même fréquence et selon un schéma proche de celui adopté en 1994.

Depuis juin 1994, les participants assurent eux-mêmes le codage de la technique et de l'appareil grâce à la disponibilité de tables de codage développées par la SFBC dont la dernière version a été diffusée par Bioforma. Auparavant, ces indications étaient données en clair et le codage était effectué par nos soins.

## ■ III. PROBLEMES POSES PAR LES SPECIMENS DE CONTROLE

---

Ceux-ci doivent théoriquement être représentatifs des situations physiopathologiques les plus fréquentes. Or les spécimens le plus souvent utilisés pour des raisons pratiques d'organisation, sont des sérums du commerce renfermant un grand nombre d'analytes à des concentrations variables. Au cours de leur préparation, le matériel de départ est surchargé ou au contraire "« privé »" en certains analytes. Signalons, par exemple, que l'obtention de concentrations très basses en TSH est un problème difficile, incomplètement résolu encore par les firmes commerciales spécialisées dans la fabrication de sérums de contrôle pour l'immunoanalyse. De même, l'obtention de concentrations basses en hormones thyroïdiennes totales ou libres nécessite un traitement du matériel de départ susceptible d'introduire des artefacts. Ces conditions vont à l'encontre de l'exigence précédente et les résultats obtenus à partir de tels spécimens risquent de conduire à une interprétation erronée car différente de celle provenant de spécimens de patients.

Les qualités du spécimen de contrôle idéal pour l'immunoanalyse pourraient être résumées de la manière suivante :

- le matériel de départ doit impérativement être du sérum humain,
- en raison de la spécificité des techniques, certains analytes ne peuvent être simultanément présents dans le même spécimen à des concentrations différentes des principales situations physiopathologiques rencontrées (estradiol avec estriol et estrone, digoxine avec digitoxine, hCG avec LH),
- les concentrations des différents analytes doivent être choisies de manière à couvrir les zones critiques du domaine de mesure,
- l'origine des préparations d'analytes purifiés, surtout de nature glycoprotéique, servant à enrichir le matériel de départ joue un rôle primordial. On peut citer, par exemple, la reconnaissance à des degrés divers par les couples d'anticorps présents dans les trousse de prolactine recombinante, d'insuline d'origine animale ou de marqueurs tumoraux obtenus par extraction.

Seule l'expérience acquise dans l'organisation du contrôle de qualité externe permet de reconnaître ces pièges et de soumettre au fabricant un cahier des charges qui permette d'en éviter les principaux.

## ■ IV. EXPLOITATION DES RESULTATS

---

En immunoanalyse, il est particulièrement difficile d'accéder à la connaissance de la valeur vraie d'un analyte dans un spécimen biologique ce qui rend délicate l'appréciation de la justesse des techniques. L'approche retenue en France consiste à utiliser la valeur de consensus c'est-à-dire la valeur obtenue après un traitement statistique correct des résultats fournis par un grand nombre de laboratoires. Ce traitement consiste, dans le cas du contrôle national, en une double troncature, opération dont le but est d'éliminer les valeurs situées à plus de deux écarts types de part et d'autre de la moyenne. La validité de la moyenne générale comme valeur de consensus est d'autant meilleure que les techniques adoptées sont nombreuses et variées. Les conclusions sur la justesse des techniques doivent, par conséquent, prendre en compte la plus ou moins grande contribution à la moyenne générale des valeurs fournies par les différentes trouses.

Une solution à ce problème existe pour les petites molécules telles que les hormones stéroïdiennes puisque la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse peut être considérée comme une méthode de référence. Dans certains pays, tels que l'Allemagne, la valeur fournie par cette méthode est choisie pour cible. Sans aller jusque là, nous avons décidé, dès 1990, d'appliquer cette méthode à tous les spécimens de contrôle distribués en France pour cortisol, estradiol, progestérone et testostérone et d'indiquer les valeurs obtenues aux participants.

En ce qui concerne les molécules de masse molaire plus élevée, telles que les hormones glycoprotéiques ou les marqueurs tumoraux, aucune méthode n'est susceptible, à l'heure actuelle, de fournir une valeur vraie. Par ailleurs, l'hétérogénéité des formes circulantes de ces composés étant un phénomène de mieux en mieux étudié et connu pour être responsable de discordances importantes entre trouses, nous avons choisi de caractériser sur ce plan les spécimens de contrôle. C'est ainsi qu'une chromatographie d'exclusion-diffusion effectuée sur ces spécimens nous permet de renseigner les participants, depuis 1990, sur le pourcentage de trois formes moléculaires de prolactine (monomère, "big prolactin" et "big-big prolactin") et depuis 1994, sur la proportion de formes libres et complexées de PSA.

Le compte-rendu d'une opération de contrôle, calqué sur la biochimie, comporte un message individuel et une présentation de synthèse (les Annales du Contrôle National de Qualité) associée depuis la présente opération à un cahier de formation.

## ■ V. RENSEIGNEMENTS OBTENUS

---

Les objectifs du contrôle de qualité externe sont doubles :

- à court terme, il consiste à estimer les composants systématique et aléatoire de l'erreur entre les laboratoires et les méthodes et à suivre leur évolution au cours du temps,
- à plus long terme, il contribue à l'harmonisation des résultats entre laboratoires par l'amélioration des méthodes c'est-à-dire à la standardisation des dosages. Il permet, alors, au biologiste de s'assurer que les résultats qu'il rend sont conformes à ceux des autres laboratoires utilisant ou non la même méthode. En outre, la conséquence à long terme du contrôle est de faciliter l'interprétation des résultats par le clinicien.

Les principaux enseignements tirés du contrôle national en immunoanalyse remplissent les objectifs fixés plus haut.

En premier lieu, l'exploitation statistique toutes techniques confondues fournit une estimation de la variabilité totale qui dépend du niveau de concentration. Celle-ci comporte deux composantes : l'une, systématique, qui correspond aux écarts entre les valeurs moyennes des différentes trouses et l'autre, aléatoire, qui dépend de la dispersion des valeurs obtenues par les utilisateurs d'une même trousse. L'exploitation statistique par technique permet de déterminer cette dernière. Le coefficient de variation (CV) obtenu est un indice de robustesse de la trousse : un CV faible signifie que les valeurs obtenues restent très proches malgré les différences d'utilisation qui existent d'un laboratoire à l'autre. La série des CV fournis par les principales trouses peut être représentée par la valeur centrale ou CV médian qui indique la reproductibilité atteinte par la moitié des trouses disponibles. Ainsi, en comparant la valeur du CV reflétant la variabilité totale avec celle du CV médian, on dispose d'un moyen

simple pour séparer la part de la dispersion globale des valeurs qui revient aux écarts entre trousseaux de celle qui doit être attribuée à leur robustesse : une grande différence entre les deux CV signe la présence de discordances importantes entre trousseaux. Il existe une méthode statistique, l'analyse de variance avec décomposition de la variance totale, qui permet d'estimer rigoureusement les deux composantes précédentes. Cependant, son application nécessite des hypothèses et un schéma expérimental souvent peu compatibles avec l'organisation pratique du contrôle de qualité externe.

De cette manière, on apprécie l'état de l'art des dosages et on met en évidence ceux dont la standardisation n'est pas satisfaisante comme c'est le cas par exemple, actuellement, des dosages de TSH ou estradiol au niveau des basses concentrations et des dosages de CA 19-9 OU PSA.

L'évolution, au cours du temps, de la qualité est également intéressante à considérer. Une diminution notable de la variabilité des immunodosages est intervenue au tout début des années 1990. Celle-ci coïncide avec la familiarisation des biologistes aux problèmes posés par ce nouveau type de dosages (étalonnage, pièges méthodologiques, interprétation).

Les autres informations utiles, tirées des opérations de contrôle national et difficiles à obtenir par d'autres moyens, concernent la "popularité des trousseaux", c'est-à-dire la connaissance des trousseaux effectivement utilisés dans les laboratoires des participants.

Pour terminer, insistons sur l'un des points forts du contrôle national français qui est envié par les organisateurs du contrôle externe d'autres pays : il s'agit du nombre très important de participants qui permet d'obtenir de bonnes estimations sur l'état de l'art des immunodosages, sur la "popularité" et la qualité des trousseaux même s'il introduit une lourdeur certaine au niveau de l'organisation.



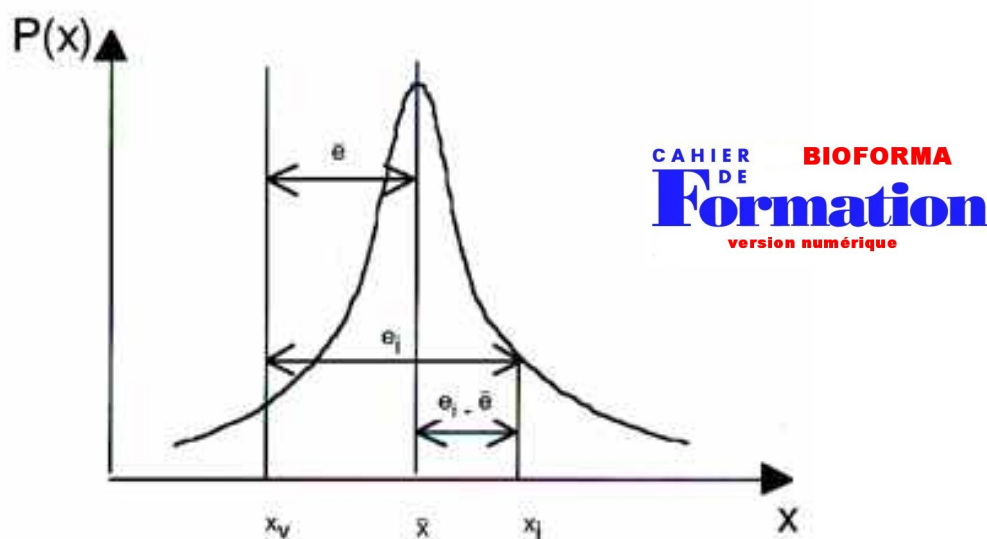
# CRITERES DE QUALITE EN IMMUNOANALYSE

R. COHEN, A.C. RENARD

Les critères de qualité des immunodosages ne sont pas a priori très différents de ceux utilisés dans les autres domaines de la biologie clinique (voir cahier de formation de biochimie). Pourtant la maîtrise de la réaction Ag-Ac et de la mesure du signal pose des problèmes nouveaux : en particulier, les courbes de calibrage (signal en fonction de la concentration) sont loin d'être toujours linéaires. Nous passerons en revue les critères de qualité classiques (précision, limite de détection, justesse, spécificité) en insistant sur leurs particularités lorsqu'ils sont appliqués à l'immunoanalyse. Ce chapitre a pour but de donner les éléments permettant le choix du meilleur réactif. Concrètement à l'heure actuelle, ce choix est lié le plus souvent à celui de l'automate en raison du grand nombre de "systèmes fermés". Toutefois, l'utilisation des réactifs dans les meilleures conditions passe par la compréhension du mécanisme et la connaissance des points critiques d'un immunodosage.

## I. ERREUR DE MESURE

Chaque résultat de mesure est entaché d'une erreur qui s'exprime par la différence entre la valeur trouvée et la valeur "vraie" que l'on cherche à estimer. Cette erreur dite totale peut être décomposée en deux termes : l'erreur systématique et l'erreur aléatoire (**Figure 1**).



**Figure 1** : Densité de probabilité  $P(x)$  des valeurs  $x$  de concentration obtenues au cours d'un dosage. Composantes systématique et aléatoire de l'erreur totale.

- $x_v$  : valeur "vraie" de concentration,
- $x_j$  : valeur obtenue lors de la  $i^{\text{ème}}$  mesure,
- $\bar{x}$  : moyenne des valeurs expérimentales,
- $e_j$  : erreur totale commise dans la  $i^{\text{ème}}$  mesure,
- $e$  : partie non aléatoire de l'erreur totale ou erreur systématique,
- $e_j - \bar{e}$  : erreur aléatoire (fortuite, accidentelle).

## **I.1. Erreur systématique**

Elle représente l'écart toujours de même signe entre un résultat et la valeur "vraie" ou sa meilleure estimation. Suivant le cas, sa grandeur est proportionnelle à la concentration ou, au contraire, indépendante de celle-ci.

On l'apprécie en répétant un grand nombre de fois les mesures et en calculant l'écart entre la moyenne de la distribution des valeurs expérimentales et la valeur "vraie". La principale difficulté pour évaluer l'erreur systématique réside dans la nécessité de connaître la valeur "vraie" d'un composé dans un échantillon biologique déterminé. Or, la plupart du temps, pour les substances concernées par les immunodosages, la valeur "vraie" reste inconnue, excepté pour les petites molécules telles que les hormones stéroïdiennes qui peuvent être dosées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. En règle générale, l'erreur générale, l'erreur systématique dont la cause est le plus souvent identifiable, provient du fait qu'il s'agit de méthodes relatives dans lesquelles le comportement des solutions de calibrage peut être différent de celui des spécimens à doser.

Parmi les paramètres susceptibles d'entraîner une erreur systématique se trouvent principalement : l'étalon qui est en cause à la fois par sa nature, son titre et sa stabilité au cours de la conservation, les anticorps qui sont responsables de la spécificité du système de dosage et la méthode de calcul des résultats. Il faut ajouter un certain nombre de facteurs, qualifiés de non spécifiques, tels que :

- le pH ou la présence de composés susceptibles de modifier la réaction Ag-Ac (anticoagulants, hémoglobine, etc.),
- la destruction de l'analyte au cours des étapes précédant le dosage (prélèvement, transport, centrifugation, décantation, etc.),
- la liaison de l'antigène marqué aux parois des tubes, à des protéines de transport naturelles ou à d'éventuels anticorps circulants consécutifs à une auto-immunisation ou à une thérapeutique comme, par exemple, chez les diabétiques traités à l'insuline.

## **I.2. Erreur aléatoire**

Elle représente l'écart, de signe et de grandeur imprévisibles, entre un résultat et la valeur "vraie" ou sa meilleure estimation.

L'erreur aléatoire présente plusieurs caractéristiques. Elle suit généralement une distribution normale de moyenne nulle car les erreurs sont nombreuses et du même ordre de grandeur. Elle est quantifiée par l'écart type de cette distribution. Elle dépend étroitement de la concentration : en effet, dans le cas des immunodosages l'écart type augmente avec celle-ci.

Il existe, en immunoanalyse, de nombreux facteurs qui sont susceptibles d'introduire une erreur aléatoire. Certains ont un effet prépondérant sur l'erreur de mesure du signal : opération de distribution des volumes de spécimens à doser ou de réactifs, méthode de séparation car la séparation des formes libre et liée peut être plus ou moins complète d'un tube à l'autre et erreurs de mesure du signal. On sait, pour un signal radioactif par exemple, que le phénomène de désintégration nucléaire est lui-même aléatoire.

D'autres facteurs agissent principalement sur la pente de la courbe d'étalonnage tels que, par exemple dans le cas des méthodes par défaut d'anticorps, la dilution de l'anticorps, la pureté ou la masse de l'antigène marqué et les conditions d'incubation.

## II. NIVEAUX D'ERREUR DANS UN IMMUNODOSAGE

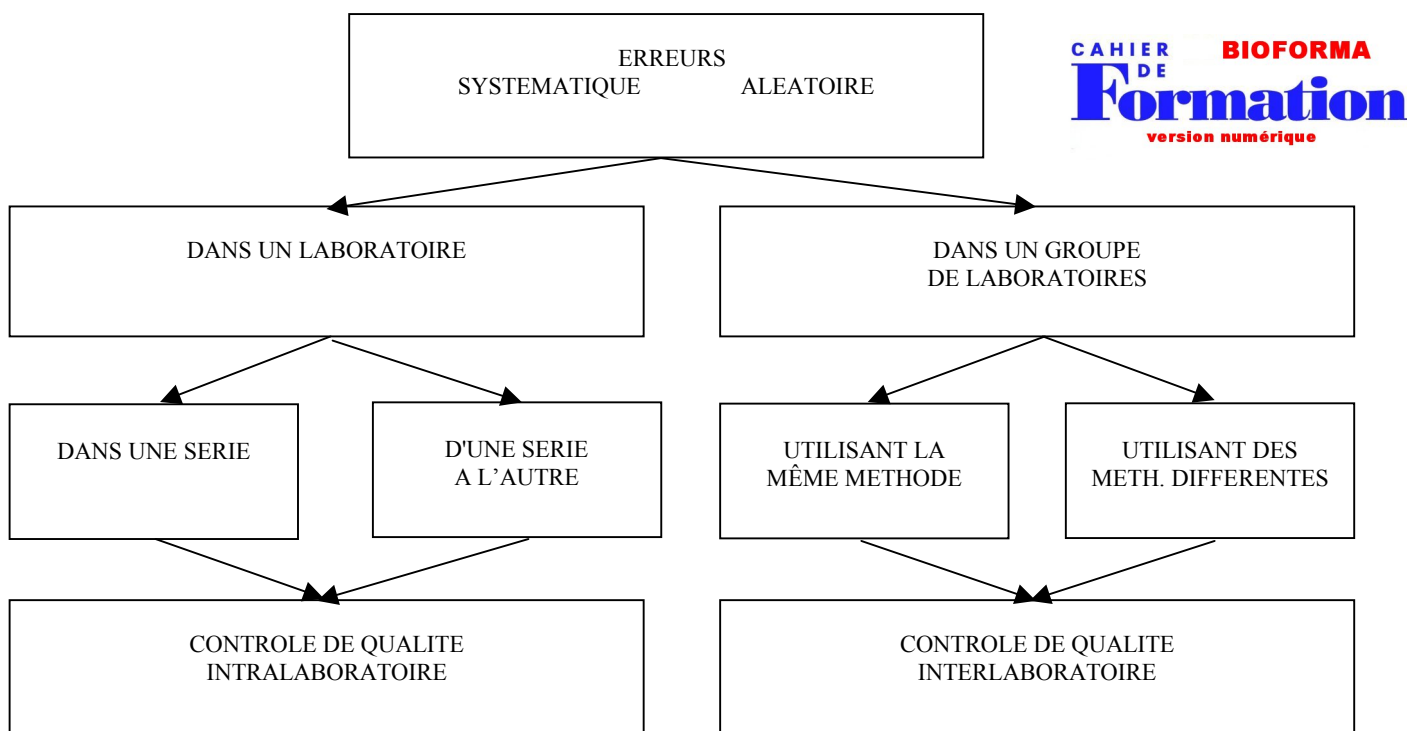


Figure 2 : Niveaux d'erreur dans un immunodosage

La **Figure 2** représente les différents niveaux d'erreur et le domaine d'application du contrôle de qualité intra- ou inter-laboratoire. Les principales erreurs surviennent à différents niveaux qui sont, par ordre croissant d'importance : la série de dosages, le laboratoire effectuant plusieurs séries dans le temps, le groupe de laboratoires utilisant la même technique et enfin le groupe de laboratoires utilisant des techniques différentes.

On comprend bien que les erreurs soient peu importantes au sein d'une série de dosages dans laquelle les conditions sont strictement contrôlées (réactifs, opérateur, temps d'incubation identiques). En revanche, au cours du temps les réactifs évoluent, le manipulateur peut changer ce qui augmente la dispersion des résultats rendus par un laboratoire. Lorsque le patient se déplace et que le clinicien se trouve face à des résultats provenant de laboratoires différents mais utilisant la même technique, ce sont alors l'expérience et l'équipement du laboratoire qui interviennent. Enfin, lorsque les résultats sont obtenus par des laboratoires qui ont adopté des techniques différentes, la variabilité est, en grande partie, liée aux caractéristiques des réactifs notamment de l'étalon et des anticorps.

En résumé, il existe une hiérarchie des erreurs. A chaque niveau, se retrouvent à la fois erreurs aléatoires et systématiques qui en se combinant concourent, toute deux, à la variabilité c'est-à-dire à l'erreur aléatoire du niveau supérieur.

## III. DEFINITION DES CRITERES DE QUALITE

### III.1. Précision

Elle est définie comme la qualité de l'accord, dans une zone définie de concentration, entre des mesures répétées, effectuées dans des conditions déterminées.

On l'exprime habituellement par l'écart type ou le coefficient de variation (écart type divisé par la moyenne) de la distribution des valeurs expérimentales de concentration obtenues lors de la répétition des mesures sur le même

spécimen. La précision est d'autant meilleure que l'erreur aléatoire est faible. Elle est fonction de deux paramètres : l'erreur (représentée par l'écart type) faite sur la mesure du signal et la pente de la courbe de calibrage. De plus, sa définition sous-entend qu'elle dépend de la concentration à mesurer, phénomène particulièrement vrai dans le domaine des immunodosages, et des conditions de répétition des mesures. C'est pourquoi, on est amené à affiner cette notion et à proposer différentes expressions pour la précision. On parle de répétabilité, de reproductibilité intra- ou inter-laboratoire lorsque la répétition des mesures est effectuée respectivement dans la même série de dosage, dans le même laboratoire ou entre laboratoires différents.

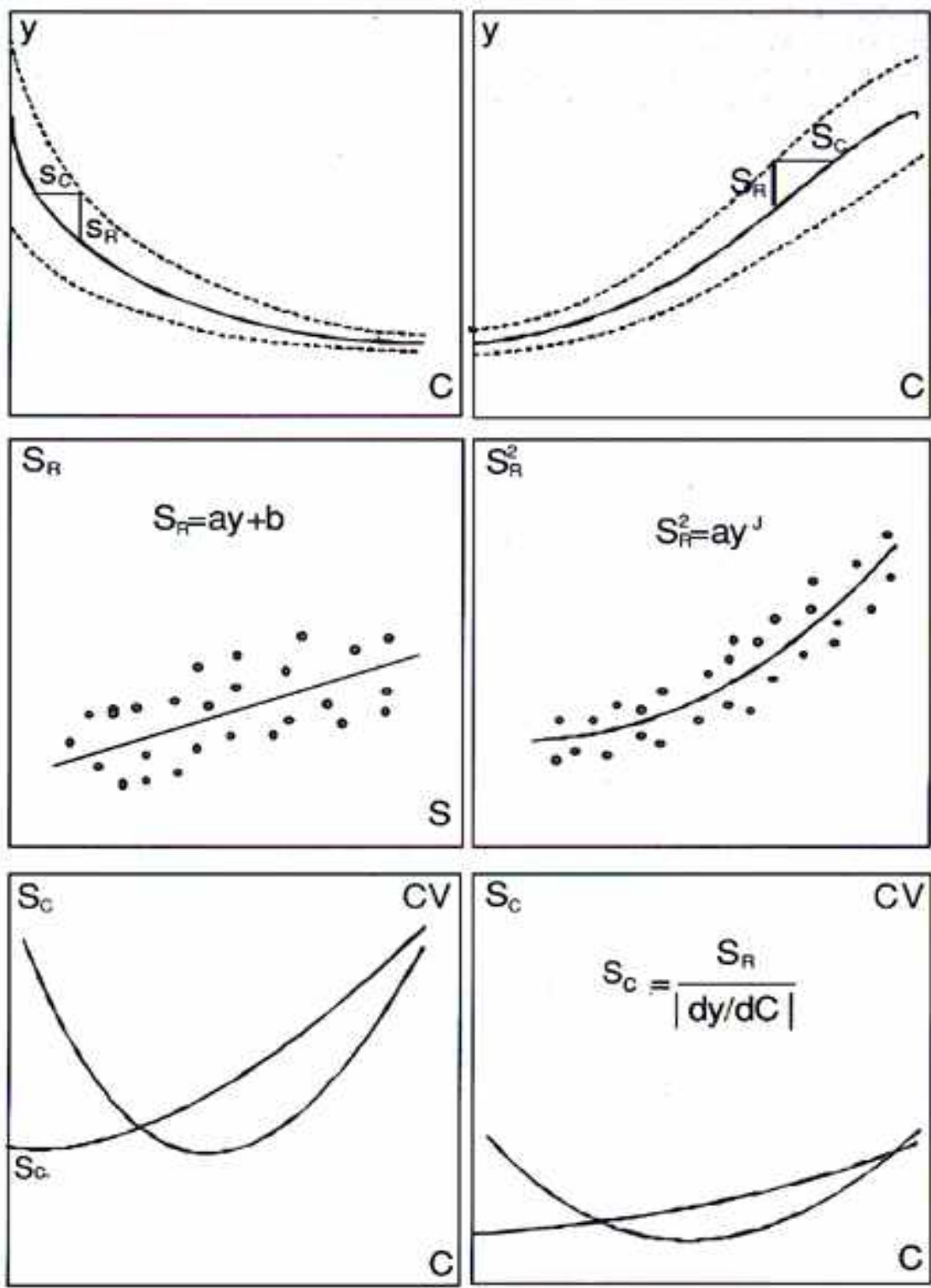
Pour apprécier la précision, il suffit par conséquent de répéter les mesures sur le même spécimen et de calculer l'écart type ou le coefficient de variation de la distribution des valeurs expérimentales. Il est, cependant, nécessaire d'effectuer cette opération à plusieurs niveaux de concentration. Un procédé pour apprécier, très commode et répandu en immunanalyse, consiste à établir le **profil de précision** c'est-à-dire la courbe représentative de l'évolution de l'écart type ou du coefficient de variation en fonction de la concentration. Celui-ci peut représenter n'importe lequel des niveaux de précision définis précédemment. Nous décrirons les étapes conduisant à son obtention ainsi que ses applications en prenant comme exemple la courbe montrant la variation de la répétabilité selon le niveau de concentration. Pour l'obtenir il faut passer par les étapes indiquées sur la **Figure 3** :

- calcul par une simple régression linéaire, à différents, niveaux de signal, de l'écart type  $s_R$  exprimé en valeur de signal,
- calcul, à différents niveaux de concentration, de l'écart type exprimé en concentration  $s_c$  à partir de  $s_R$  et de la pente  $dy/dC$  de la courbe de calibrage :

$$s_c = s_R \left/ \left| \frac{dy}{dC} \right| \right.$$

- tracé de la courbe de variation de l'écart type  $s_c$  ou du coefficient de variation  $s_c/C$  en fonction de la concentration  $C$ .

Le profil de précision révèle tout son intérêt à plusieurs niveaux. Dans le cadre du contrôle de qualité, il permet de valider les résultats d'une série de dosages. En réalité cela n'est possible que lorsqu'on dispose d'au moins deux déterminations pour chaque spécimen ; or cette pratique tend à disparaître avec le développement de l'automatisation. Grâce aux profils de précision intra- et inter-laboratoire, il est possible d'apprécier l'état de l'art de l'immunodosage d'un analyte. Au moment de la mise au point d'un dosage, cette méthode statistique s'avère particulièrement utile en permettant d'évaluer d'un seul coup d'œil la précision dans tout le domaine de concentration. Ainsi le fabricant de la trousse dispose d'un critère objectif pour choisir les conditions expérimentales (concentrations des réactifs en présence, modalités d'incubation, nombre d'opérations de lavage lors de la séparation des formes libre et liée, etc.) optimales c'est-à-dire celles qui conduisent à la meilleure précision aux niveaux de concentration qui représentent des seuils de décision importants sur le plan clinique. Enfin signalons qu'on en déduit l'écart type  $s_{Co}$ , correspondant à des valeurs de concentration faible voire nulle, à partir duquel on estime la limite de détection.



