

Biochimie médicale

Marqueurs actuels et perspectives

Deuxième édition
revue et augmentée



Association des enseignants de biochimie et biologie
moléculaire des facultés de pharmacie

Biochimie médicale

Marqueurs actuels et perspectives

Deuxième édition
revue et augmentée

Jean-Louis Beaudeau ■ Geneviève Durand

coordonnateurs

Médecine Sciences

Publications

<http://www.medecine.lavoisier.fr>

Chez le même éditeur

La petite encyclopédie médicale Hamburger
LEPORRIER M., 20^e éd. 2011

Atlas de poche de biochimie humaine
KOOLMAN J., ROHM K.H., 4^e éd. 2011

Biologie moléculaire de la cellule – livre de cours
ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K.,
WALTER P., avec CD-Rom, 5^e éd. 2011

Biologie moléculaire de la cellule – livre d'exercices
WILSON J., HUNT T., 5^e éd. 2011

Cycle cellulaire et cytométrie en flux
GRUNWALD D., MAYOL J.-F., RONOT X., 2010

Manuel de poche de biologie cellulaire
PLATTNER H., HENTSCHEL J., 2009

Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire
LAVOINNE A., BEKRI S., 6^e éd. 2008

Biochimie
STRYER L., BERG J., TYMOCZKO J., 6^e éd. 2008

Atlas de poche de physiologie
SILBERNAGL S., DESPOPOULOS A., 4^e éd. 2008

Atlas de poche de génétique
PASSARGE E., 3^e éd. 2008

Biologie moléculaire et médecine
KAPLAN J.-C., DELPECH M., 3^e éd. 2007

*La brevetabilité des innovations biotechnologiques appliquées
à l'Homme*
CHEMTOB-CONCÉ M.-C., 3^e éd. 2006

La cytométrie en flux
RONOT X., GRUNWALD D., MAYOL J.-F., BOUTONNAT J., 2006

*Radicaux libres et stress oxydant
Aspects biologiques et pathologiques*
DELATTRE J., BEAUDEUX J.-L.,
BONNEFONT-ROUSSELOT D., 2005

Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique
SCHMID R. D., 2005

*L'essentiel de la biologie cellulaire : introduction à la biologie
moléculaire de la cellule*
ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J.,
RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., 2^e éd. 2005

Biochimie humaine
HORN F., LINDENMEIER G., GRILLHÖSL C., MOC I., BERGHOLD S.,
SCHNEIDER N., MÜNSTER B., 2005

*Communications et signalisations cellulaires
Hormones, neuromédiateurs, cytokines, facteurs de croissance*
COMBARNOUS Y., 3^e éd. 2004

Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire
WIDMER F., BEFFA R., 3^e éd. 2004

Biochimie et biologie moléculaire
KAMOUN P., LAVOINNE A., De VERNEUIL H., 2003

Biochimie pathologique – Aspects moléculaires et cellulaires
DELATTRE J., DURAND G., JARDILLIER J.-C., 2003

*Nutrigénétique du risque cardiovasculaire
Terrains génétiques et nutrition*
JUNIEN C., 2003

Direction éditoriale : Emmanuel Leclerc

Édition : Chantal Arpino

Couverture : Isabelle Godenèche

Composition : STDI, Lassay-lès-Châteaux

Impression : Sepec, Peronnas

© Lavoisier SAS

ISBN : 978-2-257-20472-1

ISBN : 978-2-7430-1064-5 (1^{re} édition 2008)

Médecine Sciences Publications

Lavoisier

11, rue Lavoisier, 75008 Paris

Pour être informé(s) de nos parutions, consultez le site :
www.medecine.lavoisier.fr

Avant-propos

de la deuxième édition

La biologie médicale évolue en ce moment à tous les niveaux : structure et fonctionnement du laboratoire, automatisation/robotisation des phases préanalytiques et analytiques, assurance/management de la qualité, responsabilité du biologiste au sein de l'équipe médicale... Il en est de même pour notre cœur de métier : l'exploration biologique des états physiopathologiques chez l'Homme, qui s'enrichit d'année en année de la découverte de mécanismes biologiques jusqu'alors méconnus (apoptose, régulation redox intracellulaire, marquage moléculaire endogène...). Simultanément, les outils analytiques nouveaux facilitent l'accès à la recherche ou au dosage de biomolécules auparavant inaccessibles, dont la fonction de biomarqueurs est en cours de validation. C'est ainsi que la spectrométrie de masse sera prochainement présente dans tous les laboratoires de biologie médicale.