**Figure 3 :** Etapes conduisant à la confection d'un profil de précision pour un immunodosage par défaut (partie gauche) ou par excès (partie droite) d'anticorps.

Les valeurs couramment obtenues pour les différentes formes de précision lorsqu'on les exprime en coefficient de variation sont, dans le cas des immunodosages : inférieures à 5% pour la répétabilité, comprises entre 5 et 10% pour la reproductibilité intralaboratoire et supérieures à 10% pour la reproductibilité interlaboratoire. Les valeurs les plus élevées sont observées transitoirement lorsqu'apparaissent des techniques présentant des caractéristiques nouvelles

(meilleure spécificité par exemple des techniques immunométriques par rapport aux techniques par compétition) ou bien pour des dosages dont la standardisation est mauvaise comme c'est le cas actuellement (1994) des dosages d'estradiol, CA 19-9 et PSA. De plus, rappelons que les méthodes par excès d'anticorps fournissent le plus souvent des coefficients de variation plus bas que les méthodes par défaut d'anticorps.

### III.2.Sensibilité, détectabilité

Ces critères expriment, tous deux, l'aptitude d'une méthode à différencier les signaux fournis par deux spécimens de concentrations voisines.

Il ne faut cependant pas les confondre : la sensibilité s'adresse à toutes les concentrations différentes de zéro alors que la détectabilité intéresse le domaine des concentrations faibles ou nulles. Dans ce dernier cas, on a défini la **limite de détection analytique** comme la plus petite concentration fournissant un signal significativement différent de celui d'un blanc (échantillon identique en tous points au spécimen à doser mais de concentration nulle). La comparaison doit se faire en termes statistiques par un test approprié.

Modalités pratiques du calcul de la limite de détection analytique :

La relation donnant la limite de détection  $L$  peut s'écrire :

$$L = k \cdot \frac{S_b}{\left| \frac{dy}{dC} \right|_{C=0}} = k \cdot s_{C_0}$$

dans laquelle  $k = t(\alpha, \nu) \cdot \sqrt{\frac{1}{n_b} + \frac{1}{n_y}}$

avec  $t(\alpha, \nu)$  : variable de Student pour un risque  $\alpha$  donné (ou risque de conclure à tort à la présence de la substance dans le liquide biologique) et  $\nu$  degrés de liberté (correspondant à l'estimation de  $s_{C_0}$ ).

$n_b, n_y$  : nombre de répétitions du blanc et des spécimens respectivement, dans les conditions habituelles d'utilisation de la méthode

$s_b$  : écart type des signaux fournis par le blanc

et  $s_{C_0}$  : écart type, exprimé en concentration, pour des mesures de concentration nulle.

Pour calculer la limite de détection analytique, il faut par conséquent

a) déterminer  $s_{C_0}$  : pour cela, deux conditions doivent être respectées :

- effectuer les répétitions sur un échantillon dépourvu de la substance à doser mais le plus proche possible dans sa nature et sa composition du liquide biologique utilisé,
- travailler, dans un premier temps, sur les valeurs de signal pour obtenir l'écart type  $s_b$ , puis déterminer  $s_{C_0}$  en divisant par la pente à l'origine de la courbe d'étalonnage.

Pour les laboratoires qui effectuent les dosages en double, la meilleure méthode consiste à déduire du profit de précision la valeur de  $s_{C_0}$ . Cette dernière est la limite de la fonction  $s_C = f(C)$  lorsque la concentration tend vers zéro.

b) multiplier  $s_{C_0}$  par  $k$  ; le choix de la valeur de  $k$  doit se faire en fonction du protocole de dosage adopté en routine ( $n_b, n_y$ ) comme la relation exprimant  $k$  le montre. La valeur habituellement utilisée comme limite de détection est de  $3,0 s_{C_0}$  pour des déterminations en simple ( $n_b = n_y = 1$ ). Dans ce cas la variable de Student est égale à 2,1 ce qui correspond à un risque de conclure à tort à la présence de la substance (risque  $\alpha$ ) de 1,7%. Pour une valeur équivalente du risque  $\alpha$ , la limite de détection est égale à  $2,1 s_{C_0}$  lorsque les déterminations sont effectuées en double ( $n_b = n_y = 2$ ).

Un autre moyen d'évaluer la limite de détection analytique, la méthode des « dilutions limites », consiste à diluer progressivement un spécimen de faible concentration de manière à déterminer à partir de quel moment la réponse devient incohérente. L'évaluation précise est difficile et dépend, ici aussi, de la qualité du diluant.

La définition précédente plusieurs inconvénients :

- elle n'est valable que si un véritable spécimen zéro est disponible ce qui est loin d'être toujours le cas,
- elle prend uniquement en compte la variabilité intrasérie ; cela implique que, pour être représentative, son estimation doit être réalisée à partir de plusieurs séries de dosages,
- elle fournit la concentration significativement différente de zéro mais n'indique pas la précision avec laquelle celle-ci est mesurée ; en calculant le coefficient de variation théorique correspondant à une limite de détection analytique de  $3 s_{C_0}$ , on obtient  $CV = s_{C_0} / 3s_{C_0} = 33 \%$ . Cette valeur peut se révéler inacceptable pour une détermination quantitative dans certaines situations cliniques.

Pour remédier, au moins en partie, à ces inconvénients on définit la **limite de détection fonctionnelle** comme la plus petite concentration pour laquelle le coefficient de variation inter-séries est égal à 20 %. C'est ainsi, par exemple, que l'on qualifie de "troisième génération" les dosages de TSH qui possèdent une limite de détection analytique inférieure à 0,005 mUI/l et surtout une limite de détection fonctionnelle comprise entre 0,01 et 0,02 mUI/l.

### III.3. Justesse

La justesse d'une méthode représente la qualité de l'accord entre la valeur mesurée et la valeur "vraie" ou sa meilleure estimation en dehors des erreurs aléatoires. Ce critère se rapporte, par conséquent, à l'erreur systématique. Pour l'apprécier, il est nécessaire de disposer de la valeur "vraie" ce qui est un problème non résolu à l'heure actuelle (1994). En effet, il n'existe pas de méthode de référence permettant de doser les composés concernés par les immunodosages. Tout au plus, assiste-t-on au développement de méthodes utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour les petites molécules telles que les hormones stéroïdiennes (cortisol, estradiol, progestérone, testostérone, etc.).

*Dans ces conditions, les procédés disponibles sont les suivants :*

a) *Comparaison des résultats obtenus à l'aide d'une méthode consacrée par une longue période d'utilisation : pour cela, on fait appel aux mêmes méthodes de régression que dans les autres domaines de la biologie clinique. Soulignons, en outre, que la comparaison doit porter sur des spécimens représentant le plus large éventail possible de situations physiopathologiques.*

b) *Epreuve de dilution : celle-ci consiste, à partir d'un ou plusieurs spécimens de concentration élevée en analyte, à réaliser une série de dilutions dans un milieu approprié. Lorsqu'il s'agit d'une trousse de réactifs du commerce, le milieu à utiliser impérativement est le "diluant" préconisé par le fabricant pour le traitement des spécimens de concentration élevée.*

*L'interprétation des résultats de cette épreuve peut se faire en établissant la relation entre la concentration observée et la dilution. Celle-ci est, de manière idéale, une droite passant par l'origine et de pente égale à la concentration du spécimen pur. En présence d'une erreur systématique, on observe une ordonnée à l'origine non nulle ou une relation non linéaire. Enfin, cette épreuve ne permet pas de mettre en évidence une erreur constante en valeur relative.*

c) *Epreuve de surcharge : celle-ci consiste à ajouter ; à un ou plusieurs spécimens de faible concentration ( $C_0$ ) en analyte, des quantités connues ( $Q_i$ ) d'étalon.*

*La courbe représentative de la concentration observée ( $C_i$ ) en fonction de  $C_0 + Q_i$  est une droite, de pente égale à l'unité, passant par l'origine en l'absence d'erreur systématique ou en présence d'une erreur constante en valeur absolue.*

d) *Etude de spécimens dont la valeur de concentration est nulle : dans certaines circonstances (sujets hypophysectomisés ou ayant subi une épreuve de freinage par exemple), il est possible de disposer de liquides biologiques dépourvus d'analyte. Le signal fourni par ceux-ci dans le système de dosage étudié peut se révéler extrêmement utile pour l'optimisation de sa justesse.*

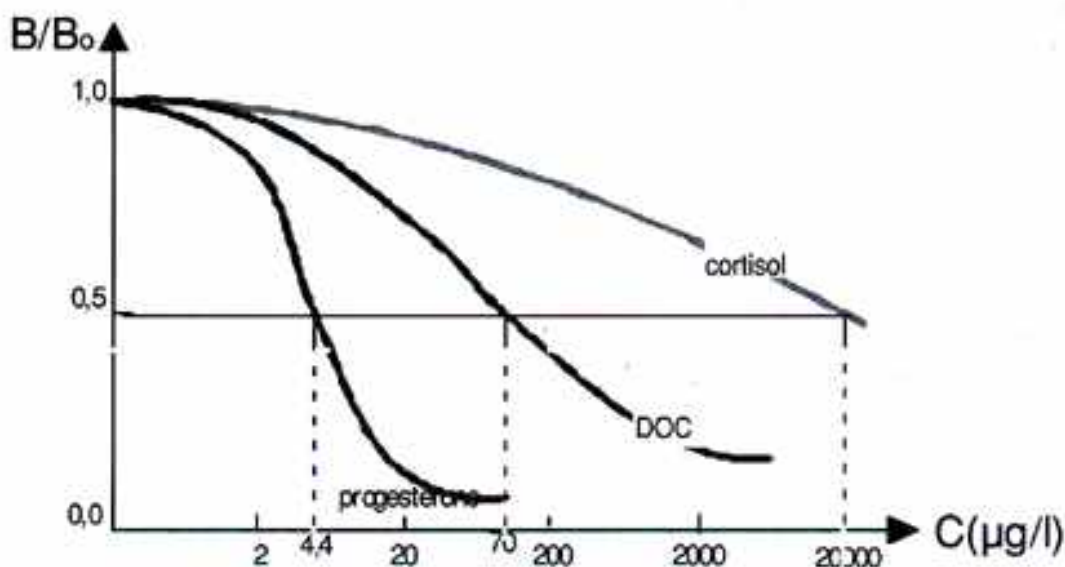
### III.4. Spécificité

La spécificité d'un dosage est son aptitude à mesurer l'analyte désiré et seulement celui-ci, même en présence de quantités importantes de substances dont la structure est proche.

Il est évident que cette qualité du dosage est directement liée à la nature de l'immunsérum ou des anticorps utilisés.

Les tests de spécificité sont lourds à mettre en œuvre et, pour cette raison, sont généralement pratiqués par le fabricant lors de la mise au point de la trousse. Il existe deux façons d'évaluer la spécificité :

a) *Détermination des pourcentages de réaction croisée : cette méthode ne s'applique qu'aux dosages par compétition car elle repose sur l'évaluation de la concentration déplaçant 50 % du traceur, difficile à définir dans le cas des dosages par excès d'anticorps. Elle consiste à réaliser des courbes de « calibrage » avec tous les composés qui sont susceptibles d'interférer dans le dosage (Figure 4). L'interprétation du pourcentage de réaction croisée obtenu doit se faire en tenant compte des concentrations relatives de l'analyte et de la substance interférante.*



**Figure 4** : Déterminations des pourcentages de réaction croisée de la désoxycorticostérone (DOC) et du cortisol dans un immunodosage de progestérone

$$\text{DOC } (4,4 / 70) 100 = 6,3 \%$$

$$\text{Cortisol } (4,4 / 2.10^4) 100 = 0,022 \%$$

b) *Détermination de la plus petite concentration de substance interférante fournissant un signal non nul : c'est la seule évaluation possible pour une méthode "sandwich".*



## **ETAPE PRE-ANALYTIQUE – CONSERVATION DES ECHANTILLONS**

### **PROBLEMES LIES AUX REACTIFS ET AU PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

- Etalon
- Anticorps
- Effet crochet
- Composition du milieu réactionnel
- Traitement des données

### **PROBLEMES LIES A L'ECHANTILLON**

- Anticorps hétérophiles
- Auto-anticorps
- Molécules anormales
- Interférences spécifiques par analogie de structure

### **MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERFERENCE**

- Test de dilution
- Test de surcharge
- Tests particuliers

# PIEGES ET PROBLEMES EN IMMUNOANALYSE

A. BEAUDONNET-R. COHEN

## ■ ETAPE PRE-ANALYTIQUE – CONSERVATION DES ECHANTILLONS

---

Les données indiquées ci-dessous concernent plus particulièrement les vingt-deux analytes proposés dans le cadre du contrôle de qualité national en hormonologie plasmatique et marqueurs tumoraux.

En fonction des systèmes analytiques utilisés et des analytes dosés, les conditions de prélèvement peuvent être différentes et les interférences citées ci-dessous plus ou moins importantes.

### ■ I. ANTICOAGULANTS

---

Certains anticoagulants peuvent être déconseillés par (suite d'interférence avec l'analyte ou avec la méthodologie utilisée) :

- **héparine** qui perturbe la réaction antigène-anticorps
- **EDTA, fluorure de sodium et citrate** lorsque la fluorescence en temps résolu est utilisée car ces anticoagulants dissocient le chélate d'euporium ; l'**EDTA** peut aussi inhiber la réaction enzymatique si le marqueur utilisé est la phosphatase alcaline.

*D'une façon générale, il est préférable d'utiliser des tubes sans anticoagulant.*

### ■ II. GEL SEPARATEUR

---

L'utilisation de gels séparateurs est à éviter, en particulier lors du dosage d'hormones libres.

### ■ III. CONSERVATEURS

---

L'**azide de sodium** est un inhibiteur de la peroxydase et son utilisation est donc déconseillée avec les techniques utilisant cette enzyme.

### ■ IV. CENTRIFUGATION

---

La centrifugation doit être réalisée le plus rapidement possible après le prélèvement et doit être suffisante pour éliminer tous les globules rouges et toutes les particules en suspension dont la présence peut perturber les différentes réactions (I).

### ■ V. ASPECT MACROSCOPIQUE DU SERUM

---

#### V.1. Sérum hémolysé

La présence d'hémoglobine peut perturber la réaction antigène-anticorps et/ou altérer la qualité du signal mesuré. Les fabricants indiquent en général à partir de quelle concentration l'hémoglobine devient gênante. Il faut néanmoins noter que dans le cas du dosage de la **ferritine**, l'hémolyse doit être évitée car l'interférence dépend de la concentration de ferritine intra-érythrocytaire qui est très variable selon les pathologies.

#### V.2. Sérum hyperlipidémique

L'hyperlipidémie peut aussi être néfaste en perturbant la réaction antigène-anticorps et en modifiant les conditions de pipetage par augmentation de la viscosité du milieu. L'hyperlipidémie modifie également les coefficients d'extraction de certains stéroïdes lorsqu'une extraction préalable est nécessaire. Les prélèvements seront donc réalisés de préférence sur un sujet à jeun depuis au moins 8 heures.

### V.3. Sérum ictérique

Les fabricants indiquent en général la concentration de bilirubine en dessous de laquelle, aucune interférence n'a été notée.

## VI. CAS PARTICULIERS DES DOSAGES HORMONAUX

Plusieurs facteurs influencent le résultat d'un dosage hormonal.

### VI.1. Position du sujet

Un repos prolongé est nécessaire avant de prélever certaines hormones : prolactine par exemple.

### VI.2. Stress

Le stress augmente artificiellement la concentration de plusieurs hormones dont la prolactine et le cortisol.

### VI.3. Rythme circadien

L'interprétation du résultat dépendra du moment du prélèvement pour les hormones dont la sécrétion est soumise à un rythme circadien. Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés quelques exemples d'hormones dont les amplitudes de variation sont importantes ou modérées selon les heures de la journée (2).

HORMONE	HEURES D'ACROPHASES	AMPLITUDE DE VARIATION	
		élevée (>50%)	modérées (10-50%)
<b>Cortisol</b>	8 à 14 h	élevée	
<b>Prolactine</b>	22 à 8 h	élevée	
<b>Testostérone</b>	6 à 7 h	élevée	
<b>Hormone thyroïdienne stimulante (TSH)</b>	20 à 23 h	élevée	
<b>Hormone folliculo-stimulante (FSH)</b>			
<b>Hormone lutéinisante (LH)</b>	variables		modérées
<b>Estradiol</b>	12 h		modérée

### VI.4. Cycle menstruel

La connaissance de la date des dernières règles est nécessaire pour l'interprétation des résultats des dosages de FSH, LH, prolactine, estradiol, progestérone, testostérone.

### VI.5. Caractère pulsatile de la sécrétion des hormones gonadotropes

Le caractère très pulsatile de la sécrétion de LH peut nécessiter d'effectuer le dosage sur un mélange de sérums (mélange à volumes égaux de 3 sérums prélevés à 10 minutes d'intervalle).

## VI.6. Etat physiologique (grossesse, ménopause)

Bien entendu, l'interprétation d'un dosage hormonal devra tenir compte de ces situations.

## VI.7. Médicaments

Il est conseillé dans la mesure du possible de supprimer quelques jours avant le prélèvement les médicaments qui présentent des analogies de structures avec la substance à doser ; c'est le cas en particulier des contraceptifs oraux et des corticoïdes pour le dosage *des hormones stéroïdiennes*.

Lors d'un dosage de **T4 libre**, le dosage sera réalisé avant la mise en place d'une héparinothérapie. En effet, l'héparine favorise la libération d'acides gras libres non estérifiés (AGLNE) à partir des triglycérides (par activation de la lipoprotéine lipase), AGLNE qui déplacent la T4 de sa liaison avec ses protéines vectrices et peuvent interférer surtout dans les techniques utilisant un analogue marqué de la T4.

Avec les techniques utilisant le système streptavidine-biotine, chez les patients traités par de fortes doses de *biotine*, le prélèvement devra être effectué au moins six heures après la dernière administration.

## ■ VII. AUTRES CAS PARTICULIERS

---

Le prélèvement pour dosage de **PSA** doit être fait avant toutes manipulations prostatiques (biopsie, massage, échographie transrectale, etc.) susceptibles d'augmenter artificiellement et transitoirement la concentration de ce marqueur.

## ■ VIII. CONSERVATION DES ECHANTILLONS

---

Ces conditions sont variables selon l'analyte, mais d'une façon générale, les échantillons doivent être centrifugés le plus rapidement possible et conservés congelés s'ils ne sont pas analysés dans les 24 heures suivant le prélèvement.

Il faut également éviter les congélations et décongélations successives.

L'étape de décongélation doit être lente ; après décongélation le prélèvement doit être soigneusement homogénéisé et subir une éventuelle centrifugation lorsque des particules en suspension sont présentes.

### Cas des prélèvements à expédier

Lorsque le prélèvement peut être effectué sur EDTA (ceci dépend de la méthodologie utilisée et de l'analyte), l'addition d'agent anti-protéolytique (aprotinine=Zymofren® ou Iniprol®) au plasma permet une conservation de 48 heures à température ambiante de la plupart des hormones protéiques (3).

Dans le cas contraire, il est important d'envoyer les échantillons centrifugés congelés et de maintenir la congélation pendant le transfert (caissons isothermes).

## PROBLEMES LIES AUX REACTIFS ET AU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### ■ I. ETALON

---

La validité d'un immunodosage repose sur l'absolue identité de structure entre la molécule étalon et la molécule à doser. Les problèmes posés par la préparation des solutions étalons sont différents selon la structure des analytes : analytes de faible masse molaire et de structure chimique bien définie et analytes de masse molaire élevée et de structure complexe.

#### I.1. Analytes de faible masse molaire et de structure bien définie

C'est le cas des *hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes*. Ces hormones existent sous forme purifiée et les préparations issues de différents lots seront identiques.

La concentration sera exprimée en mole ou sous-multiple par litre.

## **I.2. Analytes de masse molaire élevée et de structure complexe**

Dans le cas des *hormones glycoprotéiques et des marqueurs tumoraux*, le problème est beaucoup plus complexe. Les étalons sont obtenus par extraction de liquides biologiques, de tissus sains ou pathologiques. Mais les étalons ne correspondent pas toujours à l'analyte à doser car il existe des variants génétiques et de nombreuses formes moléculaires dont les proportions varient selon les situations physiopathologiques (prolactine, LH, hCG, PSA par exemple). Il n'est donc pas possible d'utiliser une substance étalon représentative du mélange de ces différentes formes. En conséquence, selon l'étalon utilisé (et la spécificité des anticorps), la réponse du système conduira à des résultats différents.

*La préparation de ces étalons est confiée à des organismes spéciaux tel que le National Institute for Biological Standards and Controls ou NIBSC* (Herfordshire, United Kingdom) à la demande de l'Organisation Mondiale de la Santé (4).

### **- Préparations disponibles**

Pour les analytes proposés dans le cadre du contrôle national de qualité, de telles préparations sont disponibles et distribuées pour hCG,  $\beta$ hCG, FSH, LH, Prolactine, TSH, alpha-fœtoprotéine (AFP), ferritine et IgE totales.

La préparation de ces étalons de référence nécessite une étude collaborative entre de nombreux laboratoires qui déterminent quelle est la préparation la plus adaptée, définissent les conditions de préparation et de conservation et attribuent une valeur de référence.

### **- Définitions**

Deux types de préparations sont disponibles :

- "International Standard" ou IS, préparation à laquelle une unité internationale (UI) a été attribuée à la suite de l'étude collaborative de laboratoires utilisant l'éventail le plus large possible de méthodes de dosage. A l'origine, ces préparations destinées aux dosages biologiques étaient des préparations peu purifiées. On peut citer l'exemple du 2<sup>ème</sup> IS 61/6 pour dosage de l'hCG préparé à partir d'extrait d'urines de femmes enceinte et contenant de l'hCG dimère, des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  libres et de la LH.
- "International Reference Preparation" ou IRP, préparation purifiée destinée aux dosages immunologiques. Le 2<sup>ème</sup> IS 61/6 pour dosage d'hCG a été remplacé par le 1<sup>er</sup> IRP 75/537 contenant essentiellement de l'hCG dimère. Ces préparations (IRP) sont mises en service au terme d'une étude collaborative moins importante.

L'unité internationale (UI) est définie comme l'activité biologique contenue dans une masse définie d'un IS ou d'une IRP.

### **- Remplacement de ces étalons**

Ces préparations doivent être utilisables ou moins pendant 10 ans. Lorsqu'un étalon doit être remplacé, la nouvelle préparation est comparée à l'ancienne afin de déterminer la quantité du nouvel étalon contenant une unité internationale, ce qui permet la constance dans le temps de l'UI. La masse de préparation qui définit une UI peut donc varier en fonction des étalons successifs.

### **- Etalons secondaires**

Le nombre d'ampoules d'IS ou d'IRP étant limité, les fabricants de trousse utilisent des étalons secondaires dont l'activité immunologique est comparée aux étalons de référence. Cependant, les conditions d'extraction et de purification ne sont pas toujours identiques, les activités par unité de masse sont différentes et les facteurs de conversion entre  $\mu\text{g/l}$  et UI/l sont variables (prolactine – AFP par exemple).

L'expression des résultats en UI/l est fortement recommandée car elle permet une meilleure concordance entre valeurs obtenues avec différentes trousse.

Actuellement, pour un certain nombre d'analytes, les fabricants calibrent leurs étalons par rapport aux différents IS ou IRP, par exemple :

- LH : 2<sup>ème</sup> IS 80/552 ou 1<sup>er</sup> IRP 68/40
- Pro lactine : 1<sup>er</sup> IRP 75/504, 2<sup>ème</sup> IS 83/562, 3<sup>ème</sup> IRP 84/500

Dans le cas du dosage de l'hCG la référence par rapport au 2<sup>ème</sup> IS 61/6 est pratiquement abandonnée.

En ce qui concerne la ferritine, la plupart des fabricants calibrent leurs trousse à partir de l'étalon 80/602 préparé à partir de ferritine de foie humain. Dans le cas de l'AFP, la majorité des trousse et calibrée par rapport à la 1<sup>ère</sup> IRP 72/225 préparée à partir de "pool" de sérums provenant de sang de cordon.

## ■ II. ANTICORPS

---

Le développement des anticorps monoclonaux issus des travaux de KOHLER et MILSTEIN (5) associé à la mise en œuvre de dosages de type immunométrique a permis d'améliorer la spécificité, la précision et la limite de détection de nombreux dosages.

### II.1. Avantages

Les anticorps monoclonaux permettent l'obtention de réactifs homogènes de lot à lot.

Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans des systèmes immunométriques a permis notamment :

- **La mise au point de dosages spécifiques** d'hormones présentant une grande similitude de structure : hCG-FSH-LH-TSH,

- **Le dosage spécifique de l'ACE** sans interférence avec les autres glycoprotéines de structure proche : NCA (non specific cross reacting antigen), BGP1 (biliary glycoprotein 1), NFA1 (normal foetal antigen 1),

- **La mise au point de dosages présentant une limite de détection très basse** : TSH (permettant la discrimination entre sujets euthyroïdiens et hyperthyroïdiens),

- **La découverte d'antigènes associés à des tumeurs**, dont le dosage est très utile au suivi de certaines tumeurs : antigènes carbohydrates tels que CA 15-3 et cancer du sein, CA 125 et cancer de l'ovaire, CA 19-9 et cancers digestifs par exemple.

### II.2. Inconvénients

Les anticorps monoclonaux présentant néanmoins certains inconvénients liés à leur manque d'affinité et à leur "surspécificité".

#### - Affinité

L'affinité d'un anticorps monoclonal est en général inférieure à celle d'un anticorps polyclonal. Ce manque d'affinité ne pose pas de problème avec les systèmes immunométriques où l'on est en excès d'anticorps. par contre, dans le cas des dosages par compétition, cette baisse d'affinité est un inconvénient et les anticorps polyclonaux sont en général utilisés avec ce type de méthodologie.

#### - " Surspécificité "

Un anticorps monoclonal est spécifique d'un épitope et non de la molécule entière. Selon le cas, cette "surspécificité" se traduira par une sur-estimation ou une sous-estimation des résultats.

Si l'épitope reconnu est présent sur une molécule différente, on pourra avoir des réactions croisées importantes. Inversement, le dosage de molécules complexes et hétérogènes (hormones glycoprotéiques, marqueurs tumoraux) pourra être en défaut si l'épitope reconnu n'est plus exprimé ou si les épitopes présents ne sont pas reconnus par les anticorps utilisés (formes moléculaires variables).

Plusieurs exemples peuvent être cités :

- hCG sécrétée sous forme de sous-unités  $\beta$  libres au cours de certaines tumeurs, formes non reconnues par les systèmes immunologiques dosant spécifiquement l'hCG dimère,

- ACE dont la structure antigénique peut être variable selon la tumeur à l'origine de sa sécrétion,
- prolactine dont la forme moléculaire principale est monomérique ("little prolactin"), mais qui circule également sous forme dimérique ("big prolactin") et polymérique ("big-big prolactin"), formes glycosylées ou non d'activité biologique différente (6),
- LH, hormone glycoprotéique présentant une microhétérogénéité liée aux chaînes glycosylées et pour laquelle une quinzaine d'isoformes a été décrite (7). Certaines formes de LH sécrétées chez des femmes endocrinologiquement normales ne sont pas détectées par certains systèmes immunologiques et on parle de LH "invisible" (8)

## ■ III. EFFET CROCHET

---

### III.1. Définition

L'effet crochet (effet d'inversion à haute dose d'antigène ou "hook effect") se traduit par une chute paradoxale du signal mesuré en présence d'une forte concentration de l'antigène à doser et par l'obtention d'une courbe en cloche. A une même valeur du signal correspondront donc deux valeurs différentes de l'analyte, avec le risque de rendre une valeur normale ou très sous-estimée (9).

### III.2. Caractéristiques

Cet effet crochet concerne les molécules possédant au moins deux sites antigéniques différents et n'est décrit que pour les techniques immunométriques.

Ce phénomène est observé pour les molécules présentant de larges marges de variations physiopathologiques : hCG, prolactine, marqueurs tumoraux (ACE-AFP-antigènes carbohydrates-PSA), ferritine par exemple.

### III.3. Explications

L'explication est différente pour les techniques en un temps et pour les techniques en deux temps.

Dans le cas des techniques en un temps, le phénomène est assimilable au phénomène de prozone observé avec les techniques par hémagglutination (l'excès d'antigène est tel que tous les sites anticorps sont saturés rendant impossible la liaison anticorps de capture-antigène-anticorps marqué).

Le phénomène disparaît si on utilise une méthode en deux temps.

Dans le cas des techniques en deux temps, plusieurs explications ont été proposées :

- lavage incomplet après la première incubation
- anticorps marqué en quantité insuffisante
- utilisation d'anticorps hétérogènes sur le support, c'est-à-dire d'anticorps de forte et de faible affinité ; cependant, l'effet crochet a été décrit aussi avec les anticorps monoclonaux.

### III.4. Mise en évidence et solutions

La dilution du sérum permet la mise en évidence de ce phénomène. La poursuite des dilutions (dans le diluant fourni par le fabricant) est nécessaire jusqu'à l'obtention de deux résultats concordants.

En l'absence d'indication clinique, seule la dilution systématique du sérum permet de se mettre à l'abri de l'effet crochet.

Néanmoins, les techniques en deux temps sont moins "sensibles" que celles en un temps et les concentrations à partir desquelles on peut observer ce phénomène sont en général élevées, mais doivent être déterminées et connues pour chaque trousse de réactif.

Dans le cadre de la législation actuelle qui impose une double détermination pour certains marqueurs tumoraux, la possibilité de pratiquer cette double détermination sur deux dilutions du même sérum permet la mise en évidence d'un éventuel effet crochet. Cette législation concerne le PSA, les antigènes carbohydrates (CA 15-3, CA 19-9 et CA 125).

## ■ IV. COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL – EFFETS DE MATRICE

---

Le déroulement de la réaction antigène-anticorps est étroitement lié aux conditions de pH, force ionique, concentration en protéines en général et concentration en protéines de liaison de l'analyte en particulier, présence éventuelle d'agents tensioactifs. Le dosage de molécules de faible masse molaire (stéroïdes) est particulièrement "sensible" aux effets de matrice. Par conséquent, le milieu de dilution de la gamme étalon et l'échantillon à doser doivent avoir des compositions aussi proches que possible. Une trousse adaptée au dosage d'un échantillon sérique ne sera pas obligatoirement adaptée au dosage de ce même échantillon dans un autre milieu biologique.

Par ailleurs, en cas de dilution de l'échantillon, le choix du diluant doit tenir compte des conditions citées ci-dessus : pH, force ionique, etc. (10).

## ■ V. TRAITEMENT DES DONNEES

---

En immunoanalyse, il n'y a pas de relation linéaire entre l'intensité du signal et la concentration de l'analyte. Selon les différents modèles mathématiques utilisés pour l'établissement de la courbe de calibration, les résultats pourront être différentes, expliquant une partie des écarts intertechniques (11).

### PROBLEMES LIES A L'ECHANTILLON

L'échantillon à analyser peut contenir des molécules inhabituelles ou présentes à une concentration anormalement élevée qui vont perturber le déroulement des réactions immunologiques.

## ■ I. ANTICORPS HETEROPHILES

---

### I.1. Définition

Les anticorps hétérophiles sont des anticorps présents dans certains sérums et qui sont dirigés contre les immunoglobulines animales du réactif. Ces anticorps pourront interférer au cours des différentes étapes immunologiques, en particulier dans les techniques immunométriques lorsque les deux anticorps réactifs ont la même origine animale. On peut noter également une interférence dans les techniques par compétition (12).

### I.2. Origine

L'origine de ces anticorps est multiple. Ils peuvent apparaître :

- après immunisation par vaccins préparés sur tissu animaux,
- par suite de contacts fréquents avec les animaux,
- au cours de maladies auto-immunes (facteurs rhumatoïdes des affections rhumatismales et du lupus érythémateux),
- par suite d'injection d'anticorps monoclonaux de souris dans le cadre d'immunosciences et d'immunothérapies.

Enfin, dans un certain nombre de cas, on ne trouve pas d'explication à leur présence.

### I.3. Caractéristiques

Ces anticorps peuvent être dirigés contre les différents motifs antigéniques de l'immunoglobuline : motifs isotypiques, allotypiques et idiotypiques. Actuellement, les anticorps hétérophiles à l'origine des interférences les plus souvent décrites sont des anticorps anti-isotypes dirigés contre la partie constante des immunoglobulines



(fragment Fc) et des anticorps anti-idiotypes dirigés contre la partie hypervariable de l'immunoglobuline. Ces anticorps sont de classe IgG et/ou IgM.

#### **I.4. Problèmes posés par la présence des anticorps hétérophiles.**

- Avec les *techniques immunométriques*, ces anticorps vont être le plus souvent à l'origine d'une sur-estimation des résultats en se fixant d'une part sur l'anticorps de capture et d'autre part sur l'anticorps traceur, simulant ainsi la présence de l'antigène (13-14). Plus rarement, ces anticorps peuvent aussi être à l'origine d'une sous-estimation des résultats (cas d'IgM anti-immunoglobulines animales qui, par suite d'encombrement stérique, empêchent la fixation de l'antigène sur l'anticorps spécifique).

- Avec les *techniques par compétition*, bien que moins souvent signalé, ce type d'interférence peut néanmoins exister (cas d'IgM anti-IgG animales qui par suite d'encombrement stérique empêchent la fixation du traceur sur l'antisérum).

#### **I.5. Solutions pour éliminer ou minimiser ces interférences**

Plusieurs solutions sont possibles :

- *L'addition de sérum animal* provenant de la même espèce que celle ayant fourni les anticorps réactifs permet de neutraliser les anti-immunoglobulines (13-14) ; cependant, la concentration d'immunoglobulines neutralisantes peut être suffisante pour certains spécimens et insuffisante pour d'autres ; par ailleurs, il est difficile de neutraliser complètement les anticorps de classe IgM,

- *L'utilisation de fragments F(ab')<sub>2</sub>* comme anticorps de capture ou traceur au lieu de l'anticorps complet, ce qui évite la fixation des anticorps hétérophiles dirigés contre le fragment Fc, mais n'évite pas la fixation des anticorps anti-idiotypes (15),

- *L'utilisation de techniques en 2 temps* ; les anticorps hétérophiles se fixent sur deux molécules d'anticorps de capture et ne sont plus disponibles pour lier l'anticorps traceur ajouté au cours de la deuxième réaction immunologique (15).

#### **I.6. Cas particuliers des patients soumis à une immunoscintigraphie ou à une immunothérapie**

L'injection d'anticorps monoclonaux de souris (ou de leur fragments) entraîne l'apparition d'anticorps anti-souris (HAMA ou Human Anti-Mouse Antibodies) à une concentration telle qu'ils ne sont plus "neutralisantes" par les solutions précédentes (16).

Les techniques immunométriques avec deux anticorps monoclonaux de souris sont particulièrement "sensibles" à la présence *d'anticorps anti-isotypes*. Par conséquent, tous les analytes dosés ainsi sont concernés (ACE-AFP-PSA-ferritine-hCG-antigènes carbohydrates-etc.).

L'élimination des "HAMA" nécessite un traitement préalable du sérum avant immunodosage, traitement par le polyéthylène glycol à 130 g/l ou chauffage du sérum à 90°C dans le cas de l'ACE (17).

La présence *d'anticorps anti-idiotypes* perturbant fortement le dosage du CA 125 a été décrite chez des patientes ayant subi plusieurs immunoscintigraphies (avec injection d'anticorps OC 125) pour surveillance post-opératoire d'un cancer de l'ovaire. Dans ce cas, les anticorps anti-idiotypes se comportent comme le CA 125 en se fixant sur les anticorps anti-OC 125 du réactif. Ces anticorps anti-idiotypes peuvent être éliminés par chromatographie d'affinité préalable sur protéine A (18).

## **■ II. AUTO - ANTICORPS**

---

### **II.1. Anti-T3, anti-T4**

Les auto-anticorps (anti-analytes) rencontrés en pathologie thyroïdienne vont également perturber, plus ou moins selon le type de méthodologie, les résultats de dosage de T3 et T4 libres.

#### *Origine*

Ces auto-anticorps peuvent être présents chez les malades atteints de maladies thyroïdiennes (Basedow, Hashimoto) ou non thyroïdiennes et même quelquefois chez des sujets sains (19-20).

La fréquence de ces auto-anticorps est d'environ 1/1000 dans la population générale est plus importante dans les pathologies auto-immunes.

### **Mécanisme d'action**

L'interférence observée (positive ou négative) dépendra de la méthode de séparation des formes libres et liées.

- Avec les techniques de type « ELISA » en une seule étape, ces auto-anticorps en se fixant sur l'hormone marquée diminuent la disponibilité du traceur pour l'antisérum, entraînant une augmentation artificielle des hormones libres.

- Avec certaines techniques radioimmunologiques, où le complexe analyte-immunoglobuline anti-analyte est retrouvée avec la fraction liée, on observe une diminution des valeurs.

Les techniques en deux temps (immunoextraction de l'hormone libre, suivie de lavages, puis de l'addition du marqueur), ou les techniques reposant sur le principe d'une compétition vis-à-vis d'anticorps marqués sont moins "sensibles" à la présence de ces auto-anticorps (20-21-22).

### **Mise en évidence**

Ces auto-anticorps sont mis en évidence par la mesure du pourcentage des hormones T3 ou T4 radioactives précipitées par le polyéthylène glycol à 20%.

## **II.2. Anti-TSH**

Les anticorps anti-TSH (synthétisés à la suite de l'introduction de TSH dans l'organisme dans un but thérapeutique) se fixent sur la TSH à doser et inhibent la fixation de l'analyte sur les anticorps réactifs. On aura une sous-estimation des résultats avec les techniques immunométrique.

## **III. MOLECULES ANORMALES**

---

### **Dysalbumine et dosage de T4 libre**

La présence d'une dysalbuminémie, anomalie de l'albumine se caractérisant par une affinité anormale de cette protéine pour la T4 marquée peut entraîner une augmentation artificielle de la T4 libre avec les techniques de dosage en un temps (20).

## **IV. INTERFERENCES SPECIFIQUES PAR ANALOGIE DE STRUCTURE**

---

Lorsque le sérum contient des molécules proches structurellement de l'analyte à doser, on pourra observer une surestimation des résultats par suite de réactions croisées entre ces molécules et l'antisérum : *interférences médicamenteuses et situations pathologiques particulières*.

### **IV.1. Interférences médicamenteuses**

Certaines de ces interférences sont bien connues, parmi lesquelles :

- Triac (acide triiodothyroacétique) et dosage de **T3 totale et libre**,
- Prednisolone (et prednisone transformée en prédnisolone dans l'organisme) et dosage direct du **cortisol**,
- Progestérone orale et dosage direct de la **progestérone** (lorsque l'antisérum présente des réactions croisées avec les métabolites réduits de cette molécule),
- 17  $\beta$  estradiol micronisé et dosage direct de **l'estradiol**, par suite de réactions croisées avec les métabolites (23).

### **IV.2. Situations pathologiques particulières**

Le choix d'une technique de dosage des stéroïdes sériques (dosage immunologique direct ou dosage après extraction et séparation chromatographique) devra tenir compte des situations physiopathologiques, du sexe et de l'âge qui vont modifier les concentrations relatives du stéroïde et de ses métabolites (24).

### **- Cortisol**

Le dosage direct de la cortisolémie est surestimé :

- en cas de forte augmentation des précurseurs (17 hydroxy-progesterone, 11 désoxycortisol) qui présentent des réactions croisées avec les antisérums anti-cortisol ; ces situations se rencontrent lors de déficit enzymatique des surrénales, en particulier déficit en 21 hydroxylase et au cours du test à la métopirone
- en cas d'accumulation des stéroïdes conjugués et non conjugués, au cours de l'insuffisance rénale chronique (25).

- **Testostérone**, le dosage direct sera surestimé chez la femme en raison des réactions croisées en général importantes avec la dihydrotestostérone (qui représente environ 50% de la concentration en testostérone). Le dosage direct est également surestimé chez l'homme traité par la dihydrotestostérone.

## **MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERFERENCE**

Lorsque le résultat trouvé ne correspond pas au résultat attendu, des tests simples de dilution et de surcharge peuvent permettre de mettre en évidence des problèmes d'exactitude (26).

### **- Test de dilution**

Un test de dilution non linéaire permettra de mettre en évidence :

- un effet crochet
- une différence d'affinité de l'anticorps entre l'antigène à doser et l'antigène de l'échantillon (soit en raison d'une différence de structure, soit en raison de la présence d'une substance interférente).

### **- Test de surcharge**

Ce test est réalisé en mélangeant le sérum et l'étalon le plus élevé ; l'obtention d'une valeur plus faible que celle attendue doit faire suspecter également la présence d'une substance interférente.

### **Tests particuliers**

Par ailleurs, la recherche des facteurs rhumatoïdes est possible (test de Waaler-Rose, test au latex) ainsi que celle des "HAMA" à l'aide de trousses commerciales.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Hodgson D, Meguid S, Giannopoulos P, Boscato L, Lazarus L (1993) Incomplete separation of erythrocytes from serum causes significant error in the IMx free triiodothyronine assay. *Clin. Chem.* 39/5, 908-909
2. Yvert JP (1989) De la bonne qualité des prélèvements biochimiques. 1. Principales hormones et substances apparentées. *Revue Française des Laboratoires.* 184, 81-88
3. Chambon C, Valat C, Besnard JC (1986) Conservation des prélèvements sanguins destinés aux dosages radio-immunologiques (sang complet, plasma à différentes températures). *Trait d'union* 1, 29-32
4. Bangham DR (1982) Update on standardization and standards in : Hunter WM, Corrie JET. *Immunoassays for clinical chemistry*, second edition, Churchill Livingstone pp 27-44
5. Kohler G, Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
6. Blacker C, Feinstein MC, Gervasi G (1990) Multiplicité des prolactines : conséquences pratiques, *Immunoanal. Biol. Spéc.* 22, 53-57
7. Snyder PJ, Bachey HM, Montecinos A, Odell WD, Spitalnik SL (1989) Secretion of multiple forms of human luteinizing hormone by cultured fetal pituitary cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 1033-1039
8. Roger M (1990) Le dosage des gonadotropines en 1990. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 22, 59-65
9. Masseyeff R, Ferrua B (1987) Les erreurs par défaut en grand excès d'antigène : phénomène de prozone et "hook effect". *Immunanal. Biol. Spéc.* 6, 23-26
10. Colas Linhart N (1989) Influence du traitement préliminaire des échantillons : dilution, rôle du diluant. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 15, 13-18
11. Daspét JP, Chatelain F, Baud M (1989) Pièges en immunoanalyse : causes d'erreurs associées au traitement informatique des courbes de calibration. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 15, 51-17
12. Grassi J (1994) Interférences dues aux anticorps anti-immunoglobulines, un poison pour tous les dosages immunologiques. I. Origine des anticorps anti-Immunoglobulines et mécanisme des interférences. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 9, 60-67
13. Boscato LM, Stuart MC (1986) Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin. Chem.* 32/8, 1491-1495
14. Clark PM, Raggatt PR, Price CP (1985) Antibodies Interfering in Immunometric Assays. *Clin. Chem.* 31/10, 1762
15. Grassi J (1994) Interférences dues aux anticorps anti-immunoglobulines, un poison pour tous les dosages immunologiques. II. Interférences, mises en évidence et suppression. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 9, 124-133
16. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC (1985) Human antimurine immunoglobuline responses in patients receiving monoclonal antibody Therapy. *Cancer Research.* 45, 879-885
17. Primus FJ, Kelley EA, Hansen HJ, Goldenberg DM (1988) "Sandwich" - type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin. Chem.* 34/2, 261-264
18. Turpeinen U, Lehtovirta P, Alfthan H, Stenman UH (1990) Interference by human anti-mouse antibodies in CA 125 assays after immunoscintigraphy : anti-idiotypic antibodies not neutralized by mouse IgG but removed by chromatography. *Clin Chem.* 36/7, 1333-1338
19. John R, Henley R, Shankland D (1990) Concentration of free thyroxin and free triiodothyronine in serum of patients with thyroxin and triiodothyronine binding autoantibodies. *Clin. Chem.* 36/3, 470-473

20. Sapin R, Gasser F (1986) Autoanticorps anti-T4 et hyperthyroxinémie familiale avec dysalbuminémie : identification et incidence sur le dosage de T4 libre. *Trait d'union*. 4,33-34
21. Sapin R, Gasser F, Schlienger JL, Chambron J (1993) Dosages de la triiodothyronine libre utilisant un anticorps marqué : évaluation et comparaison à un dosage avec traceur analogue, *Ann. Biol. Clin.* 51, 13-18
22. Sheehan CP, Christofides ND (1992) One-step, labeled-antibody assay for measuring free thyroxin. II. Performance in a multicenter trial. *Clin. Chem.* 38/1, 19-25
23. Thomas C, Vandenberg RJ, Segers M, Bartelink ML, Thien T (1993) Inaccurate measurement of 17 $\beta$ -estradiol in serum of female volunteers after oral administration of milligram amounts of micronized 17 $\beta$ -estradiol. *Clin. Chem.* 39/11, 2341-2342
24. Fiet J, Galons H, Villette JM, Boudou P et al. (1990) Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 22, 41-52
25. Nolan GE, Smith JB, Chavre VJ, Jubiz W (1981) Spurious overestimation of plasma cortisol in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52/6, 1242-1245
26. Baud M, Cohen R, Ingrand J (1991) Pièges et problèmes en immunoanalyse. XXX<sup>e</sup> Colloque Médecine Nucléaire VIII<sup>e</sup> Colloque CORATA Montpellier, 16-19 octobre, p 55

# PROBLEMES LIES AU MARQUEUR ET A SON SIGNAL EN IMMUNOANALYSE

R. BADOR

## INTRODUCTION

---

Au cours des deux dernières décennies on a assisté à un essor considérable de l'immunoanalyse, avec un élargissement sans cesse croissant de son champ d'application et une diffusion de plus en plus grande dans les laboratoires d'analyses. Cet essor a été favorisé principalement par l'apparition des anticorps monoclonaux et par l'utilisation des marqueurs non radioactifs encore appelés marqueurs froids.

L'immunoanalyse regroupe un ensemble de méthodes d'analyse chimique dans lesquelles la spécificité de détection d'une espèce moléculaire est due à sa liaison *in vitro* avec un ou plusieurs anticorps spécifiques. Afin de quantifier la formation du complexe antigène-anticorps, la plupart des techniques courantes emploient un marqueur. D'une manière générale, on peut définir un marqueur pour immunodosage comme étant une entité (atome, molécule, ion, ...) liée chimiquement à un antigène ou à un anticorps et délivrant un signal, direct ou indirect, quantitativement mesurable.

Les techniques d'immunodosages, comme toute technique d'analyse, peuvent être évaluées au moyen d'un certain nombre de critères de qualité : précision, exactitude, détectabilité (ou limite de détection). A ces critères statistiques classiques bien définis, il faut ajouter d'autres caractéristiques importantes : étendue de la gamme de concentration accessible (dynamique du dosage) et praticabilité (degré d'automatisation, temps d'analyse, conservation des réactifs,...).

Quelle est l'influence du marqueur et de son signal sur la qualité globale d'un immunodosage ? C'est la question à laquelle tente de répondre les lignes qui suivent.

## LES MARQUEURS

---

Les principaux marqueurs utilisés en immunoanalyse courante sont :

- les radioéléments dans les techniques RIA (radioimmunoassay) et IRMA (immunoradiometric assay),
- les enzymes dans les techniques EIA (enzymimmunoassay) et IEMA (immunoenzymometric assay),
- les fluorophores dans les techniques FIA (fluoroimmunoassay) et IFMA (immunofluorometric assay),
- les molécules chimiluminescentes dans les techniques CLIA (chemiluminoimmunoassay) et ICMA (immunochemiluminometric assay).

Les fluorophores et les molécules chimiluminescentes sont souvent regroupés sous la dénomination plus générale de luminophores, c'est-à-dire groupements chimiques susceptibles d'émettre un signal lumineux sous l'effet d'une excitation appropriée, lumineuse dans le premier cas, chimique dans le second cas.

Outre la distinction habituelle entre méthodes de compétition et méthodes immunométriques à deux anticorps, il existe un autre niveau de classification des immunodosages faisant intervenir la nécessité ou non d'une séparation physique des formes libre et liée avant la mesure du signal. Pour cette raison, on parle d'immunodosages en phase hétérogène et d'immunodosages en phase homogène, ces derniers ne pouvant être mis en œuvre que si le marqueur délivre un signal modulé par la formation du complexe antigène-anticorps.

Les marqueurs peuvent également être classés selon leur nature chimique. Il peut s'agir d'atomes ( $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ), d'ions ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $^{57}\text{Co}^{3+}$ ), de molécules organiques de faible masse molaire (fluorescéine, ester d'acridinium, ...) ou de molécules de masse molaire élevée (enzymes).

Les différents marqueurs pour immunoanalyse doivent posséder un certain nombre de qualités générales. En premier lieu, leur liaison chimique à une molécule d'antigène (traceur) ou d'anticorps (anticorps de révélation) doit perturber le moins possible la formation du complexe antigène-anticorps. De plus, le signal physique émis doit avoir une intensité (par unité de concentration de marqueur) élevée, propriété dont dépendent étroitement la précision des mesures et la limite de détection du marqueur. Enfin, la spécificité du signal est une propriété essentielle garantissant un faible bruit de fond des mesures, donc contribuant également à une bonne détectabilité. Outre les trois qualités citées précédemment, il est souhaitable qu'un marqueur soit détectable quantitativement sur une large gamme de concentration, c'est-à-dire que son signal possède une grande dynamique ; cette propriété est liée à la fois à la nature du signal physique lui-même et à l'appareil de mesure pouvant présenter un niveau de saturation.

La figure 1 met en évidence les critères de qualité caractérisant la détection intrinsèque des marqueurs (ou des molécules marquées), sans prendre en compte les autres sources de variabilité des immunodosages. La sensibilité  $dS/dC$  est constante dans toute la zone de proportionnalité et diminue au voisinage de la zone de saturation. L'erreur  $\Delta C$  sur la concentration dépend à la fois de la variabilité du signal exprimée ici par  $\Delta S$  et de la sensibilité  $dS/dC$ , puisque  $\Delta C = \Delta S \cdot (dS/dC)^{-1}$ . La limite de détection LD, où concentration minimale détectable, dépend à la fois de l'incertitude  $ks_0$  sur le bruit de fond  $S_0$  et de la sensibilité à l'origine  $(dS/dC)_0$  :  $LD = ks_0 (dS/dC)_0^{-1}$ . Le signal minimum net détectable est estimé en multipliant l'écart type  $s_0$  sur le bruit de fond par le coefficient  $k$  nécessaire pour considérer que la mesure effectuée est significativement supérieure à  $S_0$ .

## ■ LES DIFFERENTS SIGNAUX

---

Tout marqueur émet un signal physique direct ou indirect, spontané ou provoqué, sensible ou non à l'environnement physico-chimique. Ce signal physique est mesuré au moyen d'un instrument qui le convertit en un signal électrique lui-même transformé ensuite en un signal numérique. Au cours de ces opérations de conversion apparaissent différents « bruits » qui s'ajoutent au signal net pour donner un signal numérique brut  $S$  (voir figure 2). Selon la nature du marqueur et le principe de sa détection les contributions relatives des différents « bruits » sont variables.