Cette deuxième édition, traitant des marqueurs biologiques actuels et de leurs perspectives, est un document à la fois actualisé et enrichi (7 chapitres nouveaux) de la version initiale parue il y a seulement trois ans. L'objectif de cette réédition est effectivement de mettre à jour les données concernant les marqueurs biologiques récents afin de mieux encore les utiliser dans la pratique quotidienne de la biologie médicale, et de compléter l'ouvrage en abordant de nouvelles thématiques (*marqueurs tumoraux, exploration du statut vitaminique...*) et des domaines innovants de la biologie médicale (*protéomique et métabolomique, marqueurs de réponse et de toxicité des traitements pharmacologiques...*). Comme dans la première édition, il s'agit de présenter les données théoriques et expérimentales des marqueurs biochimiques, et leur intérêt dans la stratégie de soin ou de prévention des pathologies. Il s'agit aussi d'aborder les marqueurs biochimiques validés, pertinents et utiles, tout en présentant l'intérêt potentiel de nouvelles molécules qui pourront être proposées aux biologistes et aux cliniciens dans un proche avenir.

Bien sûr, l'esprit du livre est resté le même, tel qu'impulsé initialement et concrétisé au sein de l'**Association des enseignants de biochimie et biologie moléculaire (AE2BM)** des facultés de Pharmacie. Cet ouvrage confirme, s'il en était besoin, le dynamisme des équipes universitaires et hospitalo-universitaires de biochimie des facultés de Pharmacie, qui, avec l'appui de collègues hospitaliers, se sont à nouveau mobilisées pour sa réédition, ont mis leur compétence et leur savoir-faire en commun pour renforcer sa qualité didactique, et ainsi fournir un outil scientifique et médical dédié à l'exercice au quotidien de la biochimie médicale. Que tous les auteurs soient chaleureusement remerciés pour leur contribution !

Jean-Louis BEAUDEUX – Geneviève DURAND

Liste des auteurs

Véronique Annaix

Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
16, boulevard Daviers
49045 Angers cedex
veronique.annaix@univ-angers.fr

Michèle Artur

Laboratoire de pharmacologie-toxicologie
Plateau technologique de biologie
Centre Hospitalier Universitaire
2, rue Angélique Ducoudray
21070 Dijon cedex
michele.artur@chu-dijon.fr

Yves Artur

UMR CNRS 6265 : INRA1324/Université de Bourgogne
Faculté de Pharmacie
7, boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900
21079 Dijon cedex
yves.artur@u-bourgogne.fr

Christian Aussel

EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
Université Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75006 Paris

Unité de nutrition
PUI
GH Henri Mondor
51, avenue du Maréchal de Tassigny
94000 Créteil
christian.aussel@erx.aphp.fr

Malika Balduyck

Université Droit Santé Lille 2
CHRU de Lille
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
3, rue du Professeur Laguesse
BP 83
59006 Lille cedex
malika.balduyck@univ-lille2.fr

Jean-Marie Bard

EA2160 et Centre de recherche en nutrition humaine
Faculté de pharmacie
1, rue Gaston Veil
44035 Nantes cedex

Institut de cancérologie de l'Ouest René Gauducheau
Boulevard Jacques Monod
44805 Saint-Herblain
jean-marie.bard@univ-nantes.fr

Bruno Baudin

Service de biochimie et biologie cellulaire/EA4530
Faculté de Pharmacie
Paris-11 Sud
5, avenue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry cedex

Service de biochimie A
Hôpital Saint-Antoine, APHP
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75571 Paris cedex 12
bruno.baudin@u-psud.fr

Jean-Louis Beaudoux

Unité pédagogique de biochimie/EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques
et biologiques Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Service de biochimie-hématologie
Hôpital universitaire Charles Foix, APHP
7, avenue de la République
94200 Ivry sur seine
jean-louis.beaudoux@parisdescartes.fr