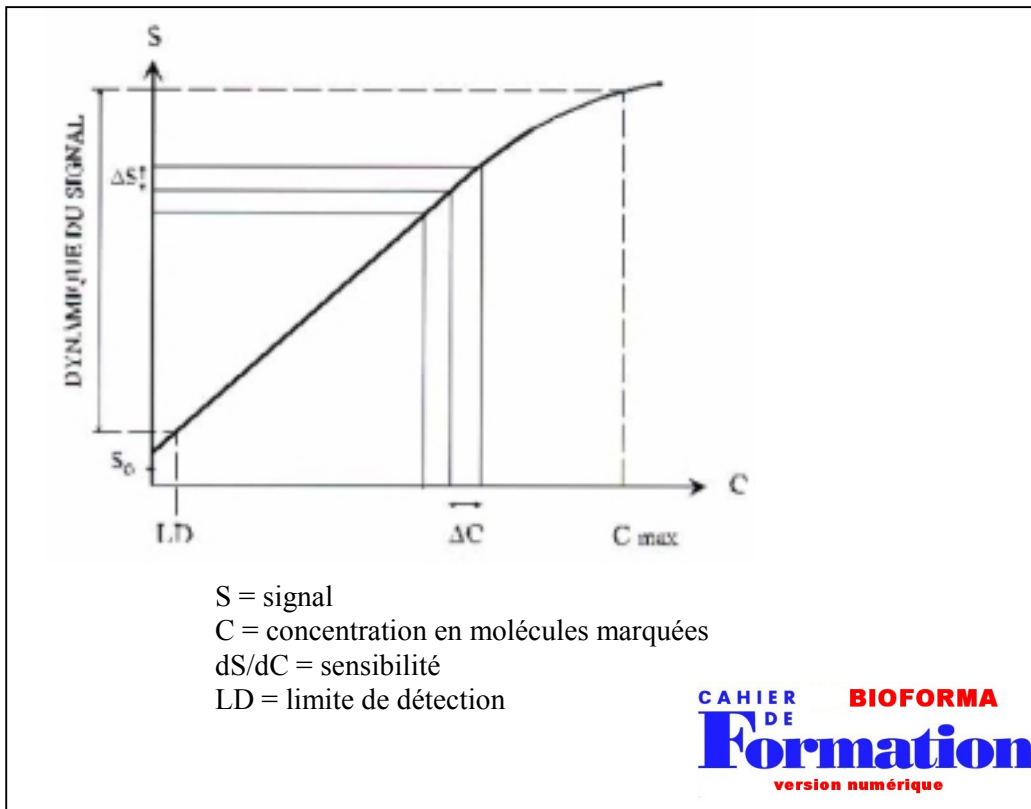


Figure 1 : Relation entre signal et concentration en molécules marquées

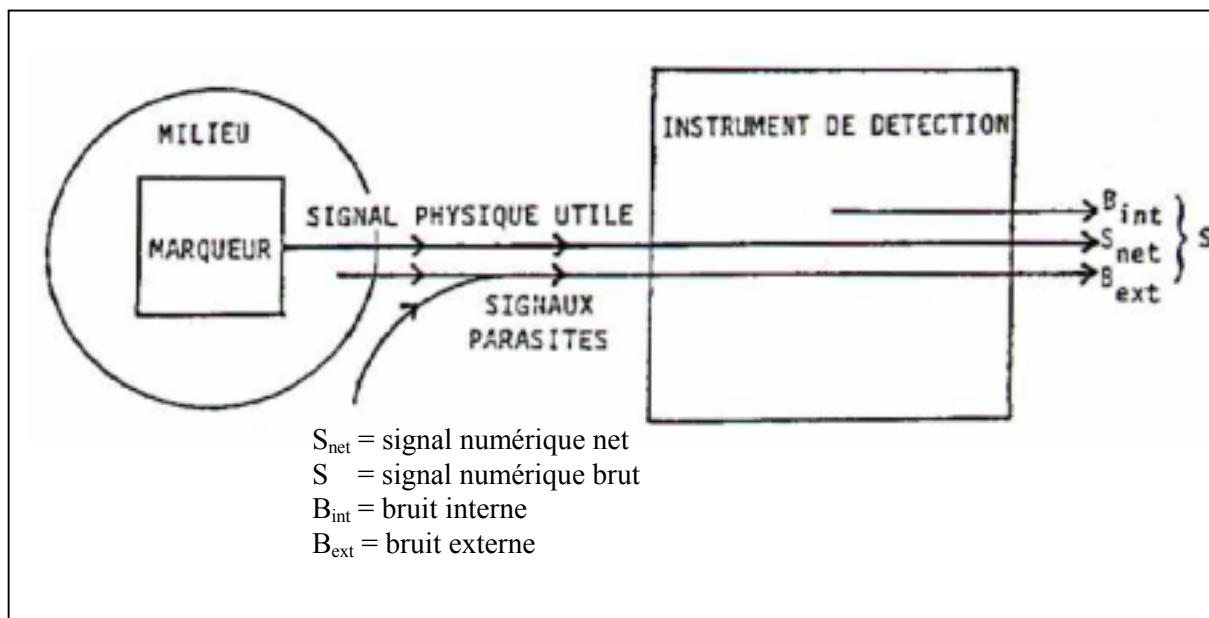


Figure 2 : Signal et bruits lors de la détection d'un marqueur



## Le signal radioactif

En immunoanalyse, les deux principaux radioéléments marqueurs étant l'iode 125 et le tritium, le signal consiste donc soit en une émission de photons X et  $\gamma$ , soit en une émission de particules  $\beta$  : ces deux types d'émission sont aisément détectables au moyen de spectromètres appropriés. On utilise parfois le Cobalt 57 émetteur  $\gamma$  dans le cas des dosages simultanés.

Le Signal physique lui-même est un signal direct (directement émis par le marqueur), spontané (ne faisant pas intervenir une source d'énergie externe) et très spécifique (les rayonnements parasites ou les contaminations étant exceptionnels) ; son émission est indépendante du milieu, l'activité (amplitude du signal physique) étant seulement proportionnelle au nombre de molécules marquées. D'autre part, la détection de ce signal est une détection numérique (comptage d'impulsions), donc facilement corrigée du bruit de fond résiduel.

Le tableau suivant indique les limites de détection (LD) des espèces marquées avec de l'iode 125 et avec du tritium.

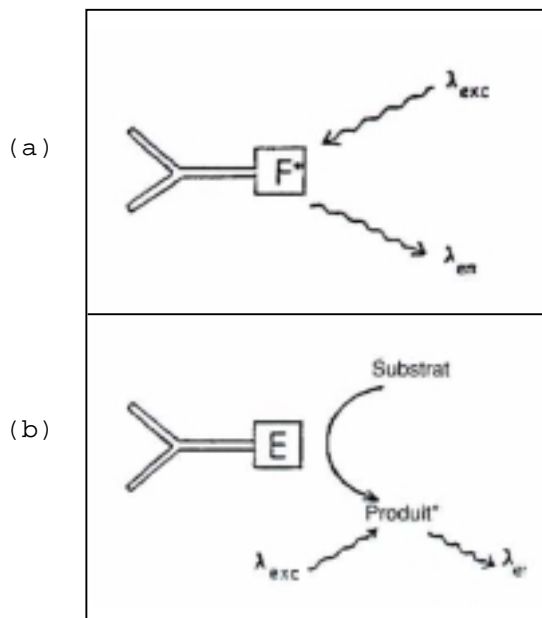
LD ABSOLUES DES ESPECES MARQUEES		
$^{125}\text{I}$	2000 Ci / mmol BF = 35 cpm t $\approx$ min	} LD $\approx 10^{-18}$ mol
$^3\text{H}$	100 Ci / mmol BF = 25 cpm t $\approx$ min	} $10^{-16}$ mol < LD < $10^{-17}$ mol

Par rapport aux autres marqueurs, en particulier les enzymes, le marqueur radioactif présente aussi l'avantage d'un faible encombrement stérique.

Malgré ces propriétés très favorables, il existe certains inconvénients dans l'utilisation des molécules radiomarquées : d'une part, le temps d'acquisition du signal doit être suffisamment long pour obtenir une précision et une limite de détection satisfaisantes, d'autre part le phénomène de décroissance radioactive, et éventuellement la radiolyse, limitent la durée de conservation des molécules marquées.

## Le signal fluorescent direct

En immunoanalyse, le signal fluorescent peut être produit soit directement par le marqueur lui-même (fluorophore lié à un antigène ou à un anticorps), soit indirectement à la suite de la transformation d'un substrat fluorigène en un produit fluorescent par une enzyme spécifique employée comme marqueur (figure 3).



**Figure 3 :**  
*Emission du signal fluorescent.*  
(a) *émission directe*  
( $F^*$  = fluorophore)  
(b) *émission indirecte*  
( $E$  = enzyme)

Dans le cas du marquage fluorescent, le signal lumineux émis par le marqueur est un signal direct, provoqué par une excitation photonique. L'amplitude  $S_F$  du signal reçu par le détecteur peut s'exprimer sous la forme :

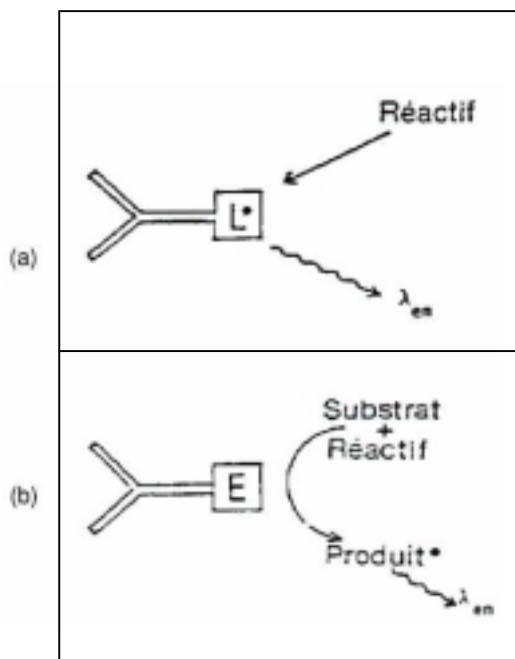
$$S_F = k \cdot \Phi_0 \cdot \epsilon \cdot Q \cdot N$$

où  $k$  est un facteur géométrique,  $\Phi_0$  le flux excitateur,  $\epsilon$  l'absorptivité molaire du fluorophore,  $Q$  le rendement quantique du fluorophore et  $N$  le nombre de molécules marquées.

Par rapport au signal radioactif, on constate l'existence de deux causes de variabilité supplémentaires :  $\Phi_0$  n'est jamais parfaitement constant puisque toutes les sources lumineuses excitatrices sont susceptibles de fluctuation,  $Q$  dépend de la composition du milieu. En outre se pose le problème de la spécificité du signal et de la sélectivité de sa détection en raison de l'interférence possible de fluorescences parasites et de rayonnements diffusés ; ce problème ne peut être résolu dans le cas des fluorophores classiques comme la fluorescéine et la méthylombelliférone. Seul l'emploi des chélates d'euporium a permis, grâce à la technique de fluorimétrie pulsée, de s'affranchir à la fois des rayonnements parasites et du bruit interne du détecteur, avec pour conséquence une limite de détection très favorable (environ  $10^{-18}$  mol). Les principaux avantages du marquage fluorescent sont : un temps d'acquisition du signal très bref et une dynamique de détection pouvant atteindre cinq ordres de grandeur.

## Le signal chimiluminescent direct

Comme dans le cas du signal fluorescent, l'émission lumineuse peut provenir soit du marqueur (luminophore) réagissant directement avec un réactif en excès, soit d'une espèce moléculaire transformée par une enzyme spécifique utilisée comme marqueur (**figure 4**).



**Figure 4 :**  
*Mode d'émission du signal chimiluminescent.*  
 (a) *émission directe par le marqueur (L\*)*  
 (b) *émission indirecte grâce à un marqueur enzymatique (E)*

Dans le premier cas on a affaire à un signal direct, provoqué par une réaction chimique. L'amplitude du signal  $S_{CL}$  reçu par le détecteur à un instant  $t$  après l'injection du réactif peut s'exprimer sous la forme :

$$S_{CL} = k.Q. \frac{dN}{dt}$$

$k$ ,  $Q$  et  $N$  ayant la même signification que précédemment,  $\frac{dN}{dt}$  étant la vitesse de réaction chimique.

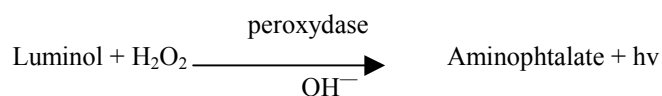
Il existe différentes causes de variabilité de  $S_{CL}$  : le rendement quantique et la vitesse de réaction dépendent de la composition du milieu ; le volume de réactif et l'instant du début de la détection ne peuvent être parfaitement reproductibles. En revanche la spécificité de l'émission, donc la sélectivité de la détection, est meilleure que celle du signal fluorescent puisqu'il n'y a pas de source de lumière parasite. Il faut également noter que le bruit interne du détecteur peut être en grande partie supprimé lorsqu'on emploie la technique du comptage de photons grâce à laquelle la limite de détection atteint dans certains cas  $10^{-19}$  mol.

Les avantages du marquage chimiluminescent sont les mêmes que ceux du marquage fluorescent en ce qui concerne le temps d'acquisition du signal et la dynamique de détection. L'inconvénient majeur en est la fugacité de l'émission qui a pour conséquence l'impossibilité de vérifier une mesure effectuée sur un tube.

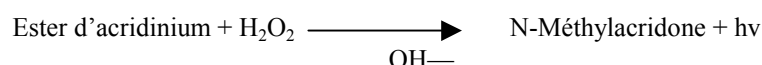
Le tableau suivant présente les principaux marqueurs chimiluminescents (en marquage direct) ainsi que les réactions de chimiluminescence.

## PRINCIPAUX MARQUEURS CHIMILUMINESCENTS

- PHTALHYDRAZIDES : LUMINOL, ISOLUMINOL, DERIVES

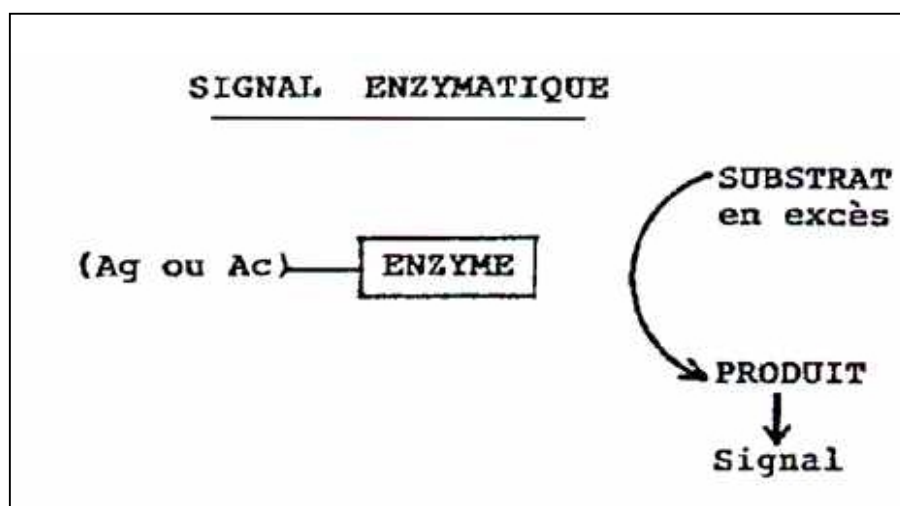


- ESTERS D'ACRIDINIUM



### Le signal enzymatique

Les marqueurs enzymatiques n'émettent pas un signal physique direct, ils sont détectés par l'intermédiaire d'un substrat spécifique en excès qui est transformé en un produit émettant un signal physique dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité du marqueur enzymatique et au temps d'incubation. Le signal enzymatique est donc un signal indirect, soit d'émission lorsque le produit formé est fluorescent ou chimiluminescent, soit d'absorption lorsque le produit formé est détecté par une mesure d'absorbance à une longueur d'onde caractéristique (**Figures 5 et 6**).



*Figure 5 : Principe d'émission du signal enzymatique*

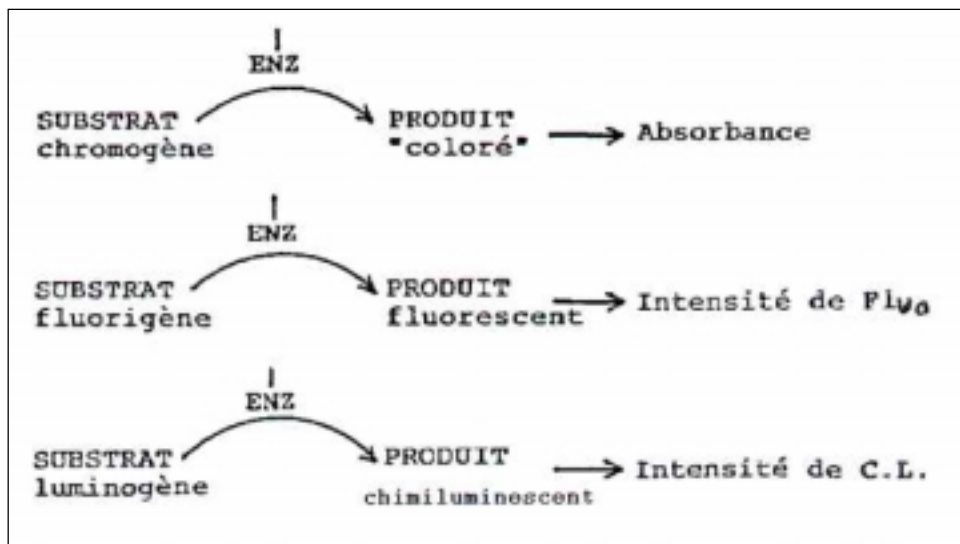


Figure 6 : Différentes possibilités de mesure du signal enzymatique

Lorsqu'on procède à des mesures fluorimétriques ou luminométriques, on retrouve les causes de variabilité citées précédemment auxquelles s'ajoute la variabilité de la réaction enzymatique elle-même. Quant aux mesures photométriques d'absorption les plus fréquemment employées, elles souffrent en plus d'un certain manque de spécificité (influence des bulles, imperfections des tubes de mesure, ...) et d'une dynamique réduite.

Cependant, malgré ces inconvénients, le marquage enzymatique est le seul à offrir la possibilité d'amplification du signal par simple augmentation du temps d'incubation de l'étape de révélation.

Le tableau suivant présente les principales enzymes utilisées en immunoanalyse ainsi que les modes de détection possibles (photométrie d'absorption, fluorimétrie, luminométrie).

PRINCIPALES ENZYMES UTILISEES EN I.A.			
	Détection		
	<u>Absorption</u>	<u>Fluo.</u>	<u>C.L.</u>
Peroxydase de raifort (HRP)	+		+
Phosphatase alcaline	+	+	+
$\beta$ -D-Galactosidase ( $\beta$ GAL)	+	+	+
Glucose 6 Phosphate déshydrogénase (G6PD)	+		+

Les deux enzymes les plus employées sont la peroxydase de raifort qui peut être révélée par mesure photométrique d'absorption et par chimiluminométrie et la phosphatase alcaline qui offre les trois possibilités de détection : absorption, fluorescence et chimiluminescence.

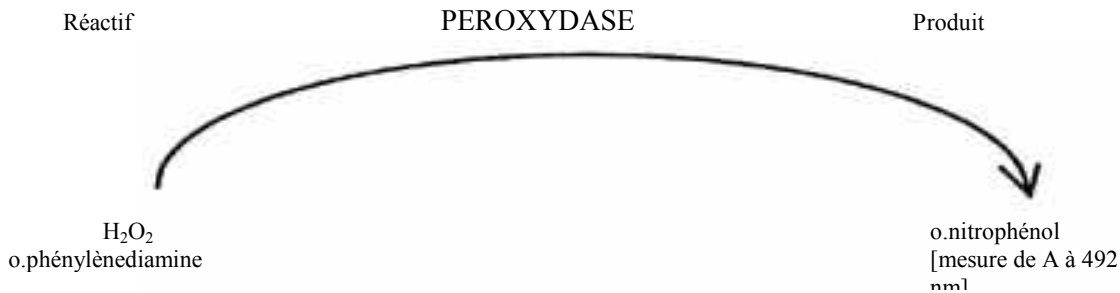
Signalons que la malate déshydrogénase est utilisée dans les méthodes de compétition en phase homogène.

Cette liste n'est pas exhaustive, on peut citer également le lysozyme, l'acétylcholine-estérase, ...

Trois exemples de révélation du signal enzymatique sont présentés ci-après.

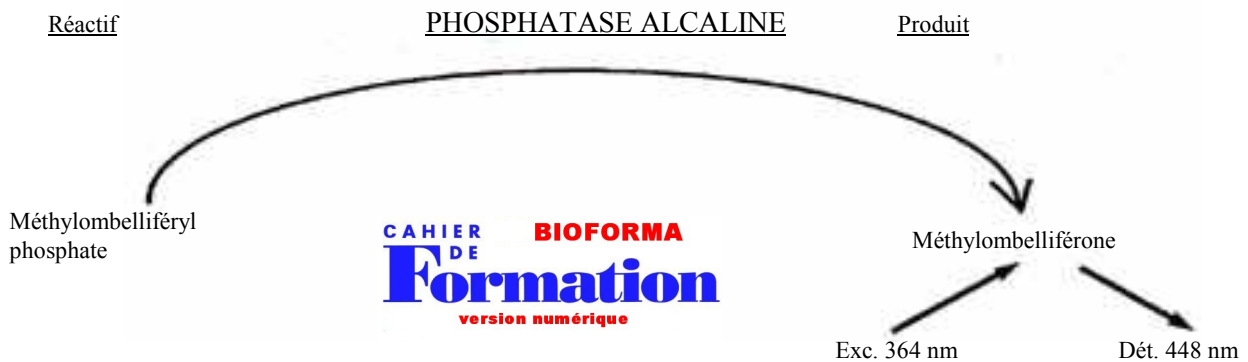
Premier exemple : révélation photométrique d'absorption de la PEROXYDASE au moyen d'un réactif contenant de l'o.phénylènediamine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le mesure d'absorbance est effectuée à 492 nm, après 30 minutes d'incubation.



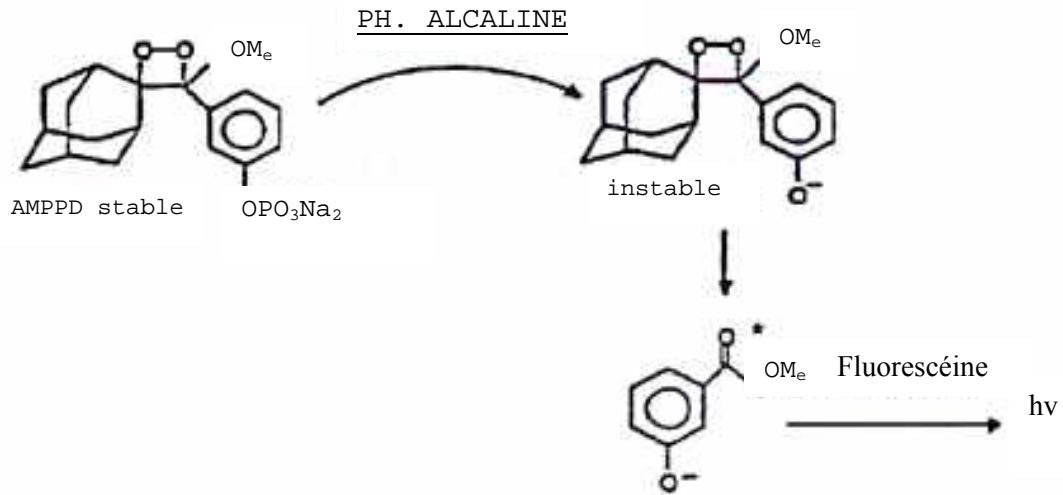
La dynamique de la mesure couvre environ trois ordres de grandeur (de 2.10<sup>-3</sup> u. d'absorbance jusqu'à 2). La limite de détection de la peroxydase peut être estimée à 10<sup>-17</sup> mol par cette méthode de révélation.

Deuxième exemple : révélation fluorimétrique de la phosphatase alcaline au moyen d'un substrat fluorigène, le méthyl ombelliféryl phosphate non fluorescent qui est transformé en méthyl ombelliféronne fluorescente.



La dynamique de mesure est plus grande que par photométrie d'absorption : au moins quatre ordres de grandeur. La limite de détection de la phosphatase alcaline peut être estimée à une valeur inférieure à 10<sup>-17</sup> mol.

Troisième exemple : révélation chimiluminométrique de la phosphatase alcaline au moyen d'un Phényl Phosphate Dioxétane substitué, l'AMPPD (adamantyl méthoxyphénylphosphate dioxétane) qui est stable chimiquement. Après action de la phosphatase alcaline, le produit formé est un dioxétane instable qui se décompose en formant une espèce excitée. Par transfert d'énergie, l'énergie d'excitation de cette espèce est communiquée à des molécules de fluorescéine présentes dans le milieu de révélation.



Avec ce système la limite de détection atteinte est de l'ordre de  $10^{-21}$  mol de phosphatase alcaline. Par comptage de photons, la dynamique de mesure peut atteindre cinq ordres de grandeur.

## CLASSIFICATION DES AUTOMATES D'IMMUNOANALYSE EN FONCTION DU SIGNAL

---

Seuls sont cités ici les automates les plus utilisés par les participants à l'opération de contrôle de qualité national qui a eu lieu en juin 1994.

### Systèmes utilisant un signal d'absorption

Automate	Marqueur	Chromogène
- BIOTROL "7000 S"	PAL	BNPP
- BOEHRINGER "ES 300/600/700"	HRP	ABTS
- CIS BIO INT. "Cispack 4200"	HRP	OPD
- ROCHE DIAGNOSTIC SYST. "Cobas Core"	HRP	TMB
- SERONO DIAGNOSTICS "SR1"	PAL	PNPP

### Systèmes utilisant un signal fluorescent direct

Automate	Marqueur
- ABBOTT "TDX"	Fluorescéine
- BEHRING DIAGNOSTIC "Opus"	Rhodamine
- KABI PHARMACIA "Autodelfia"	Eu <sup>3+</sup>

### Systèmes utilisant un signal fluorescent indirect

Automate	Marqueur	Fluorigène
- ABBOTT "IMX"	PAL	4MUP
- BAXTER "Stratus"	PAL	4MUP
- BEHRING DIAGNOSTIC "Opus"	PAL	4MUP
- BIOMERIEUX "Vidas"	PAL	4MUP
- EUROGENETICS "AIA 600/1200"	PAL	4MUP

### Systèmes utilisant un signal chimiluminescent direct

Automate	Marqueur
- CIBA CORNING DIAG. "Magic Lite"	Ester d'acridinium
- CIBA CORNING DIAG. "ACS 180"	Ester d'acridinium
- BEHRING DIAGNOSTIC "Berilux"	Acridinium acyl sulfonamide

*Abréviations employées dans le tableau ci-dessus : PAL phosphatase alcaline, PNPP paranitrophényl phosphate, HRP peroxydase de raifort, ABTS azino-di-[éthylbenzothiazoliny]l sulfonate], OPD orthophénylènediamine, TMB tetraméthylbenzidine, 4MUP 4-méthylombelliféryl phosphate.*



Si l'on compare les qualités intrinsèques des signaux des différents marqueurs, il apparaît que la plus faible variabilité dans les mesures est obtenue avec le signal radioactif, que les meilleures limites de détection des espèces marquées sont atteintes grâce au signal chimiluminescent (direct ou enzymatique), que la plus grande dynamique de mesure est obtenue avec le signal fluorescent résolu en temps et avec le signal chimiluminescent.

L'ensemble des trois critères précédents est à prendre en considération pour les dosages immunométriques à deux anticorps, mais il est bien évident que pour les méthodes de compétition c'est le premier critère qui prévaut. Donc, dans la mesure où la limite de détection du marqueur et la dynamique de son signal ne sont pas des facteurs limitants, le critère "variabilité" est sans aucun doute le plus important, ce qui situe le marqueur radioactif en position privilégiée.

Cependant un immunodosage ne se résume pas à la seule étape de détection d'une espèce marquée, il fait intervenir des étapes immunochimiques préalables, si bien que les critères de qualité habituellement déterminés pour évaluer un dosage sont liés à sa variabilité totale qui est la somme de la variabilité immunochimique, de la variabilité d'émission du signal et de la variabilité de mesure de ce signal.

La qualité globale propre d'un système d'immunoanalyse, en faisant abstraction de l'influence de l'opérateur, dépend donc de trois facteurs principaux : le système immunologique, la phase solide (sauf pour les méthodes en phase homogène) et le marqueur ainsi que son système de détection. En conséquence, la nature du signal n'est qu'un paramètre parmi d'autres, et l'examen attentif des résultats du contrôle de qualité semble indiquer que le marqueur n'est probablement pas l'élément prépondérant entraînant la plus ou moins bonne qualité d'une technique. Dans cet exposé, on a fait volontairement abstraction des conditions opératoires qui jouent cependant un rôle capital dans la qualité des dosages : en particulier le travail en tubes simples induit une variabilité des résultats plus grande que si les mesures sont effectuées sur "doublets".

Dans l'état actuel des techniques d'immunoanalyse, il est impossible d'affirmer qu'une méthode est meilleure qu'une autre à partir de la seule prise en compte de la nature du marqueur et de son signal.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. D.W. CHAN, M.T. PERLSTEIN, *Immunoassay, a practical guide*. Academic Press, 1987.
2. W.P. COLLINS. *Alternative Immunoassays*. John Wiley and sons, 1985.
3. Y. BARBIER. *Les immunodosages, de la théorie à la pratique*. Editions de l'Acomen, 1989.
4. P. TIJSEN. *Practice and theory of enzyme immunoassays*. Elsevier, 1985.
5. R. MASSEYEFF. Propositions pour une classification et une terminologie de l'immuno-analyse. In "Instrumentation en biochimie clinique", Monographie SFBC, 1989, 128-133.
6. J.P. YVERT, B. CAPOLAGHI, A. TRUCHAUD. Classification des systèmes d'immuno-analyse en fonction du signal. *Spectra Biologie*, 92, 1992, 53-58.
7. I. HEMMILA. Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays. *Clinical Chemistry*, 31, 1985, 359-367.

## **ANALYTES**

**CA 19-9**

**PSA**

**hCG -  $\beta$ hCG**

**TSH**

# ANTIGÈNE CARBOHYDRATE 19-9 (CA 19-9)

A. BEAUDONNET, R. COHEN

CAHIER DE **BIOFORMA**  
**Formation**  
version numérique

## I. INTERÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

---

En 1979, Koprowski et al. (1) ont mis en évidence un antigène dénommé antigène carbohydrate 19-9 (CA 19-9) ou GICA (gastrointestinal carbohydrate antigen) grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal obtenu à partir d'une lignée cellulaire provenant d'un carcinome colorectal humain (SW 1116).

Le CA 19-9 est présent dans de nombreux tissus fœtaux et dans différents tissus sains de l'adulte : épithéliums glandulaires du pancréas, foie, voies biliaires, estomac, poumons, canaux des glandes salivaires et la prostate (2). L'antigène est détectable dans le sérum, le lait, le plasma séminal, les sucs gastrique et pancréatique ainsi que dans la salive.

Le CA 19-9 sérique augmente chez les patients atteints de **tumeurs du tractus digestif** (voies biliaires, foie, estomac, intestin) et **en particulier chez les patients atteints de carcinome du pancréas**.

Dans les cancers du pancréas, le dosage de cet antigène associé aux techniques d'imagerie est une aide au diagnostic. Le CA 19-9 a une valeur pronostique et son principal intérêt réside dans la surveillance thérapeutique et la mise en évidence de récidives.

Dans les cancers colorectaux, les cancers des voies biliaires et de l'estomac, la fréquence de positivité du CA 19-9 est moindre. Son dosage est également utile dans le suivi de ces tumeurs. Une augmentation du CA 19-9 peut être également observée dans les cancers de l'ovaire et broncho-pulmonaire.

Le CA 19-9 n'est pas un marqueur spécifique du cancer, en effet, il peut être élevé au cours de **maladies bénignes digestives** (pancréatites, hépatites aiguës ou chroniques, lithiases biliaires) ainsi qu'au cours de la **mucoviscidose et du diabète**.

## II. STRUCTURE

---

Le déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal est un oligosaccharide (lacto-N-fucopentaose II sialylé) porté de manière répétitive, soit par un ganglioside à la surface des membranes cellulaires, soit par une protéine de type mucine dans le sérum (3). Cet épitope glucidique fait partie de la classe des carbohydrates du groupe sanguin Lewis.

Les premiers travaux de Koprowski indiquent que la glycoprotéine portant ce déterminant antigénique a une masse molaire de 35 000 g.mol<sup>-1</sup>. Plus récemment, Klug et al. (4) ont extrait de surnageants de cultures cellulaires de carcinome colorectal des molécules exprimant l'épitope CA 19-9 de masse molaire de 210 000 g.mol<sup>-1</sup>. Ces molécules peuvent s'agréger en donnant des polymères de masse molaire très élevée de 600 000 à 2 000 000 g.mol<sup>-1</sup>.

## III. TECHNIQUE DE DOSAGE

---

### III.1. Principe

Toutes les techniques de dosage sont de type immunométrique avec marqueur. En 1983, Del Villano et al. (5) ont mis au point une technique avec marqueur isotopique (<sup>125</sup>I). Depuis, plusieurs trousse commercialisées sont apparues utilisant différents marqueurs non isotopiques.

Lors de l'enquête du contrôle national de qualité (juin 1994), mille soixante six laboratoires ont rendu un résultat de CA 19-9. Les techniques avec détection d'un signal photométrique, fluorescent et radioactif sont utilisées par respectivement 47%, 46% et 4,5% des participants (2,5% des techniques n'étant pas codées ou insuffisamment représentées).

### III.2. Anticorps

Toutes les trousse de dosage utilisent le même anticorps monoclonal comme anticorps de capture et comme anticorps marqué. Cet anticorps est dénommé 1116-NS-19.9.

### III.3. Etalon

Actuellement, il n'existe pas d'étalon international de référence.

Les étalons sont préparés à partir d'antigène isolé extrait de surnageants de cultures cellulaires provenant d'un adénocarcinome colorectal. Cet antigène est ensuite dilué dans un "pool" de sérums humains, ou dans un mélange de protéines humaines et animales.

Les résultats de CA 19-9 sont exprimés en unités arbitraires (U/ml ou kU/l), une unité correspondant à 0,8 ng de glycoprotéine portant le déterminant antigénique.

### III.4. Causes d'erreurs

#### - Effet crochet

Lorsque la concentration en antigène est très élevée et très supérieure à celle du dernier point de la gamme d'étalonnage, on peut observer une diminution de la valeur du signal et par conséquent un résultat faussement abaissé. Les concentrations de CA 19-9 peuvent être très élevées, en particulier en cas de cancers du pancréas et peuvent atteindre 300 000 kU/l (6). Il est donc important de connaître la concentration à partir de laquelle l'effet crochet peut apparaître avec la technique utilisée, cette concentration devant être déterminée pour chaque technique.

#### - Anticorps hétérophiles

La présence d'anticorps anti-souris (HAMA) dans l'échantillon peut être à l'origine de résultats erronés (en général surestimés) avec les techniques immunométriques utilisant des anticorps monoclonaux.

## ■ IV. RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES

---

Le dosage du CA 19-9 présente actuellement une grande variabilité intertechnique. Lors de l'enquête de juin 1994, deux échantillons de contrôle ont été distribués se caractérisant par des valeurs modérément augmentées (sérum MT 18 de concentration moyenne de 60 kU/l et sérum MT 19 de concentration moyenne de 169 kU/l). Les CV tronqués toutes techniques sont respectivement de 30,5 et 25,8%. Comme on peut le voir sur la **figure 1** où sont représentées les moyennes par technique exprimées en pourcentage de la moyenne générale, deux trousse fournissent des résultats environ deux fois plus faibles que la moyenne générale. Au contraire, une autre trousse se distingue par des valeurs égales à une fois et demie la moyenne générale.

Les différences intertechniques peuvent surprendre étant donné que le même anticorps monoclonal (1116-NS-19-9) est utilisé par tous les fabricants. Les écarts observés sont expliqués par l'absence d'étalon international de référence, par les différences au niveau du marqueur, de la phase solide et des conditions expérimentales (pH, durée et température des réactions immunologiques). Par ailleurs, les écarts intertechniques plus ou moins accentués selon les échantillons de contrôle sont vraisemblablement dus à l'existence de formes de CA 19-9 plus ou moins agrégées.

Sur la **figure 2**, sont représentés les CV% tronqués obtenus par technique. On constate que 87% pour MT 18 et 75% pour MT 19 des systèmes analytiques représentés permettent d'obtenir des CV tronqués inférieurs à 10%.

Enfin, lors de cette enquête, 77,5% des laboratoires utilisaient des réactifs adaptés sur automates.

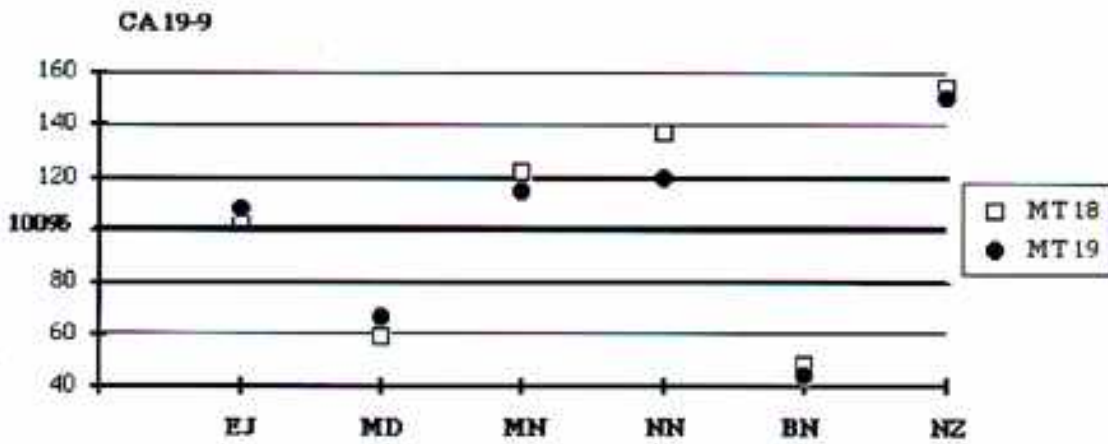


Figure 1 : Moyennes des différentes trouses exprimées en % de la moyenne générale.

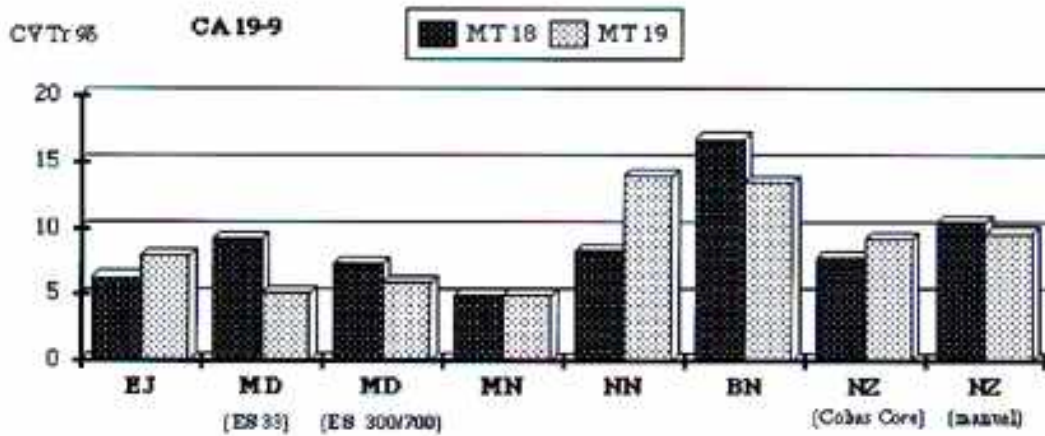


Figure 2 : Reproductibilité par technique.

## V. RESULTATS OBTENUS SUR DES SERUMS DE PATIENTS

Les études comparatives réalisées sur des sérums de patients atteints de différentes pathologies montrent des écarts inter techniques plus ou moins importants selon les trouses et/ou selon les sérums. Pour certains sérums, les écarts peuvent être considérables avec des rapports de concentration pouvant aller jusqu'à 9 (7-8-9).

## VI. ETAPES PREANALYTIQUE – CONSERVATION DES ECHANTILLONS

### VI.1. Prélèvement

Sauf indications particulières, le dosage doit être réalisé sur sérum.

Les interférences éventuelles dues à l'hémolyse, à l'hyperlipidémie, à l'hyperbilirubinémie doivent être analysées avec chaque système analytique.

## VI.2. Conservation des échantillons

Il est conseillé de conserver les sérums congelés si le dosage doit être différé de plus de vingt-quatre heures. Les cycles de congélation-décongélation doivent être évités.

## ■ VII. INTERPRETATION DES RESULTATS

---

### VII.1. Variations génétiques

Les sujets dépourvus de gènes Lewis (Lewis a- b-), soit environ 7% des individus ne peuvent synthétiser le CA 19-9 par absence de fucosyltransférase (10). Ces sujets ont un taux de CA 19-9 indétectable. Cependant, des valeurs élevées de CA 19-9 sérique et salivaire ont été observées chez des patients cancéreux Lewis a- b- (11) ; ceci pourrait s'expliquer par l'existence de deux fucosyltransférases distinctes (l'une pour la synthèse des substances du groupe Lewis, l'autre pour la synthèse du CA 19-9).

Chez les sujets Lewis a- b-, le dosage du CA 19-9 peut être remplacé par le dosage de l'antigène carbohydate 50 (CA 50) qui est un ganglioside isolé également à partir de carcinomes du tractus digestif.

### VII.2. Variations physiologiques

Age et sexe : chez l'homme, il n'y a pas de variation significative en fonction de l'âge. Par contre, selon Del Villano (5), chez la femme les valeurs sont plus élevées dans le groupe d'âge 20-29 ans et plus basses dans le groupe d'âge 60-69 ans ; par ailleurs, les valeurs observées chez les femmes de moins de 60 ans sont plus élevées que chez les hommes. Cependant, cette différence en fonction du sexe n'est pas retrouvée par tous les auteurs.

Fumeurs : contrairement à l'antigène carcinoembryonnaire, les valeurs de CA 19-9 sont identiques chez les fumeurs et les non fumeurs (12).

### VII.3. Valeurs de référence

Les écarts intertechniques sont importants et les valeurs de référence doivent être déterminées pour chaque technique. Néanmoins la valeur-seuil de 37 kU/l déterminée avec la technique immunoradiométrique de Del Villano (5) est la plus généralement utilisée comme valeur discriminante entre valeurs négative et positive (5-6-13).

### VII.4. Variations au cours des pathologies cancéreuses

Les valeurs indiquées ci-dessous sont données à titre indicatif.

#### - CA 19-9 et cancers du pancréas

L'indication de prédilection du dosage de CA 19-9 est le cancer du pancréas. Son dosage associé aux techniques d'imagerie est une aide au diagnostic, mais il ne peut être utilisé seul comme marqueur de diagnostic ou de dépistage en raison de son manque de sensibilité et de spécificité.

La valeur prédictive positive (VPP) varie selon la valeur-seuil choisie. Pour une valeur-seuil de 60 kU/l, la VPP est de 61% et pour une valeur-seuil de 120 kU/l, la VPP augmente à 79% (14).

Le CA 19-9 a une valeur pronostique. Les concentrations sont corrélées avec la taille de la tumeur (15). Les concentrations les plus élevées sont rencontrées en général chez les malades ayant une tumeur inopérable et des métastases (16). Des valeurs supérieures à 1000 kU/l indiquent la présence de métastases (17).

Le principal intérêt du CA 19-9 réside dans la surveillance thérapeutique et la mise en évidence de récidives. Une normalisation du CA 19-9 dans les trois mois suivant l'ablation de la tumeur est d'un pronostic favorable. Par contre, l'augmentation dans les mois suivant l'opération indique une récidive pouvant précéder l'apparition des signes cliniques et l'apparition d'anomalies à l'échotomographie et à la tomодensitométrie.

### - CA 19-9 et autres cancers digestifs

Au cours des cancers colorectaux, gastrique et hépatique, la fréquence de positivité est plus faible qu'au cours des cancers pancréatiques et la fréquence de positivité augmente avec le stade de l'évolution et la présence de métastases. Le dosage du CA 19-9 peut être utile au suivi de ces patients et permettre la détection de récurrences.

Dans le cancer des voies biliaires, le CA 19-9 présente une bonne sensibilité, mais une faible spécificité. L'intérêt majeur réside dans la surveillance post-chirurgicale et/ou thérapeutique.

### - CA 19-9 et autres cancers

Lors des cancers broncho-pulmonaires, le CA 19-9 peut augmenter ; mais il présente une sensibilité faible (comparable à celle de l'antigène carcinoembryonnaire) ; par ailleurs, il présente une spécificité et une VPP inférieures à celle de l'antigène carcinoembryonnaire (21).

En cas de cancer de l'ovaire (adénocarcinome de type mucineux), le CA 19-9 peut être utile au suivi de ces patients lorsque l'antigène carbohydre 125 (CA 125) est négatif.

## VII.5. Variations au cours des pathologies bénignes

Le CA 19-9 est augmenté dans environ 9% des pathologies bénignes. Ces augmentations sont en général modérées au cours des pancréatites, hépatites et cirroses (valeurs inférieures à 100 kU/l).

Cependant, des valeurs très élevées ont été décrites en cas de lithiases du cholédoque compliquées d'angiocholite aiguë : de 2400 kU/l jusqu'à 32 000 kU/l (14-18-19). Ces concentrations très élevées peuvent être dues à une augmentation de la sécrétion de l'antigène au sein du tissu épithélial biliaire inflammatoire et/ou à la rétention de l'antigène liée à l'obstacle biliaire (18). Le CA 19-9 se normalise alors après levée de l'obstacle et disparition de l'inflammation.

Enfin, des augmentations significatives ont aussi été signalées chez des malades atteints de mucoviscidose (20). Le CA 19-9 est également élevé chez les diabétiques en décompensation aiguë, élévations modérées, mais corrélées à la sévérité de la décompensation jugée sur des critères métaboliques (22).

## ■ VIII. LEGISLATION

---

La législation actuelle impose une double détermination du CA 19-9 :

- soit avec reprise du sérum précédent (durée maximale de conservation sous forme congelée de deux mois)
- soit dans deux séries de dosage différentes,
- soit dans la même série sur deux dilutions différentes du même sérum.

## ■ IX. CONCLUSION

---

Le CA 19-9 est un antigène défini par un anticorps monoclonal dont l'augmentation sérique est fréquente au cours des cancers du pancréas et du tractus digestif. C'est au cours des cancers du pancréas que la fréquence de positivité est la plus grande et que les valeurs de CA 19-9 les plus élevées sont observées. Des augmentations importantes sont également notées lors des lithiases du cholédoque compliquées d'angiocholite. Dans les autres pathologies bénignes, les valeurs de CA 19-9 sont en général faiblement ou modérément augmentées.

Comme pour les autres marqueurs tumoraux, en raison de la variabilité inter techniques observée actuellement, il est indispensable que le suivi d'un même patient soit effectué avec la même méthodologie.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 5, 957-972
2. Dietel M, Arps H, Klapdor R, Huller-Hagen S, Sieck M, Hoffmann L (1986) Antigen detection by the monoclonal antibodies CA 19-9 and CA 125 in normal and tumor tissue and patient sera. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 111, 257-265
3. Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg VA (1983) Identification of the gastro-intestinal and pancreatic cancer associated antigen detected by monoclonal antibody CA 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.* 43, 5489-5492
4. Klug TL, Ledonné NC, Greber TF, Zurawski VR (1988) Purification and composition of a novel gastro-intestinal tumor-associated glycoprotein expressing sialylated lacto-N-fucopentaose II (CA 19-9) *Cancer Res.* 48, 1505-1511.
5. Del Villano BC, Brennan S, Brock P, Bucher C, Liu V, McClure M, Rake B, Space S, Westrick B et al. (1983) Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin. Chem.* 29, 549-552
6. Ritts RE, Del Villano BC, Gov LW, Herberman RB, Klugt L, Zurawski VR (1984) Initial clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 19-9 using the NCI serum bank. *Int. J. Cancer* 33, 333-345
7. Perret Liaudet A, Beaudonnet A, Revenant MC, Mailliavin A (1990) Dosage de l'antigène carbohydre 19-9 par trois techniques enzymo-immunométriques. Résultats d'une étude multicentrique. *L'Eurobiologiste* 188, 277-284
8. Talbot JN, Coutris G, Bouyges N, Delahaye N, Machairas M (1991) Dosage du CA 19-9 : comparaison d'un dosage fluorimétrique avec un dosage radio-immunologique. XXX Colloque médecine nucléaire, VIII colloque CORATA, Montpellier, 16-19 octobre, p 139
9. Fateh-Moghadam A, Hero B, Stiebek P, Nagel D, Jaworek D (1990) Investigation of different CA 19-9 assays : clinical significance and consequences for the interpretation, the assessment of multicenter trial results and the test standardization *J. tumor marker oncol. (Abstract)* 5, 224
10. Brockhaus M, Magnani JL, Blaszyk M, Steplewski Z, Koprowski H, Karlsson KA, Larson G, Ginsburg V (1981) Monoclonal antibodies directed against the human Le blood group antigen. *J. Biol. Chem.* 256, 13223-13225
11. Ruibal Morell A (1989) Tumor markers and neoplastic and non neoplastic pathology. Communication orale au 1er Symposium Méditerranéen sur les dosages immunométriques, Naples, 20-22 septembre
12. Andriulli A, Gindrot T, Piantino P, Farini R, Cavallin G, Piazzi L et al. (1986) Prospective evaluation of the diagnostic efficacy of CA 19-9 assay as a marker for gastro-intestinal cancers. *Digestion* 33, 26-33
13. Barbier Y, Galvain D (1989) L'antigène carbohydre 19-9. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 18, 41-48
14. Nakad A, Colombel JF, Geubel AP, Cerulus G, Farchakh E et al. (1989) L'ictère est-il une cause d'erreur dans l'interprétation du CA 19-9 sérique ? *Acta Gastro-Enterologica Belgica* LII, 17-22
15. Safi F, Roscher R, Bittner R, Schenkluhn B, Dopfer HP, Beger HG (1987) High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas* 2, 398-403
16. Steinberg WM, Gelfand R, Andersson KK, Glenn J, Kurzman SH, Sindelar WF, Toskes PP (1986) Comparison of the sensitivity and the specificity of the CA 19-9 and carcino-embryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastro-enterology* 90, 343-349



17. Klapdor R, Klapdor U, Bahlo M, Kremer B, Dietel M, Dallek M et al. (1984) Sensitivity –clinical and experimental data (nude mice). *Dig. Dis. Sci.* 29, 955
18. Sawabu N, Takemori Y, Toya D, Yoneshima M, Kidani H et al. (1986) Factors affecting serum levels of CA 19-9 with special reference to benign hepatobiliary and pancreatic diseases. *Gastro-enterol. J.* 21, 491-498
19. Albert MB, Steinberg WM, Henry JP (1988) Elevated serum levels of tumor markers CA 19-9 in acute cholangitis. *Digestive Diseases and Sciences* 33/10, 1223-1225
20. Duffy MJ, O’Sullivan F, Mc Donnell TJ, Fitz Gerald MX (1985) Increased concentrations of the antigen CA 19-9 in serum of cystic fibrosis patients. *Clin. Chem.* 31, 1245-1246
21. Dousset B, Vescovi G, Feintrenie X, Belleville F, Nabet P (1987) Adenocarcinomes bronchiques : intérêt de deux marqueurs tumoraux : CA 19-9 et ACE. *Méd. et Hyg.* 45, 3582-3585
22. Behnamou PY, Vuillez JP, Meffre G, Halimi S, Agnius Delord C (1989) Le CA 19-9 est-il un marqueur de souffrance pancréatique dans le diabète ? 7<sup>ème</sup> Journées Lilloises de Biologie Clinique, Le Touquet, octobre, 186-187

# ANTIGENE SPECIFIQUE DE LA PROSTATE (PSA)

A. BEAUDONNET, R. COHEN

## I. INTERET PHYSIOPATHOLOGIQUE

---

Le PSA (Antigène spécifique de la prostate) a été isolé et purifié par YANG (1) en 1979 à partir de tissu prostatique humain.

Le PSA est une glycoprotéine sécrétée par les cellules épithéliales de la prostate et, à un très faible niveau de concentration, par les glandes péri-vésicales et péri-urétrales. Il est excrété dans le liquide séminal, la circulation sanguine et l'urine. Le PSA est une protéase dont le rôle physiologique est le clivage d'une protéine impliquée dans la liquéfaction du sperme après l'éjaculation.

Jusqu'à présent, le PSA était considéré comme presque exclusivement spécifique du tissu prostatique, augmentant lors des pathologies bénignes (prostatites-hypertrophies bénignes ou adénomes) et au cours des cancers. Cependant des études récentes montrant la présence de PSA dans des cellules cancéreuses du sein (sécrétion associée à la présence de récepteurs aux stéroïdes) et dans le lait maternel remettent en question cette spécificité tissulaire (2). Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour préciser le rôle et l'intérêt clinique de ce PSA extra-prostatique.

Par contre, l'utilité du PSA en pathologie prostatique est bien documentée.

### I.1. PSA et diagnostic précoce de cancer

Associé à d'autres examens, et en particulier au toucher rectal, la détermination du PSA sérique permet d'augmenter le nombre de cancers diagnostiqués à un stade précoce.

### I.2. PSA et détermination du stade

Le PSA ne permet pas, à lui seul, de déterminer le stade du cancer bien que sa concentration augmente avec celui-ci. En effet, il existe une grande dispersion des valeurs pour un stade donné (3) et par ailleurs, plus un cancer est indifférencié, moins il sécrète de PSA (4).

### I.3. PSA et surveillance des cancers traités

Le principal intérêt du PSA est la surveillance du traitement du cancer de la prostate (prostatectomie radicale – hormonothérapie ou radiothérapie). Le PSA permet d'évaluer l'efficacité du traitement, de surveiller une rémission et un dépistage précoce des récurrences.

## II. STRUCTURE DU PSA – HETEROGENEITE MOLECULAIRE

---

Le PSA est une glycoprotéine (protéase appartenant au groupe des kallikréines) composée de 237 acides aminés. Dans le sérum, le PSA est présent sous forme libre et liée à des antiprotéases : alpha 1 antichymotrypsine (PSA-ACT) et alpha 2 macroglobuline.

Le PSA libre a une masse molaire de  $34\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et les complexes avec l'alpha 1 antichymotrypsine et l'alpha 2 macroglobuline ont des masses molaires de  $100\,000$  et  $780\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivement.