Jean-Louis Beneytout

Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
2, rue du Docteur Marcland
87025 Limoges cedex
jean-louis.beneytout@unilim.fr

Jean-François Benoist

Service de biochimie-hormonologie
Hôpital Robert Debré, APHP
48, boulevard Sérurier
75019 Paris
jean-francois.benoist@rdb.aphp.fr

Mette M. Berger

Service de médecine intensive adulte et brûlés
CHUV – BH08.612
Rue du Bugnon
1011-Lausanne, Suisse
mette.berger@chuv.ch

Maguy Bernard

Unité pédagogique de biochimie
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
Paris Descartes
4, avenue de l'observatoire
75006 Paris

Service de biochimie endocrinienne et oncologique
Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP
47-83, boulevard de l'Hôpital
75013 Paris
maguy.bernard@psl.aphp.fr

Edith Bigot-Corbel

Inserm U892-CRCNA-IRT
Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
1, rue Gaston Veil
44035 Nantes cedex
edith.bigot@univ-nantes.fr

Laboratoire de biochimie endocrinienne et oncologique
Pôle de biologie
CHU Nantes
9, quai Moncoussu
44093 Nantes cedex

Daniel Biou

Service de biochimie cellulaire et moléculaire
UFR de Pharmacie Paris XI
Rue Jean Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry
daniel.biou@u-psud.fr

Christine Bobin-Dubigeon

EA2160 et Centre de recherche en nutrition humaine
Faculté de pharmacie
1, rue Gaston Veil
44035 Nantes cedex

Institut de cancérologie de l'Ouest René Gauducheau
Boulevard Jacques Monod
44805 Saint-Herblain
christine.bobin-dubigeon@univ-nantes.fr

Dominique Bonnefont-Rousselot

Unité pédagogique de biochimie/EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques
et biologiques Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Service de biochimie métabolique
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, APHP
47-83, boulevard de l'Hôpital
75651 Paris cedex 13
dominique.rousselet@psl.aphp.fr

Michèle Bordas-Fonfrede

Service de biochimie métabolique
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, APHP
47-83, boulevard de l'Hôpital
75013 Paris
michele.fonfrede@psl.aphp.fr

Jean-Christophe Boyer

Unité fonctionnelle de toxicologie
Laboratoire de biochimie
CHU Nîmes
Place du Pr Robert Debré
30209 Nîmes cedex 9
jean.christophe.boyer@chu-nimes.fr

Michel Brazier

INSERM ERI 12
Faculté de pharmacie
Université de Picardie Jules-Verne
1, rue des louvels
80037 Amiens cedex 1

Laboratoire de biologie endocrinienne et osseuse
CHU Amiens
2, place Victor Pauchet
80080 Amiens
michel.brazier@u-picardie.fr

Jean-Paul Brouillet

Laboratoire de biochimie
CHU de Nîmes
Place du Pr Robert Debré
30029 Nîmes cedex 9
jean.paul.brouillet@chu-nimes.fr

Département de biochimie métabolique et clinique
UFR des Sciences Pharmaceutiques
15, avenue Charles Flahault – BP 14491
34093 Montpellier cedex 5
jbrouillet@univ-montp1.fr

Institut de génomique fonctionnelle
Département d'oncologie
UMR CNRS 5203, INSERM 4661, UM1, UM2
141, rue de la cardonille
34094 Montpellier cedex 5

Thierry Brousseau

Université Droit Santé Lille 2
Faculté de sciences pharmaceutiques et biologiques
3, rue du Professeur Laguesse
BP 83
59006 Lille cedex

CHRU de Lille
Pôle de biologie Pathologie Génétique
59037 Lille cedex
thierry.brousseau@univ-lille2.fr

Eric Canivet

Association Régionale pour la Promotion de la Dialyse à Domicile (ARPDD)
12, rue Fernand Brunet
51726 Reims cedex
eric.canivet@arpdd.asso.fr