En ce qui concerne la structure antigénique, cinq épitopes ont été décrits sur la molécule de PSA libre. La liaison du PSA avec les antiprotéases « masque » partiellement ou complètement ces épitopes. En effet, trois de ces cinq épitopes sont « masqués » pour le PSA-ACT et les cinq épitopes sont situés à l'intérieur de la molécule d'alpha 2 macroglobuline et ne sont pas accessibles aux anticorps. Seules les formes de PSA libre et liée à l'ACT seront donc dosées immunologiquement. L'ACT se fixe toujours sur les mêmes épitopes du PSA pour des raisons de charge et de structure.

Les proportions des formes libre et liée à l'ACT varient selon les situations physiopathologiques, avec une prédominance de la forme libre au cours de l'adénome et une prédominance de la forme PSA-ACT dans les cancers (5-6).

### ■ III. METHODES DE DOSAGE

---

#### III.1. Principe

Le dosage du PSA est réalisé par des méthodes immunologiques avec marqueur.

Il existe de nombreuses trousse de dosage (dix-sept étaient représentées lors de la onzième enquête du contrôle national).

La première technique radioimmunologique (RIA) développée par YANG et commercialisée sous le nom de Prosccheck® est la seule utilisant le principe de la compétition. Les autres trousse disponibles actuellement sont toutes basées sur le principe de l'immunométrie.

Ces trousse se différencient principalement par :

- la nature de la phase solide (tubes, billes, microplaques, microparticules magnétiques, etc.),
- l'étalon,
- l'origine et la spécificité des anticorps,
- les différences de temps d'incubation,
- la nature du signal mesuré (comptage de radioactivité, mesure photométrique, mesure de luminescence ou de fluorescence).

#### III.2. Etalon

##### *- Situation actuelle*

Actuellement, il n'existe pas d'étalon international de référence permettant aux fabricants de calibrer leurs trousse.

Par contre, il existe au moins deux étalons (Yang et Hybritech) par rapport auxquelles les trousse sont calibrées. Les valeurs peuvent passer du simple au double uniquement en fonction de la référence choisie. Dans le cadre des enquêtes de contrôle de qualité, on observe une diminution du nombre de trousse calibrées par rapport à l'étalon Yang.

##### *- Situation future*

Néanmoins, une préparation de référence devrait être disponible dans le futur. En effet, une conférence a été organisée à l'initiative de Stamey (7) en septembre 1994, réunissant notamment les différents fabricants de trousse et des experts médicaux. Un consensus a été établi sur la composition de ce futur étalon qui contiendra environ 10% de PSA sous forme libre et 90% sous forme liée, ce pourcentage correspondant à la proportion moyenne de forme libre contenue dans les sérums prélevés pour détection précoce de cancer.

### III.3. Anticorps

Une seule trousse dérivée de la technique Yang est de type compétitif et utilise un anticorps polyclonal. Toutes les autres trousse sont basées sur le principe de l'immunométrie utilisant un couple d'anticorps : deux monoclonaux ou un monoclonal plus un polyclonal.

Plusieurs études (8-9) ont montré que les différents anticorps reconnaissent de façon très variable les formes libre et complexée : reconnaissance équimolaire ou reconnaissance préférentielle de la forme libre par rapport à la forme liée à l'ACT.

### III.4. Limite de détection

Les limites de détection sont de l'ordre de 0,10-0,20 µg/l pour les techniques immunométriques. Certaines trousse présentent une limite de détection plus faible (inférieure à 0,10 µg/l) et sont qualifiées d'ultrasensibles.

### III.5. Causes d'erreurs

#### - Effet crochet

La concentration de PSA peut être très élevée (supérieur à 10 000 µg/l), en particulier au cours des cancers de la prostate avec métastases. Il est donc nécessaire de connaître la concentration à partir de laquelle l'effet crochet peut apparaître avec la technique utilisée.

#### - Anticorps hétérophiles

La présence d'anticorps hétérophiles, en particulier d'anticorps anti-souris (HAMA) peut être à l'origine de résultats erronés (en général surestimés) avec les techniques immunométriques utilisant des anticorps monoclonaux.

## ■ IV. RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES

---

Le dosage du PSA se caractérise par une grande variabilité intertechnique que l'on explique principalement par l'absence actuelle d'étalon international et par les différences de spécificité des anticorps utilisés. Par ailleurs, les différences de reconnaissances des formes libre et liée peuvent s'expliquer par les différences des temps d'incubation. La cinétique de fixation étant plus rapide pour la forme libre que pour la forme liée, la reconnaissance de la forme libre est d'autant plus importante que l'incubation est courte.

La dispersion des résultats est illustrée notamment par les résultats obtenus lors de l'enquête du contrôle national de juin 1994. Au cours de cette enquête, deux échantillons ayant une concentration moyenne de 6,7 µg/l (MT 18) et de 47,9 µg/l (MT 19) ont été distribués. Les CV tronqués, toutes techniques confondues, sont de 37,6% et de 35,3% pour les sérums MT 18 et MT 19 respectivement. La variabilité intertechnique est indiquée sur la **figure 1** où sont représentées les moyennes par technique exprimées en pourcentage de la moyenne générale. Seules, les techniques avec un minimum de dix réponses sont indiquées.

Cependant, il faut noter que ces différences intertechniques peuvent être majorées sur les échantillons de contrôle du fait de la présence quasi exclusive de PSA sous forme libre dans ces sérums.

Sur la **figure 2**, sont rassemblés les CV % tronqués obtenus par technique pour les deux sérums. On constate que 85 % des trousse représentées pour MT 18 et 78 % pour MT 19 permettent d'obtenir des CV tronqués inférieurs ou proches de 10%.

## PSA

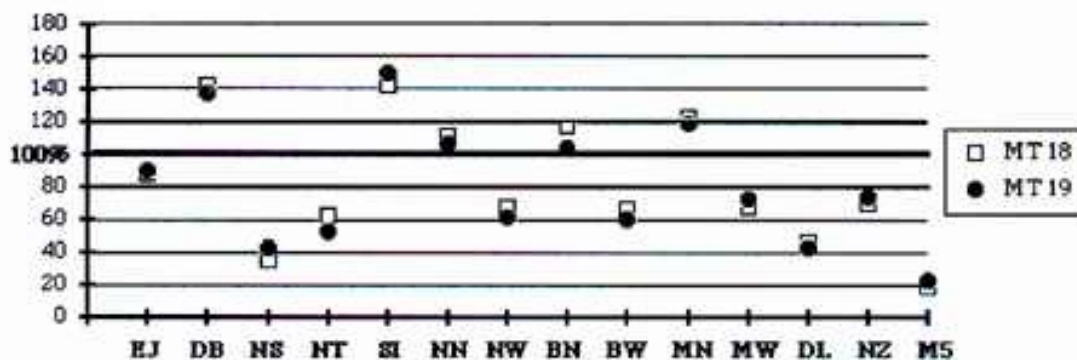


Figure 1: Moyennes des différentes trouses exprimées en % de la moyenne générale

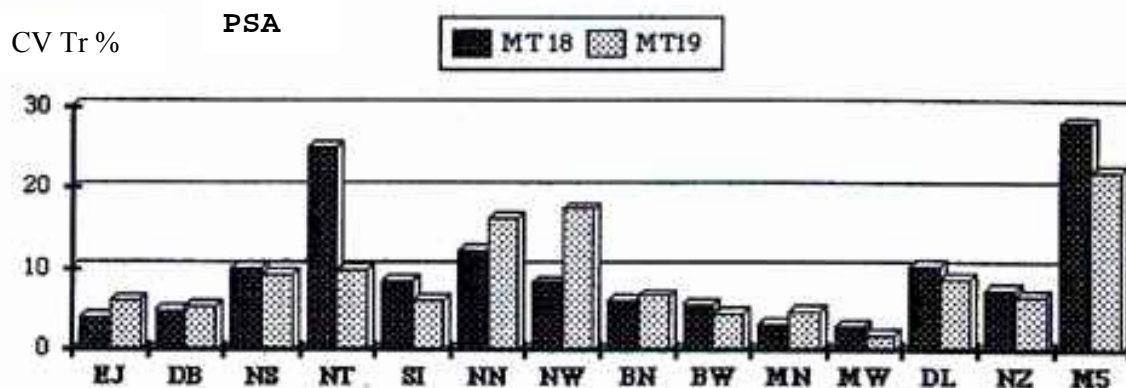


Figure 2 : Reproductibilité par technique.

## V. ETAPE PREANALYTIQUE - CONSERVATION DES ECHANTILLONS

### V.1. Prélèvement

Sauf indication Particulière, le dosage doit être réalisé sur sérum.

Les interférences éventuelles provoquées par une hémolyse, une hyperlipidémie ou une hyperbilirubinémie doivent être déterminées avec chaque système analytique.

Par ailleurs, le prélèvement doit être effectué avant toutes manipulations prostatiques (massage, biopsie, échographie, etc.) qui sont connues pour augmenter artificiellement la concentration de PSA. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'attendre deux à trois semaines (compte-tenu de la demi-vie du PSA qui est de l'ordre de trois jours) pour une interprétation correcte du résultat.

Quant à l'influence du toucher rectal, elle est controversée et ne semble avoir une influence que sur une prostate pathologique.

### V.2. Conservation des sérums

Il est conseillé de conserver les échantillons à 4°C pendant vingt-quatre heures et de les congeler si le dosage est différé au-delà de cette période.

Néanmoins, d'après Simm (10), les sérums peuvent être conservés quatorze jours à 4°C, puis congelés au-delà de cette période.

Les cycles de congélation-décongélation doivent être évités.

## ■ VI. INTERPRÉTATIONS DES RESULTATS

---

### VI.1. Valeurs de référence

En raison de l'importance des variations intertechniques, les valeurs de référence sont à déterminer avec chaque technique.

Les valeurs couramment admises varient entre 2,0 et 4,0 µg/l.

### VI.2. Variation physiologiques

#### - *Nyctémère*

Le taux sérique est stable au cours nyctémère.

#### - *Position du sujet*

On note une diminution du PSA après vingt-quatre heures d'hospitalisation (de 10 à 50%), diminution qui pourrait être due à la position allongée (11).

#### - *Age*

Le PSA augmente avec l'âge, en relation avec l'augmentation du volume de la prostate (par exemple, chez les hommes de 50 ans : valeurs de référence inférieures à 2,5 µg/l et chez les hommes de plus de 70 ans : valeurs de référence inférieures à 6,4 µg/l). Une interprétation fiable d'un résultat nécessite de disposer de valeurs de référence pour chaque tranche d'âge.

### VI.3. Variations pathologiques

#### - *Hypertrophie bénigne*

L'augmentation de PSA est en général modérée.

#### - *Diagnostic de cancer*

L'augmentation est très variable et les zones de chevauchement avec l'hypertrophie bénigne sont importantes. Le PSA ne peut donc pas être le seul test utilisé pour le diagnostic de cancer.

Les valeurs observées sont fonction de la technique. Si on prend un test de type Hybritech, très peu de cancers ont une concentration inférieure à 10 µg/l. Le PSA a donc une valeur prédictive négative importante (12).

La détermination du PSA associée avec le toucher rectal permet d'augmenter le nombre de cancers diagnostiqués à un stade précoce. C'est ainsi que pour un PSA compris entre 4 et 10 µg/l, la valeur prédictive positive augmente de 20 à 40 % si le toucher rectal est suspect. Quant le PSA est supérieur à 10 µg/l, cette valeur prédictive positive augmente de 30 à 80% si le toucher rectal est suspect (13).

Par ailleurs la densité du PSA (PSAD) qui est le rapport de la concentration de PSA sur le volume de la prostate, est plus élevée en cas de cancer qu'en cas d'adénome. Lorsque la valeur du PSA est comprise entre 4 et 10 µg/l, la détermination du PSAD permet de sélectionner les patients devant subir une biopsie pour confirmer le diagnostic (14-15).

L'augmentation significative de la concentration sur un an (supérieure à 100%) doit faire évoquer le diagnostic de cancer et pratiquer une biopsie.

Enfin, des études cliniques récentes semblent montrer que la détermination du pourcentage de PSA libre améliore l'efficacité diagnostique par rapport à la seule détermination du PSA total, en particulier pour des concentrations modérément augmentées. Des trousse de dosage de PSA libre sont en cours de commercialisation.

#### - *Evaluation du stade*

Seules les valeurs peu élevées ou très élevées permettent d'évaluer le stade : cancer localisé dans le premier cas ou cancer disséminé dans le deuxième cas.

#### - *Suivi de traitement*

Dans ce cas, les valeurs prédictives négative et positive sont proches de 100%.

- Après prostatectomie radicale, le PSA doit devenir indétectable trois à quatre semaines après l'opération. Les trousse de dosage ultrasensibles permettent une détection plus précoce des récidives, de dix à douze mois environ

(16-17). Néanmoins, on ne sait pas encore si la mise en route d'un traitement plus précoce aura un éventuel retentissement sur la survie du malade.

- En cas d'hormonothérapie (traitement anti-androgénique) ou de radiothérapie, la diminution et le retour à la normale du PSA indiquent une bonne réponse au traitement et constituent un critère pronostique. En effet, en l'absence de normalisation du PSA, les risques de rechute sont importants.

## ■ VII. LEGISLATION

---

La législation actuelle impose une double détermination du PSA :

- soit avec reprise du sérum précédent (durée maximale de conservation sous forme congelée de deux mois),
- soit dans deux séries de dosage différentes,
- soit dans la même série sur deux dilutions différentes du même sérum.

## ■ VIII. CONCLUSION

---

Bien que des études récentes remettent en question la spécificité du PSA pour le tissu prostatique, cet antigène reste le marqueur le plus fiable dans le cadre d'une pathologie prostatique.

En raison de l'importance des variations intertechniques constatées actuellement, il est indispensable que le suivi d'un patient soit effectué avec la même méthodologie. Par ailleurs, l'interprétation des résultats doit être effectuée en fonction des valeurs de référence propres à chaque trousse et à chaque tranche d'âge.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Yang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 17, 159-163
2. Graves HCB (1995) Nonprostatic source of prostate specific antigen : a steroid hormone-dependent phenomenon ? *Clin. Chem.* 41,7-9
3. Oesterling JE (1991) Prostate specific antigen : a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol.* 145, 907-923
4. Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC, Weber JB, Walsh PC (1990) Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer : influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J. Urol.* 143, 747-752
5. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Pettersson K, Lovgren T (1991) Prostate-Specific Antigen in serum occurs predominantly in complex with  $\alpha 1$  antichymotrypsin. *Clin. Chem.* 37, 1618-1625
6. Stenmann UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tunkanen K, Alfthan O (1991) A complex between Prostate-Specific Antigen and  $\alpha 1$  -antichymotrypsin is the major form of Prostate-Specific Antigen in serum of patients with prostatic cancer : assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res*, 51, 222-226
7. Stamey TA (1995) Second Stanford conference on international standardization of prostate-specific antigen immunoassays ; september 1 and 2, 1994. *Urology*, 45, 173-184

8. Zhou AM, Tewari PC, Bluestein BI, Caldwell GW, Larsen FL (1993) Multiple forms of prostate specific antigen in serum : differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin. Chem.* 39/12, 2483-2491
9. Tillye CR, Konings M, Gobin PT, Iqbal J (1994) Disagreement between the Roche Cobas ® Core, and Hybritech Tandem® E PSA assays when measuring free, complexed and total serum prostate specific antigen. *Ann. Clin. Biochem.* 31, 501-505
10. Simm B, Gleeson M (1991) Storage conditions to serum for estimating prostate-specific antigen. *Clin. Chem.* 37, 113-114
11. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New Engl. J. Med.* 317, 909-916
12. Toubert ME, Schlageter, MH, Bron J, Treillac P, Le Duc A, Najean Y (1990) Dépistage du cancer de la prostate par l'antigène spécifique de prostate. *Presse Méd.* 19, 1139-1142
13. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Beard JH, Pont HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD (1990) Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J. Urol.* 143, 1146-1154
14. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH (1992) Prostate Specific Antigen Density : a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* 147, 815-816
15. Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH (1992) The use of Prostate Specific Antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum Prostate Specific Antigen. *J. Urol.* 147, 817-821
16. Stamey TA, Graves HCB, Wehner N, Ferrari M, Freiha FS (1993) Early detection of residual prostate cancer after radical prostatectomy by an ultrasensitive assay for prostate specific antigen. *J. Urol.* 149, 787-752
17. Vessela RL, Notebbom J, Lange PH, (1992) Evaluation of the Abbott automated immunoassay of Prostate-Specific-Antigen. *Clin. Chem.* 38, 2044-2054



# HORMONE CHORIONIQUE GONADOTROPE (hCG)

## SOUS-UNITE ( $\beta$ hCG)

A. BEAUDONNET, M.C. PATRICOT

### I. INTERET PHYSIOPATHOLOGIQUE

---

L'hCG (hormone chorionique gonadotrope) est une hormone synthétisée par les cellules trophoblastiques du placenta dès le 6<sup>ème</sup> jour de la fécondation (1).

Le rôle physiologique essentiel de l'hCG est de stimuler le corps jaune permettant ainsi la synthèse de la progestérone et des œstrogènes en début de grossesse. L'hCG aurait également d'autres rôles permettant d'expliquer la faible quantité d'hCG d'origine hypophysaire trouvée chez des individus normaux (2)

#### I.1. hCG et grossesse

##### *\*Diagnostic de grossesse*

L'hCG sérique permet un diagnostic précoce de grossesse dès la première semaine suivant la fécondation. La concentration double en 36-48 heures en début de grossesse, est maximale entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine, puis diminue au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse jusqu'à environ 10% de la valeur maximale.

##### *\*Grossesses pathologiques*

En cas de grossesse extra-utérine (GEU), les valeurs sont beaucoup plus basses et évoluent vers une stabilisation ou une régression. De même des valeurs basses d'hCG se rencontrent lors des grossesses arrêtées.

En cas de grossesse molaire, les concentrations d'hCG sont très élevées. La courbe de diminution de l'hCG permettra ensuite la surveillance post-molaire (l'hCG devant se négativer dans les six semaines suivant l'évacuation de la môle).

#### I.2 hCG et trisomie 21 (Syndrome de Down)

Chez la femme enceinte, l'augmentation de l'hCG sérique (couplée à l'âge maternel et à l'âge gestationnel) est un signe d'appel biologique permettant de définir une population à risque de trisomie fœtale (3). Une amniocentèse sera alors réalisée pour déterminer le caryotype fœtal.

La détermination spécifique des sous-unités  $\beta$  libres semblerait plus discriminante que celle de l'hCG (4).

#### I.3. hCG et tumeurs

L'hCG est sécrétée par une grande variété de tumeurs : tumeurs trophoblastiques placentaires, tumeurs germinales de l'ovaire et du testicule, tumeurs non trophoblastiques (ovaire - pancréas - côlon - poumons - vessie). Les dosages de l'hCG et sous-unités  $\beta$  libres sont utiles au diagnostic différentiel entre grossesse normale, môle et tumeur trophoblastique et au suivi des tumeurs trophoblastiques. Ces dosages permettent également le diagnostic et le suivi des tumeurs germinales du testicule, Récemment, l'intérêt du dosage des sous-unités  $\beta$  libres dans le diagnostic et suivi des tumeurs de la vessie a été montré (5).

## ■ II. STRUCTURE - HETEROGENEITE MOLECULAIRE

---

### II.1. Structure

La structure et les différentes formes moléculaires de l'hCG sont bien connues (6-7).

L'hCG (holo hCG ou hCG dimère) est une molécule glycoprotéique de masse molaire d'environ 40 000 g.mol<sup>-1</sup>. Elle est constituée de deux unités polypeptidiques liées de façon non covalente :

\* **une sous-unité  $\alpha$**  de 92 acides aminés commune aux sous-unités  $\alpha$  de FSH-LH et TSH,

\* **une sous-unité  $\beta$**  de 145 acides aminés qui possède une séquence de 24 résidus Carboxyl-terminaux (CTP ou Carboxyl Terminal Portion) spécifique de la molécule. En position 44-45 et 47-48, il peut manquer des liaisons peptidiques et on parle d'hCG clivée.

Enfin, en différentes positions des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  se greffent des oligosaccharides sulfatés et sialylés. Le degré variable de glycosylation va entraîner l'apparition de différentes isoformes moléculaires.

*Seule l'hCG dimère possède une activité biologique.*

### II.2. Molécules d'hCG immunoréactives dans le sérum et l'urine

Dans le sérum peuvent coexister différentes formes d'hCG immunoréactives : hCG, sous-unités  $\beta$  libres, sous-unités  $\alpha$  libres, hCG clivée, hCG sans fragment  $\beta$ -C terminal, variants glycosylés.

Les proportions de ces différentes formes varient selon les situations physiopathologiques et également selon les conditions de conservation des échantillons.

Les formes clivées constituent les premières étapes dans le processus de dégradation de l'hCG, le processus ultime étant le fragment  $\beta$ -core qui est constitué des peptides 6-40 et 55-92 reliés par des ponts di-sulfures. Ce fragment est retrouvé essentiellement dans les urines de femmes enceintes. Dans les urines de femmes ménopausées, la présence de fragment  $\beta$ -core "like" a été également mise en évidence (8).

## ■ III. TECHNIQUES DE DOSAGE

---

### III.1. Principe

Le dosage de l'hCG sérique et des sous-unités  $\beta$  libres, est réalisée actuellement par des méthodes immunologiques avec marqueur. Les techniques de dosage sont très nombreuses et la très grande majorité d'entre elles est basée sur le principe de l'immunométrie. Dans le cas de dosage spécifique des sous-unités  $\beta$  libres, seules les techniques avec marqueur isotopique sont disponibles actuellement.

Lors de l'enquête du contrôle national de qualité (juin 1994), dix-neuf trousseaux étaient représentés. Deux mille sept cents laboratoires ont rendu un résultat d'hCG.

Parmi les techniques utilisées, 79% sont basées sur la détection d'un signal fluorescent, les autres se répartissant entre détection d'un signal photométrique, luminescent ou radioactif.

### III.2. Anticorps

Le développement des anticorps monoclonaux et des techniques immunométriques a permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité des dosages (absence de réactions croisées avec les hormones hypophysaires et les sous-unités  $\alpha$  libres).

Cependant, des discordances plus ou moins importantes sont observées entre les résultats obtenus avec les différentes trousse de dosage. Ces discordances sont dues en grande partie à la spécificité des anticorps utilisés et à la combinaison de ces anticorps.

En effet, d'après la carte épitopique décrite par SCHWARZ et al. (9), il existe neuf sites antigéniques sur la molécule d'hCG dont trois sont situés sur la sous-unité  $\alpha$ , quatre sur la sous-unité  $\beta$  et deux sur l'hCG dimère.

Du choix et de la combinaison des anticorps dépendront la reconnaissance des différentes formes moléculaires : hCG clivée + hCG non clivée, hCG non clivée uniquement, hCG + sous-unités  $\beta$  libres, sous-unités  $\beta$  libres uniquement, hCG sans fragment  $\beta$ -C terminal (10).

Les méthodes avec anticorps reconnaissant l'hCG + les sous-unités  $\beta$  libres reconnaissent de façon très variable les sous-unités  $\beta$  libres et les discordances intertechniques peuvent être très importantes dans ce cas (11-12).

### III.3. Etalons

Il existe plusieurs préparations internationales de référence :

\* **2<sup>ème</sup> IS (61/6)**, préparation impure d'hCG contenant aussi des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  libres et de la LH ; cette préparation était destinée au dosage biologique de l'hCG et n'est plus disponible depuis 1987.

\* **1<sup>er</sup> IRP et 3<sup>ème</sup> IS (75/537)**, préparations purifiées contenant essentiellement de l'hCG ; ces préparations sont destinées au dosage immunologique de l'hCG.

Ces deux étalons sont titrés par des méthodes biologiques et les titres sont exprimés en UI/l.

La très grande majorité des trousse est étalonnée actuellement par rapport au 1<sup>er</sup> IRP/3<sup>ème</sup> IS.

\* **1<sup>er</sup> IRP (75/551)** contenant des sous-unités  $\beta$  libres pour dosage spécifique des sous-unités  $\beta$  libres ; dans ce cas, l'unité qui correspond à une masse donnée de l'étalon est définie arbitrairement, car les sous-unités sont dépourvues d'activité biologique.

### III.4. Causes d'erreurs

#### - Effet crochet

Lorsque la concentration en antigène est très élevée et très supérieure à celle du dernier point de la gamme d'étalonnage, on peut observer une diminution de la valeur du signal et par conséquent un résultat faussement abaissé. Les concentrations d'hCG peuvent être très élevées, en particulier en cas de môle hydratiforme (supérieures à  $10^6$  UI/l). Il est donc important de connaître la concentration à partir de laquelle l'effet crochet peut apparaître avec la technique utilisée, cette concentration devant être déterminée pour chaque technique.

#### - Anticorps hétérophiles

La présence d'anticorps anti-souris (HAMA) peut être à l'origine de résultats erronés (en général surestimés) avec les techniques immunométriques utilisant des anticorps monoclonaux.

#### IV. RESULTATS DES ENQUETES INTERLABORATOIRES

Lors de l'enquête du contrôle national de qualité de Juin 1994, deux échantillons de contrôle ont été distribués dont les concentrations moyennes étaient de 7,0 UI/l (TP18) et de 81,3 UI/l (TP19). Plus de 85 % des participants utilisaient une méthodologie entièrement automatisée.

La variabilité totale est plus importante pour l'échantillon **TP18** (de faible concentration) que pour l'échantillon **TP19** : CV tronqués de 30,6 et 18,5% respectivement. Compte-tenu des différences de spécificité des anticorps utilisés, les différences inter techniques peuvent être importantes. Ces différences sont illustrées sur la **figure 1** où sont rassemblées les moyennes obtenues par technique exprimées en pourcentage de la moyenne générale (seules les méthodes avec un minimum de dix réponses sont représentées).

Par ailleurs, comme on peut le voir sur la **figure 2** qui indique la reproductibilité par technique, la moitié des réactifs permet d'obtenir un CV tronqué inférieur ou égal à 19% pour le sérum TP18 et à 12% pour le sérum TP19. Pour l'échantillon TP 18, la dispersion des résultats est très importante avec la plupart des méthodes présentant un faible degré d'automatisation.