Murielle Cazaubiel

Biofortis Clinical
A Mérieux Nutrisciences Company
Bio Ouest Ile de Nantes
21, rue La Noue Bras de Fer
44200 Nantes
murielle.cazaubiel@biofortis.fr

Philippe Charpiot

Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
27, boulevard Jean Moulin
13385 Marseille cedex 05
philippe.charpiot@univmed.fr

Maryline Chauffert

Laboratoire de biologie
Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph
185, rue Raymond Losserand
75014 Paris
mchauffert@hpsj.fr

Didier Chevenne

Service de biochimie-hormonologie
Hôpital Robert Debré, AHPH
48, boulevard Sérurier
75019 Paris
didier.chevenne@rdb.aphp.fr

Luc Cynober

Unité pédagogique de nutrition/EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
Université Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75006 Paris
Service de biochimie, Cochin – Hôtel-Dieu, AHPH
1, place du Parvis Notre Dame
75181 Paris
luc.cynober@htd.aphp.fr

Monique Dehoux

Laboratoire de biochimie
Hôpital Bichat-Claude Bernard, AHPH
46, rue Henri Huchard
75018 Paris
monique.dehoux@bch.aphp.fr

Philippe Derache

Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
146, rue Léo-Saignat
33076 Bordeaux cedex
philippe.derache@biophar.u-bordeaux2.fr

Geneviève Durand

Service de biochimie cellulaire et moléculaire
UFR de Pharmacie Paris XI
Rue Jean Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry

Laboratoire de biochimie métabolique et cellulaire
Hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP
46, rue Henri Huchard
75018 Paris
genevieve.durand@bch.aphp.fr

Alexandre Evrard

Laboratoire de biochimie
Place du Pr Robert Debré
30209 Nîmes cedex 9

Laboratoire de toxicologie
UFR des sciences pharmaceutiques
15, avenue Charles Flahault
BP 14491
34093 Montpellier cedex 5
alexandre.evrard@univ-montp1.fr

Patrice Faure

Laboratoire de physiopathologie de l'hypoxie/HP2 INSERM U1042
Faculté de Médecine et Pharmacie
38042 Grenoble cedex

Département de biologie, toxicologie et pharmacologie
Unité de biochimie hormonale et nutritionnelle
CHU Grenoble
BP 217
38043 Grenoble cedex 09
PFaure@chu-grenoble.fr

Alain Favier

Les Marechale
38190 Bernin
Favier_1506@hotmail.com

Adeline Filliâtre

Biofortis Clinical
A Mérieux Nutrisciences Company
Bio Ouest Ile de Nantes
21, rue La Noue Bras de Fer
44200 Nantes
adeline.filliatr@biofortis.fr

Marie-Madeleine Galteau

107, rue Charles III
54000 Nancy

Jean-Pierre Garnier

Unité pédagogique de biochimie/EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
Université Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Service de biochimie
Hôpital Saint-louis, APHP
1, avenue Claude Vellefaux
75010 Paris
jean-pierre.garnier@sls.aphp.fr

Roselyne Garnotel

Biochimie médicale et biologie moléculaire, CNRS UMR 6237
Faculté de Médecine
51, rue Cognacq-Jay
51095 Reims cedex

Laboratoire de biologie et de recherche pédiatriques
American Memorial Hospital, CHU Reims
47, rue Cognacq Jay
51092 Reims cedex
rgarnotel@chu-reims.fr

Philippe Gervois

Laboratoire de biochimie – EA Griot – 4481
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
3, rue du Professeur Laguesse
59006 Lille cedex, France
philippe.gervois@univ-lille2.fr

Jean-Pierre Goullé

Laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie cliniques
G.H. Le Havre
BP24
76083 Le Havre cedex
jean-pierre.goullé@ch-havre.fr

Jean-Claude Guillard

Laboratoire de biochimie spécialisée
Plateau technique de biologie
CHU Dijon
2, rue Angélique Ducoudray
21070 Dijon cedex
jean-claude.guillard@chu-dijon.fr

Bernard Herberth

Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire
Hôpital de Brabois
Avenue de Bourgogne
54500 Vandœuvre-lès-Nancy
b.herberth@chu-nancy.fr