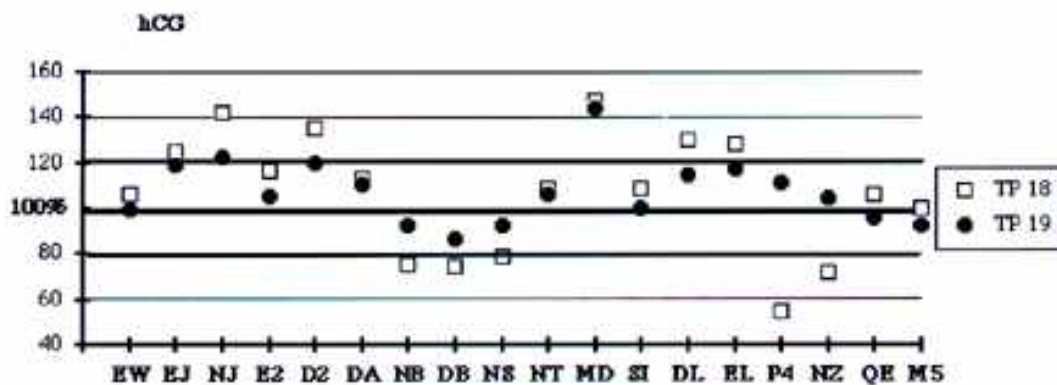


Figure 1 : Moyennes des différentes trouses exprimées en % de la moyenne générale.

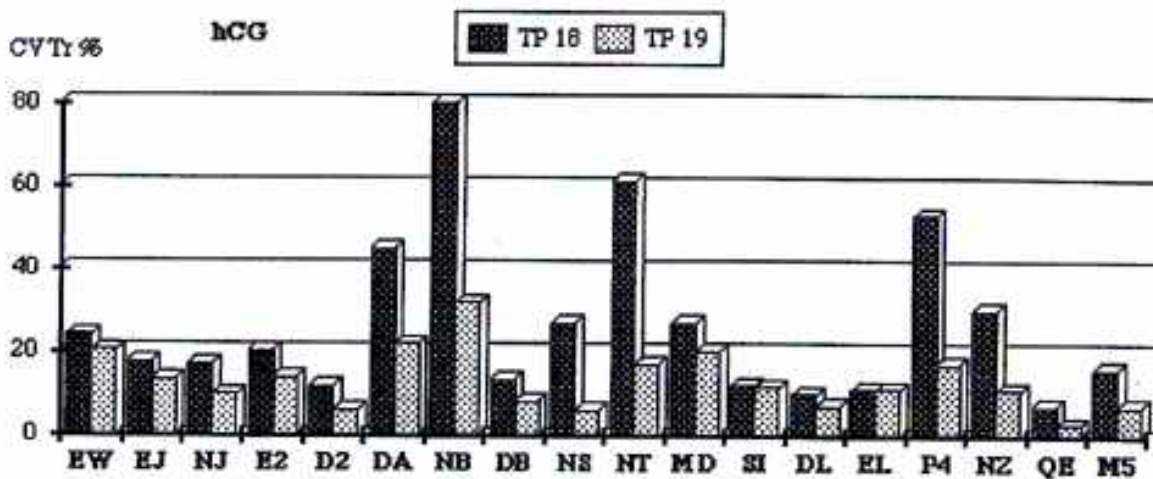


Figure 2 : Reproductibilité par technique.

## ■ V. ÉTAPE PREANALYTIQUE - CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

---

### **V.1. Prélèvement**

Sauf indications particulières, le dosage doit être réalisé sur sérum.

Les interférences éventuelles dues à l'hémolyse, à l'hyperlipidémie, à l'hyperbilirubinémie doivent être analysées avec chaque système analytique. Dans le cas particulier d'un dosage d'hCG pour dépistage de trisomie 21, plusieurs facteurs sont susceptibles d'augmenter artificiellement la valeur d'hCG parmi lesquels : voyage récent, échographie réalisée moins d'une semaine avant la prise de sang (13).

### **V.2. Conservation des échantillons**

La proportion d'hCG clivée (forme non reconnue par tous les immunodosages) et des sous-unités  $\beta$  libres augmente dans les échantillons non centrifugés et conservés à température ambiante (11-14). La proportion d'hCG clivée augmente aussi dans les sérums conservés à + 4°C plus d'une semaine. Il est donc important de centrifuger les échantillons le plus rapidement possible et de congeler le sérum si le dosage doit être différé. Les cycles de congélation-décongélation doivent être évités.

## ■ VI. INTERPRÉTATION DES RESULTATS

---

La limite de détection de la majorité des trouses est de l'ordre de 2 UI/l.

Cette limite de détection est inférieure à 0,10  $\mu\text{g/l}$  avec les techniques immunoradiométriques spécifiques des sous-unités  $\beta$  libres.

Les valeurs trouvées au cours des grossesses normales et pathologiques, ainsi qu'au cours des processus tumoraux varient selon les réactifs utilisés. Les chiffres ci-dessous ne sont donnés qu'à titre indicatif.

### **VI.1. Variations physiologiques**

Des concentrations faibles d'hCG (inférieures à 10 UI/l) peuvent être rencontrées chez les sujets de plus de 45 ans et en particulier chez les femmes ménopausées.

### **VI.2. Diagnostic précoce de grossesse**

Une valeur inférieure à 5 UI/l permet en général d'exclure une grossesse. Pour les valeurs faibles comprises entre 5 et 25 UI/l, un dosage effectué 48 heures plus tard et montrant un doublement de la concentration d'hCG permet de confirmer la grossesse.

### **VI.3. Variation au cours d'une grossesse normale**

Dans ce cas, seul le dosage de l'hCG dimère (seule forme active biologiquement) est intéressant. Les trouses de dosage spécifique de l'hCG seront donc utilisées de préférence. Pendant la grossesse normale, les taux de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  libres sont peu importants (15). Le pourcentage de  $\beta\text{hCG libre/hCG}$  n'excède pas 1% au cours d'une grossesse normale.

Les concentrations attendues en fonction de l'âge gestationnel sont indiquées dans le tableau ci-dessus. Des variations individuelles importantes sont observées.

AGE DE LA GROSSESSE	ZONE DES CONCENTRATIONS En UI/l
10 <sup>ème</sup> jour	10
1.5 à 2 semaines	40 à 200
2 à 3 semaines	100 à 1 000
3 à 4 semaines	500 à 10 000
4 à 6 semaines	60 000 à 200 000
6 à 9 semaines	100 000 à 300 000
2 <sup>ème</sup> trimestre	3 000 à 50 000
3 <sup>ème</sup> trimestre	1 000 à 50 000

En cas de grossesse multiple, les concentrations d'hCG sont plus élevées.

#### VI.4. Variations au cours des grossesses pathologiques

##### \* *Grossesse extra-utérine*

Le dosage de l'hCG (associé à l'échographie et à l'observation clinique) est un élément capital du diagnostic. Les concentrations sont beaucoup plus basses qu'au cours d'une grossesse normale et le temps de doublement est anormal. Après chirurgie, les délais de négativation de l'hCG dépendent du taux de départ (entre 4 à 15 jours).

##### \* *Grossesse arrêtée*

L'association de métrorragies et d'une faible concentration d'hCG doit faire évoquer le diagnostic de grossesse arrêtée qui sera confirmé par l'échographie.

#### VI.5. Tumeurs bénignes et malignes

##### \* *Grossesse molaire et maladie trophoblastique*

Une concentration très élevée d'hCG doit faire évoquer une grossesse molaire qui sera confirmée par l'échographie. Des concentrations supérieures à 10<sup>6</sup> UI/l se rencontrent au cours de cette pathologie.

L'hCG est un paramètre capital dans la surveillance post-molaire. Une môle bénigne s'accompagne d'une diminution et d'une négativation de l'hCG en six semaines. La persistance d'un taux positif doit imposer un bilan pour localisation du tissu trophoblastique et la mise en route d'une chimiothérapie. Dans les maladies trophoblastiques gravidiques, les concentrations d'hCG et de sous-unités  $\beta$  sont augmentées. Le rapport  $\beta$ hCG/hCG augmente proportionnellement au caractère envahissant de la tumeur trophoblastiques. Le pourcentage du  $\beta$ hCG libre qui est compris entre 0,05 et 1% dans les grossesses normales, se situe entre 1 et 5% en cas de môle et dépasse 5% en cas de choriocarcinome (16).

Les dosages spécifiques couplés d'hCG et de sous-unités  $\beta$  libres permettent d'améliorer le diagnostic différentiel entre grossesse normale, môle et choriocarcinome.

##### \* *Tumeurs testiculaires (non-séminomateuses et séminomes)*

Le dosage d'hCG et celui des sous-unités  $\beta$  libres présentent un intérêt surtout dans les tumeurs testiculaires non-séminomateuses (choriocarcinomes) puisque environ 60% de ces tumeurs sécrètent de l'hCG et 41 à 70% sécrètent des sous-unités  $\beta$  libres (17-18).

Dans environ 30% des séminomes sécrétant, seules les sous-unités  $\beta$ hCG libres sont retrouvées (17-18).

Les dosages d'hCG et des sous-unités  $\beta$  libres (associés à celui de l'alpha-fœtoprotéine) doivent être effectués devant toute suspicion de cancer testiculaire (l'augmentation de l'un de ces trois marques étant observée dans 90% des cas). Les taux initiaux sont corrélés à la masse tumorale et sont donc un facteur de pronostic. La diminution de ces marques est un reflet de l'efficacité thérapeutique.

### **\* Tumeurs non trophoblastiques**

Dans 10 à 50% des tumeurs non trophoblastiques (ovaires-pancréas-poumons-côlon-vessie), on observe une sécrétion de sous-unités  $\beta$  libres essentiellement (18).

Le dosage sérique spécifique des sous-unités  $\beta$  libres est très utile pour la détection et la surveillance des tumeurs vésicales, tumeurs pour lesquelles il n'existe pas de marqueur fiable (5).

### **VI.6. Dépistage de la trisomie 21 (femmes de moins de 38 ans)**

Le dosage d'hCG sera réalisé sur un sérum entre la 15<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée.

Certaines trousse de dosage de l'hCG adaptées à la détermination des faibles concentrations pour diagnostic précoce de grossesse peuvent présenter une dispersion importante dans les valeurs hautes. Dans le cadre d'un dépistage de trisomie 21, la technique choisie doit présenter une bonne reproductibilité pour les valeurs élevées, situées dans la zone de 30 000 à 60 000 UI/l (19).

Une étude multicentrique réalisée dans quinze laboratoires en 1991 (étude coordonnée par l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant) a permis de définir des valeurs seuils (20). Ces valeurs seuils, exprimées en percentiles, sont déterminées en tenant compte de l'âge gestationnel et de l'âge maternel. Ces valeurs sont données pour une technique déterminée et ne peuvent pas être extrapolées à une autre technique.

Lorsque l'hCG est supérieure à cette valeur seuil, la patiente fait partie d'un groupe à risque et une amniocentèse avec détermination du caryotype fœtal est alors indiquée.

#### **L'amniocentèse est conseillée si la Concentration d'hCG est :**

- supérieure ou égale au 95<sup>e</sup> percentile pour les femmes de 30 à 34 ans,
- supérieure ou égale au 80<sup>e</sup> percentile pour les femmes de 35-36 ans,
- supérieure ou égale au 70<sup>e</sup> percentile pour les femmes de 37 ans.

A l'heure actuelle, un groupe supplémentaire a été défini et l'amniocentèse est conseillée en cas d'hCG supérieure ou égale au 90<sup>e</sup> percentile pour les femmes de 32 à 34 ans

Il faut noter qu'il s'agit d'un test de dépistage statistique et qu'en dessous des valeurs seuils, on ne peut pas avoir la certitude que le fœtus ne sera pas atteint de trisomie 21.

Ces valeurs seuils ne sont pas utilisables en cas de grossesse gémellaire. Par ailleurs, l'origine ethnique est importante à connaître, car il semble que les valeurs d'hCG soient plus élevées chez les femmes noires et antillaises (3-20).

## **■ VII. CONCLUSION**

---

La présence d'hCG en dehors de la grossesse est toujours anormale (à l'exception des faibles concentrations rencontrées chez les sujets de plus de 45 ans).

La diversité des formes moléculaires d'hCG immunoréactives et leur variation en fonction des situations physiopathologiques impose la connaissance précise de la spécificité des anticorps utilisés et du contexte clinique. Lorsque le dosage est demandé dans le cadre d'un diagnostic ou d'un suivi de tumeurs, il est indispensable d'utiliser des techniques permettant la reconnaissance de l'hCG et des sous-unités  $\beta$  libres qui peuvent être sécrétées simultanément ou isolément. L'utilisation de techniques spécifiques des sous-unités  $\beta$  libres plus sensibles peut être utile dans certains cas. Enfin, il est indispensable d'utiliser toujours la même technique pour le suivi d'un même malade, compte-tenu des différences intertechniques existantes.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Husa RO (1980) Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev.* 1, 268-294
2. Hoermann R, Spoettl G, Moncayo R, Mann K (1990) Evidence for the presence of human chorionic gonadotropin (hCG) and free beta-subunit of hCG in the human pituitary. *J. Clin. Metab. Endocrinol.* 71,179-186
3. Muller F, Boué A (1990) A single chorionic gonadotropin assay for maternal serum screening for Down's syndrome. *Prenatal Diagn.* 10, 389-398
4. Knight GJ, Cole LA (1991) Measurement of choriogonadotropin free  $\beta$ -subunit : an alternative to choriogonadotropin in screening for fetal Down's syndrome. *Clin. Chem.* 37,779-782
5. Marcillac I, Cottu P, Theodore C, Terrier-Lacombe MJ, Bellet D, Droz JP (1993) Free hCG- $\beta$ subunit as tumor marker in urothelial cancer. *The Lancet* 341, 1354-1355
6. Bidard JM, Troalen F, Bellet D (1993) L'hormone chorionique gonadotrope et ses formes moléculaires. *Spectra Biologie* 93/6, 33-39
7. Norman RJ, Buck RH, De Medeiros SF (1990) Measurement of human chorionic gonadotrophin (hCG) : indications and techniques for the clinical laboratory. *Ann. Clin. Biochem.* 27, 183-194
8. Akar, AH, Gervasi G, Blacker C, Wehmann RE, Bliethe DL, Nisula BC (1990) Human chorionic gonadotrophin-like and  $\beta$ -core-like materials in postmenopausal urine. *Journal of Endocrinology*, 125, 477-484
9. Schwarz S, Berger P, Wick G (1986) The antigenic surface of human chorionic gonadotropin as mapped by murine monoclonal antibodies. *Endocrinology* 118, 189-197
10. Cole L, Seifer D, Kardana A, Braunstein G (1993) Selecting human chorionic gonadotropin immunoassays : consideration of cross-reacting molecules in first-trimester pregnancy serum and urine. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168, 1580-1586
11. Cole A, Kardana A (1992) Discordant results in human chorionic gonadotropin assays. *Clin. Chem.* 38/2, 263-270
12. Thomas CMG, Segers MFG (1989) Quantification of choriogonadotropin : differential cross-reactivities of the free hCG  $\beta$ -subunit with eight different monoclonal antibody based hCG and (hCG +  $\beta$ ) "sandwich" - type assays. *Clin. Chem.* 35/8, 1791-1792
13. Connois T, Gautier E (1991) Etude de l'hCG comme marqueur de la trisomie 21. *Feuillets de Biologie* 180, 59-64
14. Stevenson HP, Leslie H, Sheridan B (1993) Serum  $\beta$ -human chorionic gonadotrophin concentrations increase in unseparated blood specimens. *Ann. Clin. Biochem.* 30, 99-100
15. Ozturk M, Bellet D, Manil L et al (1987) Physiological studies of human chorionic gonadotropin (hCG),  $\alpha$ hCG and  $\beta$ hCG as measured by specific monoclonal immunoradiometric assays. *Endocrinology* 120, 549-558
16. Ozturk M, Berkowitz R, Codstein D et al (1988) differential production of human chorionic gonadotropin and free subunits in gestational trophoblastic disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158, 193-198
17. Pabot du Chatelard P, Daver A (1993) Intérêt clinique de l'AFP et de la  $\beta$ hCG dans les tumeurs germinales testiculaires. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 8, 228-233
18. Marcillac J, Troalen F, Bidart JM et al (1992) Free human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit in gonadal and non gonadal neoplasms. *Cancer Res.* 52, 3901-3907
19. Muller F, Coumaros G, Colombier M, Cassuto G, Dubin MF, Roux F, Ruffie A, Boue A (1992) Spécifications du réactif hCG pour le dépistage anténatal de la trisomie 21. *Immunoanal. Biol. Spéc.* 33,39-48
20. Poloce F, Pichot J, Malliavin A (1991) L'élévation de l'hCG est-elle un bon marqueur du risque de trisomie 21? *Rev. Fr. Gynécol. Obstét.* 86, 691-694



# HORMONE THYREOSTIMULANTE (TSH)

R. COHEN, A. BEAUDONNET, A.C. RENARD

## I. RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

L'hormone thyroïdostimulante (TSH) ou thyrotrophine fait partie d'une famille de glycoprotéines, comprenant en outre les gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH) et la gonadotrophine chorionique (hCG). Elles dérivent vraisemblablement d'un même gène ancestral et sont constituées de deux chaînes polypeptidiques, dénommées sous-unités alpha et bêta, et de glucides représentant 15 à 30% de la masse molaire totale. La sous-unité alpha est identique pour ces quatre hormones, alors que les sous-unités bêta diffèrent et sont spécifiques de chaque hormone, à laquelle elles confèrent l'activité biologique et immunologique (1).

La masse molaire de la TSH est d'environ 28 000 g.mol<sup>-1</sup>. La chaîne β, comprenant 112 acides aminés, est réunie à la chaîne α par des liaisons non covalentes. La combinaison de deux sous-unités est indispensable à l'action hormonale ; in vivo, au pH physiologique, il n'y a pas de dissociation. La TSH comprend trois unités oligosaccharidiques branchées sur les deux chaînes (2), dont la présence augmente la solubilité de l'hormone ; elles n'interviennent pas dans l'interaction avec le récepteur mais sont essentielles pour stimuler la production d'AMP cyclique.

Grâce à l'outil que constituent les anticorps monoclonaux, une carte épitopique de la molécule a pu être établie : deux épitopes sont situés sur la chaîne α, six sur la chaîne β et quatre autres n'apparaissent qu'en présence des deux sous-unités liées (3). C'est en sélectionnant les anticorps les mieux adaptés que les immunodosages très spécifiques que l'on connaît actuellement ont pu être mis au point.

La TSH produite par l'hypophyse circule sous forme libre dans le plasma. Chez l'homme, la demi-vie de la TSH est d'environ 60 minutes. Les principaux sites d'inactivation de l'hormone sont le foie et le rein.

La TSH est le principal facteur contrôlant la synthèse des hormones thyroïdiennes. L'administration de TSH conduit à une augmentation de taille et de vascularisation de la glande, de synthèse et de sécrétion des hormones. La TSH circulante se lie à des récepteurs spécifiques membranaires de nature glycoprotéique. La fixation de la TSH à son récepteur déclenche l'activation de l'adénylcyclase et la production d'AMP cyclique qui constitue le médiateur intracellulaire de la plupart des effets de la TSH.

La sécrétion de la TSH est soumise à l'effet inhibiteur des hormones thyroïdiennes. Le rétrocontrôle hypophysaire de la sécrétion de TSH par les hormones thyroïdiennes constitue le principal facteur de régulation. De faibles variations des concentrations de T<sub>4</sub> et/ou de T<sub>3</sub> provoquent une adaptation immédiate de l'excrétion de TSH et à plus long terme de sa synthèse. Ce sont surtout les formes libres de T<sub>4</sub> et de T<sub>3</sub> circulantes qui interviennent dans le rétrocontrôle.

La sécrétion de TSH est soumise à l'effet stimulant de la TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*). Premier peptide hypothalamique de stimulation hypophysaire isolé et caractérisé, TRH est un tripeptide, largement produit dans le système nerveux central mais aussi le pancréas, le tractus digestif. TRH se lie à récepteurs membranaires présents sur les cellules thyrotropes et aussi sur les cellules prolactiniques et les cellules somatotropes des tumeurs productrices d'hormone de croissance. L'administration de TRH entraîne une réponse sécrétoire de TSH qui apparaît dès la cinquième minute et qui est maximum entre la quinzième et la trentième minute.

D'autres facteurs interviennent dans la régulation de la sécrétion de TSH. Les dopaminergiques ont un effet inhibiteur tonique qui s'exerce au niveau hypophysaire. Le contrôle noradrénergique de la TSH s'exerce par l'intermédiaire de l'hypothalamus et la production de TRH. Il intervient particulièrement lors de l'exposition au froid qui augmente la TSH et les hormones thyroïdiennes. La somatostatine (SRIH), en administration aiguë, diminue la TSH. Les stéroïdes sexuels influencent surtout les réponses de TSH à TRH qui sont plus importantes chez la femme que chez l'homme. L'effet inhibiteur des glucocorticoïdes s'exprime à la fois aux niveaux hypophysaire et hypothalamique. Ils induisent une réduction de la TSH basale, des pics nocturnes de TSH et de réponse de TSH à TRH.

## ■ II. INTERET PHYSIOPATHOLOGIQUE

---

La mesure de la TSH constitue, à l'heure actuelle, le meilleur indicateur de la fonction thyroïdienne (4). L'hypophyse thyroïdienne est extrêmement sensible au rétrocontrôle des hormones thyroïdiennes, au point que les concentrations de  $T_4$  circulante sont inversement corrélées au logarithme de la TSH (une réduction de moitié de la  $T_4$  circulante multiplie par 100 la concentration de TSH). Ainsi de petites modifications de l'imprégnation hormonale sont susceptibles d'être démasquées par une augmentation ou une diminution isolée de la TSH, alors même que les concentrations de  $T_4$  et  $T_3$  restent dans les limites des valeurs de référence d'une population témoin. De plus, chaque individu possède sa propre corrélation  $T_4$ -TSH, et à un moment donné un point d'équilibre qui lui est spécifique.

Précocement l'hyperthyroïdie abolit la rythmicité nyctémérale de la TSH et diminue l'amplitude des réponses de TSH à TRH. Cependant ces signes ne sont pas spécifiques (**tableau I**) et leur intérêt pratique dans l'exploration des dysfonctions primitivement thyroïdiennes est mis en doute depuis que l'on dispose des dosages de TSH de troisième génération.

La production de TSH dépend naturellement de la qualité des fonctions hypothalamiques et hypophysaires. En revanche, le dosage de TSH connaît moins d'artefacts méthodologiques (autoanticorps circulants) et de facteurs d'influence que ceux de  $T_4$  et de  $T_3$  (**tableau I**). Enfin, l'adaptation de la fonction thyroïdienne est lente et la normalisation de la TSH n'est obtenue que plusieurs semaines après la correction d'un état thyrotoxique. Pour la même raison, on ne peut valablement juger du niveau de la TSH que six à huit semaines après l'adaptation d'une posologie substitutive par les hormones thyroïdiennes.

## ■ III. TECHNIQUES DE DOSAGE

---

### **Améliorations du dosage de TSH depuis 25 ans**

Historiquement, on a assisté à une amélioration considérable de la limite de détection du dosage de TSH (5). Celle-ci est passée d'une valeur de 1 mUI/L, typique des dosages radioimmunologiques par compétition, utilisés vers la fin des années soixante jusqu'au milieu des années quatre-vingts, à un niveau compris entre 0,1 et 0,01 mUI/L, caractéristique des dosages immunométriques actuels (6).

Les dosages de première génération avec une limite de détection de l'ordre de 1 à 2 mUI/L, étaient incapables de discriminer les sujets euthyroïdiens de ceux atteints de maladie de Basedow.

### **Causes d'abolition des pics nocturnes de TSH (et réduction des réponses de TSH à TRH)**

- hyperthyroïdies frustes
- hypothyroïdies centrales
- états dépressifs
- insuffisance rénale
- corticothérapie
- maladies générales non thyroïdiennes

### **Causes d'élévation de la TSH**

- hypothyroïdies protothyroïdiennes
- adénome thyroïdienne
- syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes
- pic sécrétoire de la période néonatale
- certaines hypothyroïdies d'origine hypothalamo-hypophysaire
- insuffisance surrénale
- prise d'amiodarone
- anticorps hétérophiles

### **Causes d'abaissement de la TSH**

- hyperthyroïdies protothyroïdiennes actuelles et récentes
- grossesse
- certaines hypothyroïdies d'origine hypothalamo-hypophysaire
- imprégnation récente et massive par la dopamine ou les glucocorticoïdes

*Tableau I : variations physiopathologiques de la TSH (d'après (4))*

L'avènement de la technologie des anticorps monoclonaux et son application aux immunodosages par excès d'anticorps vers 1985, a conduit au développement d'une deuxième génération de dosages de TSH possédant une détectabilité meilleur d'un ordre de grandeur (c'est-à-dire d'un facteur 10) que les dosages radioimmunologiques. Grâce à eux, il était possible pour la première fois de discriminer les sujets euthyroïdiens de ceux atteints d'une hyperthyroïdie franche (7). En 1990, est apparue une troisième génération de dosages dont la limite de détection était plus basse de deux ordres de grandeur (100 fois) que les dosages par compétition initiaux. Ceux-ci ont permis de confirmer que la sécrétion de TSH dans l'hyperthyroïdie franche est complètement abolie ou, à tout le moins, que les niveaux de TSH sériques sont indétectables (inférieurs à 0,01 mUI/L) même avec les techniques de troisième génération.

Les progrès technologiques précédents ont modifié la place du dosage de TSH dans l'exploration thyroïdienne. Le niveau de TSH sérique est actuellement considéré comme le marqueur de l'action biologique des hormones thyroïdiennes sur les tissus (en l'occurrence l'hypophyse) le plus sensible et le plus facilement accessible. Ces progrès ont également permis la description de différents degrés de dysfonctions thyroïdiennes. Enfin, avec remplacement des dosages de première génération par ceux de deuxième et troisième générations, le statut du dosage de TSH est passé d'un test de confirmation de l'hypothyroïdie primaire à un test de première intention dans un grand nombre de situations.

### **Principe et classification des dosages immunométriques de TSH**

Les dosages immunométriques et notamment leur variante "sandwich" ont complétement évincé les immunodosages par compétition en raison de leur meilleure sensibilité potentielle. Un anticorps monoclonal antiTSH, fixé sur une phase solide, est utilisé pour extraire la TSH d'un spécimen en présence d'anticorps mono- ou polyclonaux marqués. Après incubation et séparation des formes libre et liée, la phase solide fournit un signal radioactif, enzymatique, fluorescent ou chimiluminescent, directement proportionnel à la concentration de TSH présente dans

le spécimen. Les immunodosages de TSH sont habituellement calibrés par rapport à la seconde préparation internationale de référence (2nd IRP MRC 80/558).