Saïd Kamel

Service de biochimie/INSERM ERI 12
Faculté de Pharmacie
Université de Picardie Jules Verne
1, rue des louvels
80037 Amiens cedex 1

Laboratoire de biochimie
CHU Amiens
2, place Victor Pauchet
80080 Amiens
said.kamel@u-picardie.fr

Nathalie Kapel

Unité pédagogique de parasitologie, EA 4065
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Service de coprologie fonctionnelle
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, APHP
47-83, boulevard de l'hôpital
75013 Paris
nathalie.kapel@psl.aphp.fr

Gisèle Le Moë

17, rue Maurice Lachâtre
93120 La Courneuve
gisele.lemoel@orange.fr

Guillaume Lefèvre

Service de biochimie et hormonologie
Hôpital Tenon, APHP
4, rue de la Chine
75020 Paris
guillaume.lefevre@tnn.aphp.fr

Alain Legrand

Unité pédagogique de biochimie
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06
alain.legrand@parisdescartes.fr

Sylvain Lehmann

Biochimie-protéomique clinique
Hôpital Saint-Eloi - IRB
80, avenue A. Fliche
34295 Montpellier cedex 5
s-lehmann@chu-montpellier.fr

Antoinette Lemoine

Service de biochimie et biologie cellulaire
UFR de Pharmacie
Paris-11 Sud
5, avenue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry cedex

Service de biochimie/Inserm U1004
Hôpital Paul Brousse, APHP
14, avenue Paul Vaillant Couturier
94805 Villejuif
antoinette.lemoine@u-psud.fr

Jean-Marc Lessinger

UMR CNRS 7213
Faculté de Pharmacie
Université de Strasbourg
74, route du Rhin
67401 Illkirch cedex

Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire
Plateau technique de biologie
Nouvel hôpital civil
1, place de l'hôpital
67091 Strasbourg cedex
jeanmarc.lessinger@chru-strasbourg.fr

Michel Lhermitte

UDSL
Université Lille Nord de France
3, rue du Professeur Laguesse
59006 Lille cedex
michel.lhermitte@chru-lille.fr

Bertrand Liagre

Laboratoire de biochimie
Faculté de Pharmacie
2, rue du Docteur Marcland
87025 Limoges cedex
bertrand.liagre@unilim.fr

Sophie Mary

Département de biochimie métabolique et clinique
IBBM, UMR 5247 CNRS UM1-UM2
Faculté de Pharmacie
15, avenue Charles Flahault – BP 14491
34093 Montpellier cedex 5
sophie.mary@univ-montp1.fr

Laurent Metzinger

INSERM ERI12
UFR de Pharmacie
1, rue des Louvels
800037 Amiens cedex
laurent.metzinger@u-picardie.fr

Françoise Muller

Université Versailles – Saint Quentin en Yvelines
Laboratoire de biochimie hormonologie
Hôpital Robert Debré, AP-HP
48, boulevard Sérurier
75019-Paris
francoise.muller@rdb.aphp.fr

Jacqueline Peynet

Unité pédagogique de biochimie
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Ivan Philip

Service d'Anesthésie
Institut Mutualiste de Montsouris
42, boulevard Jourdan
75014 Paris
ivan.philip@imm.fr

Anne Polge

Laboratoire de biochimie
CHU de Nîmes
Place du Pr Robert Debré
30029 Nîmes cedex 9
anne.polge@chu-nimes.fr

Dominique Porquet

Service de biochimie hormonologie
UFR de Pharmacie Paris XI
Rue Jean Baptiste Clément
92290 Chatenay-Malabry

Service de biochimie-hormonologie
Hôpital Robert Debré, APHP
48, boulevard Sérurier
75019 Paris
dominique.porquet@rdb.aphp.fr

Eric Raynaud de Mauverger

Département de biochimie métabolique et clinique
Faculté de Pharmacie
15, avenue Charles Flahault, BP 14491
34093 Montpellier cedex 5

Unité d'Exploration Métabolique – CERAMM
INSERM U1046
Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier
Hôpital Lapeyronie
34295 Montpellier cedex 5
eric.raynaud-de-mauverger@chu-montpellier.fr

Michel Sève

Plateforme de protéomique Prométhée
Institut de biologie et de pathologie
CHU Grenoble
BP 217
38043 Grenoble cedex 09
MSeve@chu-grenoble.fr

Jean-Claude Souberbielle

Laboratoire d'exploration fonctionnelle
G.H. Necker-Enfants malades, APHP
149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15
jean-claude.souberbielle@nck.aphp.fr

Patrice Théron

Unité pédagogique de biochimie/EA 4466
Faculté des sciences pharmaceutiques
et biologiques Paris Descartes
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06

Service de Biochimie
Hôpital de Bicêtre
74, rue du général Leclerc
94275 Le Kremlin-Bicêtre
patrice.therond@bct.aphp.fr

Claire Tournois-Hirzel

Service de biochimie
U.F.R de Pharmacie
51, rue Cognacq-Jay
51096 Reims cedex
claire.tournois@univ-reims.fr

François Trivin

9 bis rue Michel-Ange
75017 Paris
trivin.francois@wanadoo.fr

Pascale Vergne-Salle

Service de rhumatologie
CHRU Dupuytren
Avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES cedex
pascale.vergne-salle@chu-limoges.fr

Frédéric Ziegler

Groupe ADEN – Appareil digestif, environnement et nutrition
EA 4311, IFR 23
Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Université de Rouen
22, boulevard Gambetta
76183 Rouen cedex 01
Laboratoire de biochimie médicale
Institut de biologie clinique
CHU de Rouen
1, rue de Germont
76031 Rouen cedex
frederic.ziegler@chu-rouen.fr

Table des matières

Avant-propos de la deuxième édition	V
Liste des auteurs	VII
Liste des abréviations	XXVII
Chapitre 1 Les marqueurs biologiques, définitions et concept	1
Michel Sève, Alain Favier	
1 ■ Qu'est-ce qu'un marqueur biologique ?	3
2 ■ Comment un paramètre biochimique devient un marqueur ?	3
3 ■ Les différentes catégories de marqueurs.....	4
3.1. Les marqueurs de risque	4
3.2. Les marqueurs d'exposition	4
3.3. Les marqueurs des systèmes de défense	4
3.4. Les marqueurs de statut nutritionnel	4
3.5. Les marqueurs de polymorphisme génétique	4
3.6. Les marqueurs prédictifs	5
3.7. Les marqueurs diagnostiques	5
3.8. Les marqueurs de suivi thérapeutique	5
3.9. Les marqueurs de pronostic	5
4 ■ Les critères et l'évaluation d'un marqueur biologique	5
5 ■ Les limitations des marqueurs biologiques.....	6
6 ■ La recherche de nouveaux marqueurs	7
Chapitre 2 Dosage des marqueurs biologiques par immunoanalyse	9
Jean François Benoist, Daniel Biou, Didier Chevenne	
1 ■ Un bref historique des développements de l'immunoanalyse	11
1.1. Période initiale (~ 1860-1935)	11
1.2. Quelques mots sur la réaction Ag/Ac en milieu liquide : courbe de précipitation d'Heidelberger	11
1.3. Immunoprécipitation en milieu gélifié (~ 1860-1935).....	12
1.4. Immunoprécipitation en milieu liquide (~ 1930-2011).....	12
1.5. Immunoanalyses avec marqueur (1959-2011).....	12

2	■ Immunoprécipitation en milieu liquide et détection par néphélométrie (IN) ou turbidimétrie (IT)	12
2.1.	Principe	12
2.2.	Paramètres modulant les critères de performance d'un dosage en IT/IN	13
2.3.	Avantages et inconvénients des techniques par IT/IN	13
2.4.	Marqueurs en biochimie clinique dosés par IN ou IT	14
3	■ Immunoanalyses avec Ag ou Ac marqués	14
3.1.	Immunoanalyses en phase hétérogène	15
3.2.	Immunoanalyses en phase homogène	17
4	■ Génération du signal et systèmes de détection	19
4.1.	Limites de détection des immunoanalyses	19
4.2.	Marqueurs radioactifs	19
4.3.	Marqueurs enzymatiques : « enzyme immunoassay : EIA »	20
4.4.	Marqueurs directement fluorescents	22
4.5.	Marqueurs directement chimiluminescents	24
4.6.	Marquage amplifié par le système streptavidine/avidine-biotine	26
4.7.	Marquage par la protéine A	26
5	■ Interférences dans les immunodosages	27
5.1.	La réaction croisée	27
5.2.	Interférences par des Ac	30
5.3.	Interférence par excès d'Ag : effet crochet « <i>hook effect</i> »	32
5.4.	Autres types d'interférences (liste non exhaustive)	33
5.5.	Problèmes liés à la standardisation	35
6	■ Automatisation de l'immunoanalyse	35
7	■ Principaux biomarqueurs actuellement dosés par immunoanalyse	36
8	■ Évolutions récentes et futures de l'immunoanalyse	36