La classification des dosages de TSH est fondée sur leur limite de détection fonctionnelle. Elle est reconnue par l'"American Thyroid Association" qui préconise de ne plus utiliser la limite de détection analytique (8). Cette dernière présente, en effet, l'inconvénient majeur de ne pas correspondre à la réalité clinique car son estimation prend en compte uniquement la variabilité intrasérie et néglige les facteurs de fluctuation d'une série à l'autre que sont, par exemple, le vieillissement des réactifs, le changement de lots ou de manipulateur, les facteurs liés à l'instrumentation ou à son environnement. La limite de détection fonctionnelle doit être déterminée à partir d'un profil de précision établi grâce à des mesures spécimens, répétées dans différentes séries. Celles-ci doivent être réalisées par des techniciens différents, à des jours différents et à l'aide de lots de réactifs différents afin de se placer dans les conditions les plus proches de celles qui correspondent aux soins des patients.

La limite de détection fonctionnelle est définie comme la concentration (la plus basse) mesurée avec un CV inter-séries de 20%. Celui-ci est déterminé à l'aide du profil de précision établi selon les indications précédentes. En pratique, la limite de détection fonctionnelle est cinq à dix fois supérieure à la limite de détection analytique (9).

A partir de ce critère objectif, il est possible de classer les dosages de TSH en plusieurs "générations", le passage d'une "génération" à la suivante correspondant au gain d'un ordre de grandeur en limite de détection fonctionnelle (6):

Génération du dosage de TSH	Limite de détection fonctionnelle (mUI/L)
Première	1-2
Deuxième	0,1-0,2
Troisième	0,01-0,02
Quatrième	0,001-0,002

### Principaux facteurs déterminant la limite de détection fonctionnelle

Plusieurs paramètres influencent la limite de détection fonctionnelle d'un immunodosage :

- la marque ; ce sont les dosages immunochimiluminométriques qui permettent, potentiellement, d'atteindre les limites de détection les plus basses ; on trouve dans cette catégorie principalement les dosages réputés de troisième génération ; cependant, tous les dosages ne sont pas de qualité équivalente en relation avec la molécule chimiluminescente choisie ou avec d'autres facteurs (10, 11, 12),
- l'efficacité du lavage de la phase solide et des agents introduits dans le milieu d'incubation de manière à réduire au niveau le plus bas possible la liaison non spécifique de l'anticorps marqué,
- la matrice exemple de TSH dans laquelle sont préparées les solutions étalons ; on utilise généralement du sérum animal (cheval, porc) en supposant que les épitopes existant sur la TSH animale ne présentent pas de réaction croisée avec les anticorps antiTSH humaine ; très souvent, les protéines du sérum animal réagissent avec la phase solide pour engendrer un signal non spécifique incompatible avec l'obtention des limites de détection théoriques,
- l'hétérogénéité de la TSH circulante ; celle-ci diffère par sa charge et sa glycosylation de la TSH extraite d'hypophyses et utilisée comme étalon (13) ; de plus, l'hétérogénéité de la TSH circulante dépend de l'état clinique du patient et constitue un facteur important lorsqu'il s'agit de mesurer des quantités de l'ordre de la femtomole ( $10^{-15}$  mol) avec les techniques de troisième génération.

### Variations entre laboratoires de la limite de détection d'un même immunodosage

La limite de détection fonctionnelle d'un dosage de TSH peut varier d'un facteur 5 selon le laboratoire dans lequel il est mis en œuvre en relation avec la robustesse de la technique. Ainsi, un dosage de deuxième génération dans de mauvaises conditions d'utilisation peut donner des performances de première génération. C'est pourquoi, il est conseillé de contrôler tout dosage avec un pool faible (0,1-0,2, mUI/L pour un dosage de deuxième génération).

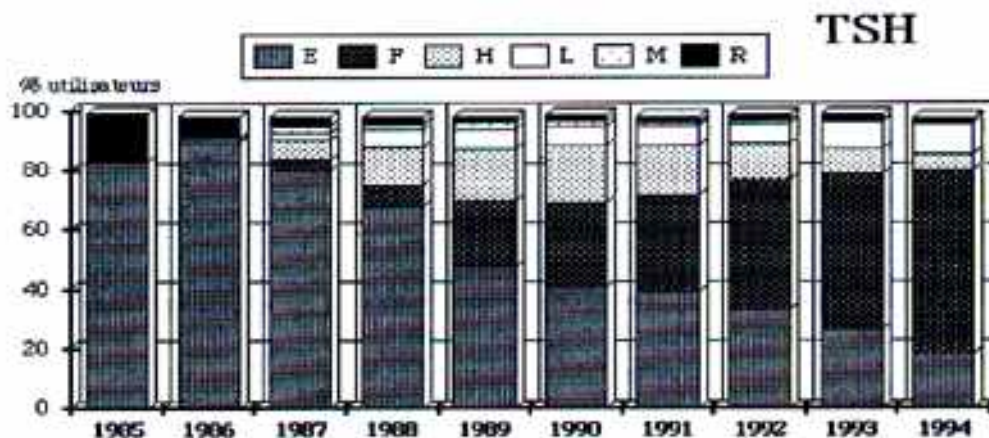
## Intérêts de l'utilisation d'un dosage de TSH de troisième génération

- Un dosage de troisième génération permet de garantir au minimum des performances de deuxième génération dans tous laboratoires. De même, pour interpréter correctement un résultat subnormal le clinicien a besoin de connaître la technique utilisée (14).
- Il permet un diagnostic plus faible des hyperthyroïdies subcliniques. A phase, même si les hormones thyroïdiennes libres sont encore normales, la TSH s'effondre car elle rend compte du point d'équilibre individuel à chaque patient. Dans cette situation, l'utilité clinique d'un dosage de troisième génération est supérieure à condition que le statut thyroïdien soit stable (absence de traitement par les antithyroïdiens ou substitutif) et que le trouble ne soit pas d'origine hypothalamique ou hypophysaire.
- Associé à la T4 libre et aux anticorps antithyroperoxydase en tant que tests de seconde intention, il devient l'un des éléments essentiels d'une stratégie efficace de dépistage des dysthyroïdies chez les patients non hospitalisés.

## ■ IV. ETAT DE L'ART

Le dosage de TSH a été inclus dès 1985 parmi les analyses soumis aux opérations de contrôle national. Pourtant, les spécimens de contrôle possédant une concentration suffisamment basse pour apprécier la limite de détection des trousse, n'ont été disponibles qu'à partir de 1993.

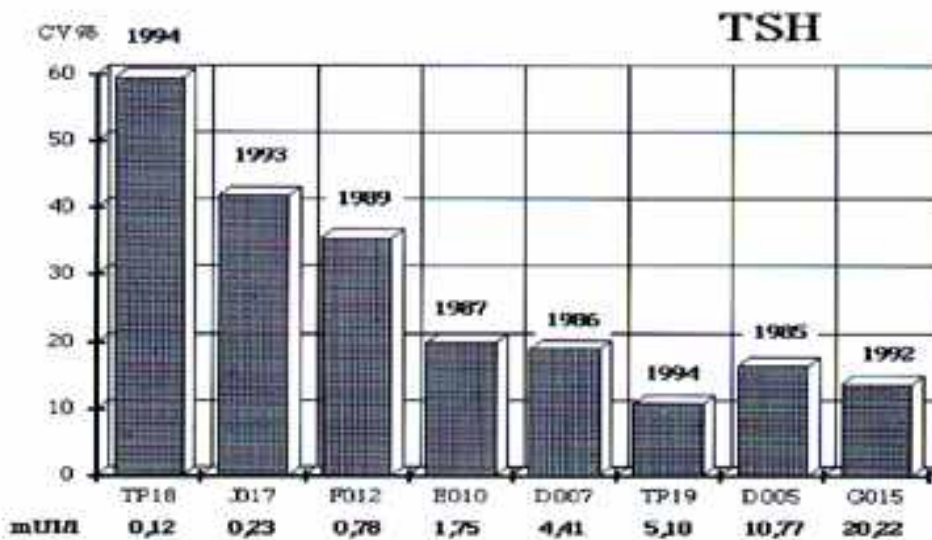
La **figure 1** indique la "popularité" actuelle des techniques et son évolution sur la période de 1985-1994. Les trousse incluant une marque enzymatique et s'achevant par une mesure d'absorbance, largement majoritaires au début, ont vu le nombre de leurs utilisateurs diminuer progressivement pour atteindre 18% en 1994. Cette diminution s'est faite au profit, principalement des techniques avec marque enzymatique et mesure de fluorescence dont les utilisateurs représentent 61% et, à un moindre degré, des techniques avec marque chimique et mesure de luminescence, adoptées par plus de 10% des laboratoires. Le nombre d'utilisateurs des techniques avec marque radioisotopique, pratiquement constant en valeur absolue, a régulièrement diminué en pourcentage avec l'augmentation des participants et représente moins de 2% en 1994.



*Figure 1 : évolution de la "popularité" des techniques adoptées par les participants aux opérations de contrôle national sur la période 1985-1994. Les techniques sont classées dans les grands groupes suivants :*

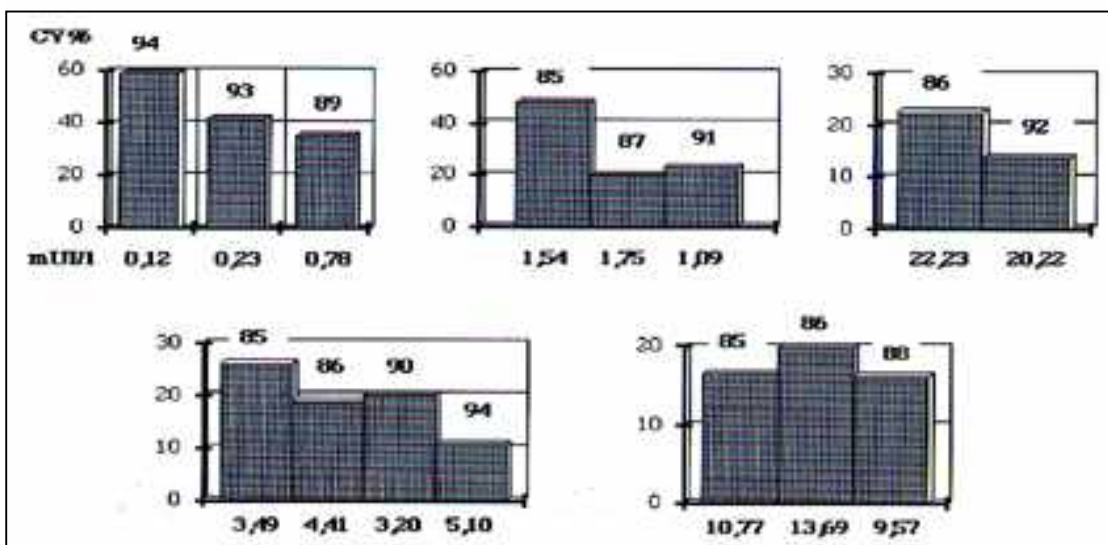
- E marque enzymatique et mesure spectrophotométrique (Biotrol 7000, CIS Pack, Cobas Core, ES, SRI, EIA manuelle)
- F marque enzymatique et mesure de fluorescence (AIA, Axsym, IMx, Opus, Stratus, Vidas)
- H marque enzymatique et mesure de luminescence (Amerlite, Access)
- L marque chimique et mesure de luminescence (Magic Lite, ACS 180, Berilux)
- M marque chimique et mesure de fluorescence (Delfia)
- R marque radioisotopique

La **figure 2**, qui représente l'évolution du CV exprimant la variabilité totale (interlaboratoire et inter-trousses) en fonction de la concentration, a bien l'allure caractéristique du profil de précision d'un immunodosage : la zone de reproductibilité optimale est située entre 1 et 20 mUI/L ; la concentration supérieure est insuffisante pour que la précision se détériore ; en revanche, la variabilité totale augmente considérablement en dessous de 1 mUI/L, indiquant la proximité de la limite inférieure du domaine de mesure des dosages de TSH disponibles. Les accidents sur la courbe sont dus au fait qu'elle est réalisée à partir de spécimens distribués sur une longue période (10 ans) au cours de laquelle l'échantillon statistique de participants a évolué et les techniques se sont améliorées grâce, notamment, à l'automatisation



**Figure 2** : CV tronqués toutes techniques confondues, observés pour huit spécimens classés en fonction de leur concentration et analysés entre 1985 et 1994 dans le cadre du contrôle national.

Au total, entre juin 1985 et juin 1994, quinze spécimens de contrôle ont été distribués. Dans la **figure 3**, tous les spécimens qui possèdent sensiblement la même concentration de TSH ont été regroupés de manière à montrer l'évolution de la variabilité totale du dosage au cours de cette période. On constate une diminution du CV quel que soit le niveau de concentration, à l'exception des valeurs basses pour lesquelles le nombre de spécimens est insuffisant. Ailleurs dans le domaine de mesure, les valeurs basses pour lesquelles le nombre de spécimens est insuffisant. Ailleurs dans le domaine de mesure, les valeurs de CV se situent couramment entre 10 et 20 %.

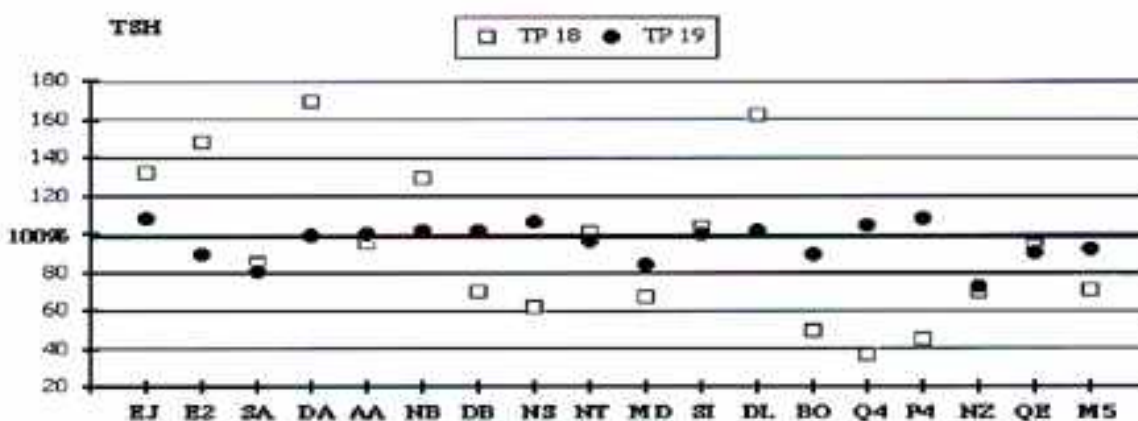


**Figure 3** : évolution du CV toutes techniques confondues, sur la période 1985-1994, pour des spécimens de contrôle de concentrations en TSH voisines.

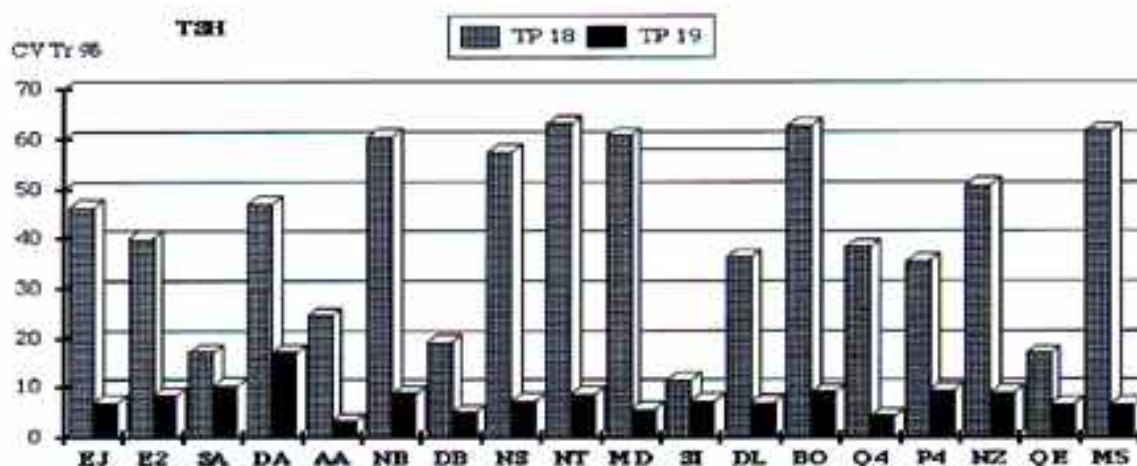
En ce qui concerne, à présent, les résultats de l'opération de juin 1994 (spécimens TP18 et TP19), la **figure 4** récapitule les moyennes exprimées en pourcentage de la moyenne générale, et la **figure 5** les CV obtenus avec les principales trouses.

Pour le spécimen TP 19, dont la concentration (5,10 mUI/L) est dans la zone limite des sujets eu- et hypothyroïdiens, les valeurs fournies par les trouses les plus utilisées sont, pour la plupart comprises entre 80 et 120% de la moyenne générale et les CV interlaboratoires sont pratiquement tous inférieurs à 10%.

En revanche, la situation est moins satisfaisante pour le spécimen TP 18, particulièrement intéressant en raison de sa concentration en TSH (0,12 mUI/L) qui correspond parfaitement à la limite de détection fonctionnelle d'un dosage de deuxième génération. Les écarts entre trouses sont importants puisque les valeurs moyennes fluctuent entre 40 et 170% de la moyenne générale. Les valeurs les plus basses, obtenues avec les trouses Q4 et P4, peuvent s'expliquer par la moindre reconnaissance de la TSH présente dans le spécimen de contrôle par rapport à celle présente dans l'étalon de la trousse, en raison de l'hétérogénéité moléculaire. Le même phénomène se produit avec les spécimens de patients dont la sécrétion de TSH n'a pas subi de stimulation par TRH et n'est pas retrouvé sur les spécimens obtenus après injection de TRH (13).



**Figure 4** : moyennes de TSH des trouses les plus utilisées, exprimées en pourcentage de la moyenne générale, au cours de l'opération de contrôle national de juin 1994.



**Figure 5** : reproductibilité (CV) interlaboratoire des trouses les plus utilisées au cours de l'opération de contrôle national de juin 1994.

L'examen des CV interlaboratoires permet de se faire une idée de l'appartenance des trousse à telle ou telle génération de dosages de TSH, même si leur classification repose sur les CV inter-séries (intralaboratoires). Les trousse qui fournissent des CV inférieurs ou légèrement supérieurs à 20% (SA, AA, DB, SI, QE) sont soit des trousse de troisième génération, soit des trousse de deuxième génération robustes. Les autres trousse, présentées comme appartenant à la deuxième voire à la troisième génération, peuvent être considérées, au vu de leur CV interlaboratoire, comme des techniques de deuxième génération qui ont des performances de première génération dans certains laboratoires en raison des conditions de leur utilisation. Les remarques qui précèdent méritent, cependant, d'être tempérées pour deux raisons. Tout d'abord, le CV doit être interprété en fonction de la valeur moyenne fournie par chaque trousse dans un domaine où son évolution est brutale. Ensuite, ces observations découlent d'un seul spécimen de contrôle dont la matrice a subi des traitements et, par conséquent, peut différer de celle des spécimens de patients.

## ■ V. ETAPE PREANALYTIQUE

---

Les dosages peuvent être réalisés sur sérum ou plasma. L'interférence des anticoagulants doit être étudiée pour chaque système. Le spécimen peut être conservé pendant 24 h après le prélèvement à + 4 °C ou plus longtemps à - 20 °C. Il est préférable d'éviter les congélations et décongélations successives.

## ■ VI. INTERPRETATION DES RESULTATS

---

### Variations biologiques

- Rythme circadien : il existe un rythme nyctéméral de la sécrétion de TSH avec un pic nocturne et un nadir dans l'après-midi l'amplitude des variations étant de 50 à 200% chez un même individu.
- Age : chez le nouveau-né survient un pic de TSH (50 à 80 mUI/L), dans les minutes qui suivent l'accouchement ; celui-ci régresse rapidement dans les 24 à 72 heures. Chez le sujet âgé, les données sont contradictoires (15) sur les valeurs basales de TSH ; on considère, toutefois, qu'il n'y a pas de modification notable avant 80 ans.

A l'exception des situations précédentes, les variations liées au sexe, à la période du cycle menstruel, à la grossesse sont faibles.

### Valeurs de référence

Les valeurs dépendent du réactif utilisé et ne sont données qu'à titre indicatif (16) :

- <u>nourrisson</u>		
1 jour	<70	mUI/L
2 à 3 jours	<30	mUI/L
3 à 7 jours	<10	mUI/L
> 1 semaine	0,20 à 4,0	mUI/L
- <u>adulte</u>		
	0,15 à 4,0	mUI/L



## BIBLIOGRAPHIE

---

1. TOURNAIRE J. Endocrinologie, diabète, nutrition pour le praticien. Simep (éd). 1994
2. WEINTRAUB BD, STANNARD BS, MAGNER JA, RONIN C, TAYLOR T, JOSHI L, CONSTANT RB et al. Glycosylation and posttranslational processing of Thyroid-Stimulating Hormone : clinical implications. *Recent Prog Horm Res*, 1986, 41, 577-606
3. BENKIRANE MM, BON D, COSTAGLIOLA S, PAOLUCCI F, DARBOURET B, PRINCE P, CARAYON P. Monoclonal antibody mapping of the antigenic surface of human thyrotropin and its subunits. *Endocrinology*, 1987, 121, 3, 1171-7
4. WEMEAU JL. Les marqueurs de la fonction thyroïdienne. Symposium Immunotech, Grenoble 1994.
5. SPENCER CA. New roles for TSH measurement in Thyroid testing. Monographie Kodak Clinical Diagnostics 1993.
6. NICOLOFF JT, SPENCER CA. The use and misuse of the sensitive thyrotropin assays. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71, 553-8
7. SPENCER CA, LAI-ROSENFELD AO, GUTTNER RB, LOPRESTI JS, MARCUS AO, NIMALASURIYA A, EIGEN A, et al. Thyrotropin secretion in thyrotoxic and thyroxine-treated patients : assessment by a sensitive immunoenzymometric assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 63, 349-55
8. HAY ID, BAYER MF, KAPLAN MM, KLEE GG, LARSEN PR, SPENCER CA. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. *Clin Chem*, 1991, 37, 2002-8
9. SPENCER CA. Thyroid profiling for the 1990's : FT4 estimate or sensitive TSH measurement. *J Clin Immunoass*, 1989, 12, 82-9
10. McCAPRA F, WATMORE D, SUMUN F, PATEL A, BEHESHTI I, RAMAKRISHNAN K, BRANSON J. Luminescent labels for immunoassay : from concept to practice. *J. Biolum Chimilum*, 1989, 4, 51-8
11. ROSS DS, DANIELS GH, GOUVEIA D. The use and limitations of a chemiluminescent thyrotropin assay as a single thyroid function test in an out-patient endocrine clinic. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71, 764-9
12. SPENCER CA, SCHWARZBEIN D, GUTTNER RB, LOPRESTI JS, NICOLOFF JT. TRH stimulation test responses employing 3rd and 4th generation TSH assay technology. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75, 6
13. WILKINSON E, RAE PW, THOMSON KJ, TOFT AD, SPENCER CA, BECKETT GJ. Chemiluminescent third-generation assay (Amerlite TSH-30) of Thyroid-Stimulating Hormone in serum or plasma assessed. *Clin Chem*, 1993, 39, 10, 2166-73
14. PIKETTY ML. Compte rendu de la conférence sur la TSH de SPENCER CA. *Immunoanal Biol Spéc*, 1995, 10, 62-6
15. MARIOTTI S, BARBESINO G, CATUREGLI P, BARTALENA L, SANSONI P, FAGNONI F, MONTI D. Complex alteration of thyroid function in healthy centenarians. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77, 1130-34
16. BLACQUE BELAIR A. Dictionnaire des constantes biologiques et physiques en médecine. Maloine (éd), Paris, 6ème édition, 1991, 749-54

# SOMMAIRE

<b>PREFACE</b> .....	p. 1
<b>LISTE DES AUTEURS</b> .....	p. 2
<b>CHAPITRE 1</b>	
- Le Contrôle de Qualité National en immunoanalyse. Réflexions après onze années de fonctionnement .....	p. 3
<b>CHAPITRE 2</b>	
- Critères de qualité en immunoanalyse .....	p. 7
- Pièges et problèmes en immunoanalyse .....	p. 16
- Problèmes liés au marqueur et à son signal en immunoanalyse .....	p. 28
	p. 3
<b>CHAPITRE 3</b>	
- Antigène carbohydate 19-9 (CA 19-9) .....	p. 41
- Antigène spécifique de la prostate (PSA) .....	p. 48
- Hormone chorionique gonadotrope (hCG) et sous-unité $\beta$ ( $\beta$ hCG) .....	p. 55
- Hormone thyroïdienne (TSH) .....	p. 63

***Cahiers de formation déjà parus***

- |                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : <b>HÉMATOLOGIE</b>            | N° 15 : <b>DÉPISTAGE</b>              |
| N° 2 : <b>IMMUNOANALYSE</b>          | <b>DE LA TRISOMIE 21</b>              |
| N° 3 : <b>PARASITOLOGIE</b>          | N° 16 : <b>IMMUNO-ALLERGIE (2)</b>    |
| N° 4 : <b>BACTÉRIOLOGIE</b>          | N° 17 : <b>VIRUS DES HÉPATITES</b>    |
| N° 5 : <b>HORMONOLOGIE</b>           | <b>A (VHA) et E (VHE)</b>             |
| <b>GAZOMÉTRIE</b>                    | N° 18 : <b>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</b> |
| N° 6 : <b>G.B.E.A.</b>               | <b>TOME II</b>                        |
| N° 7 : <b>IMMUNO-ALLERGIE (1)</b>    | N° 19 : <b>VAGINITES ET VAGINOSES</b> |
| N° 8 : <b>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</b>  | N° 20 : <b>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</b> |
| <b>LIPIDES</b>                       | N° 21 : <b>VIRUS DES HÉPATITES</b>    |
| N° 9 : <b>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</b> | <b>B (VHB), DELTA (VDH),</b>          |
| <b>TOME I</b>                        | <b>C (VHC), AUTRES</b>                |
| N° 10 : <b>HÉMATOLOGIE</b>           | N° 22 : <b>SYNDROME</b>               |
| <b>CAS ILLUSTRÉS</b>                 | <b>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</b>        |
| N° 11 : <b>AMIBES ET FLAGELLÉS</b>   | N° 23 : <b>PARASITES SANGUINS</b>     |
| <b>INTESTINAUX</b>                   | N° 24 : <b>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</b>  |
| N° 12 : <b>LES MALADIES A PRIONS</b> | N° 25 : <b>LES MOISSISSURES</b>       |
| N° 13 : <b>AUTOIMMUNITÉ</b>          | <b>D'INTÉRÊT MÉDICAL</b>              |
| <b>ET AUTOANTICORPS</b>              |                                       |
| N° 14 : <b>L'EXPLORATION</b>         |                                       |
| <b>DE LA THYROÏDE</b>                |                                       |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet [www.bioforma.net](http://www.bioforma.net) à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.