Chapitre 3 Enzymologie clinique 39

Jean-Marc Lessinger

1	■ Considérations générales sur l'enzymologie clinique	41
1.1.	Les origines et causes de variations des enzymes dans le plasma	41
1.2.	Sélection d'une enzyme comme marqueur	42
1.3.	Approches analytiques pour la détermination d'une enzyme	42
1.4.	Mesure d'une activité enzymatique	42
1.5.	Expression de la concentration d'activité enzymatique	45
1.6.	Mesure d'isoenzymes	46
1.7.	Standardisation en enzymologie clinique	46
1.8.	Facteurs pouvant affecter l'interprétation des résultats	48
1.9.	Macroenzymes	49
2	■ Exemples d'activités enzymatiques fréquemment déterminées en pratique courante	49
2.1.	Aminotransférases	49
2.2.	Créatine kinase	50
2.3.	Lactate déshydrogénase	51
2.4.	Phosphatase alcaline	52
2.5.	γ -Glutamyltransférase	53
2.6.	α -Amylase et lipase	54

Chapitre 4 Biologie et essais cliniques 59

Jean-Marie Bard, Murielle Cazaubiel, Adeline Filliâtre

1	■ Définitions	61
2	■ L'environnement normatif et réglementaire des essais cliniques	61
2.1.	Les Bonnes Pratiques Cliniques	61
2.2.	Les autres normes de qualité	63
2.3.	Les textes réglementaires français	65

3 ■ Le rôle et les engagements du biologiste dans le cadre des essais cliniques	67
3.1. Place du laboratoire dans les essais cliniques	67
3.2. Le choix d'un référentiel de qualité.....	67
3.3. Le choix des marqueurs	68
3.4. Les engagements du biologiste.....	69
3.5. Le suivi des essais	69
3.6. La question des collections d'échantillons biologiques	70

Chapitre 5 Méthodologies innovantes d'analyse des gènes et des génomes 71

Antoinette Lemoine, Laurent Metzinger

1 ■ Le matériel génétique.....	73
1.1. ADN génomique.....	73
1.2. ARNm et ARN régulateurs	73
2 ■ Les méthodes « classiques » d'analyse des gènes	74
2.1. ADN : Southern blot, PCR, séquençage et clonage.....	74
2.2. ARN : RT-PCR	75
3 ■ Les méthodes innovantes d'analyse des gènes	75
3.1. Séquençage à haut débit.....	75
3.2. Automatisation, puces à ADN.....	75
4 ■ Les applications basées sur les technologies des puces à ADN.....	77
4.1. Génomique	77
4.2. Transcriptomique, puces à ADNc.....	77

Chapitre 6 Protéomique et métabolomique 83

Bruno Baudin, Jean-François Benoit

1 ■ Protéomique.....	85
1.1. Introduction.....	85
1.2. Les méthodes d'étude.....	86
1.3. Les applications actuelles et nouvelles technologies	88
2 ■ Métabolomique	91
2.1. Introduction.....	91
2.2. Les méthodes d'étude.....	92
2.3. Deux approches complémentaires sont utilisées dans l'étude du métabolome	94

Chapitre 7 Les marqueurs biochimiques de l'inflammation 99

Jean-Louis Beneytout, Pascale Vergne-Salle, Bertrand Liagre

1 ■ Physiopathologie de la réaction inflammatoire	101
2 ■ Les marqueurs biochimiques de la réaction inflammatoire	101
2.1. Critères d'un bon marqueur biochimique de l'inflammation	102
2.2. La vitesse de sédimentation	102
2.3. Les protéines de l'inflammation	103
2.4. Électrophorèse des protéines	107
3 ■ Examens complémentaires, recommandations et perspectives	108
3.1. Dépistage d'un syndrome inflammatoire	108
3.2. Diagnostic d'une pathologie associée.....	108
3.3. Suivi thérapeutique de maladies inflammatoires ou infectieuses	109
3.4. Variations divergentes de certaines protéines de l'inflammation	109
3.5. Actualités et perspectives.....	109

4 ■ Principales étiologies à l'origine du syndrome inflammatoire	111
4.1. Pathologies infectieuses	111
4.2. Les maladies systémiques	111
4.3. Les pathologies néoplasiques	111
4.4. Les autres causes	111

Chapitre 8 Marqueurs d'oxydation des biomolécules et systèmes de défense antioxydants — 113

Dominique Bonnefont-Rousselot, Jean-Louis Beaudeau, Patrice Thérond

1 ■ Rappels physiologiques et physiopathologiques	115
2 ■ Marqueurs biochimiques de l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques	115
2.1. Schéma général	115
2.2. Marqueurs de l'oxydation des lipides	115
2.3. Marqueurs de l'oxydation des protéines	123
2.4. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques	126
3 ■ Systèmes de défense antioxydants	127
3.1. Systèmes enzymatiques	127
3.2. Systèmes non enzymatiques	128
4 ■ Stratégie d'utilisation des biomarqueurs	132
5 ■ Biomarqueurs en prospective	133

Chapitre 9 Mise en évidence et exploration des dyslipoprotéïnémies — 139

Dominique Bonnefont-Rousselot, Alain Legrand

1 ■ Rappels sur la composition, le métabolisme et le rôle des lipoprotéines	141
1.1. Structure des lipoprotéines	141
1.2. Métabolisme des lipoprotéines	142
2 ■ Exploration usuelle des dyslipoprotéïnémies	144
2.1. Aspect du sérum	144
2.2. Dosage du cholestérol total et des triglycérides	146
2.3. Dosage du cholestérol-HDL et du cholestérol-LDL	147
2.4. Dosage des apolipoprotéines A-I et B	149
2.5. Analyses complémentaires du bilan d'exploration usuelle	151
3 ■ Exploration spécialisée des dyslipoprotéïnémies	152
3.1. Analyse des lipoprotéines	152
3.2. Caractérisation et analyse des causes des dyslipoprotéïnémies	154

Chapitre 10 Maladies cardiovasculaires : marqueurs de l'athérosclérose, de la maladie coronarienne et de l'accident vasculaire cérébral — 165

Philippe Gervois, Malika Balduyck, Thierry Brousseau

1 ■ Physiopathologie de l'athérosclérose	167
1.1. Structure de la paroi artérielle saine	167
1.2. Dysfonction endothéliale : initiation de la lésion d'athérosclérose	167
1.3. Mécanisme de l'athérogenèse : composantes lipidiques et cellulaires	168
1.4. Phase aiguë de l'inflammation et paroi artérielle	168
1.5. Phase aiguë de thrombose	169
2 ■ Marqueurs du risque cardiovasculaire et modalités de prise en charge	171
2.1. Notion de risque cardiovasculaire global	171
2.2. Facteurs de risque cardiovasculaire modifiables et recommandations	171
3 ■ Marqueurs innovants du risque coronarien	174
3.1. Protéine C-réactive	174
3.2. Myéloperoxydase	175

3.3.	Molécules d'adhérence	175
3.4.	Interleukine-6	176
3.5.	Métalloprotéases	176
3.6.	Endothélines	177
3.7.	Adiponectine	177
3.8.	Phospholipase A2	177
4	■ Rationnel pour l'évaluation des marqueurs non lipidiques	178
5	■ Marqueurs de l'accident vasculaire cérébral	178
5.1.	Marqueurs diagnostiques de l'accident vasculaire cérébral	178
5.2.	Marqueurs innovants du risque d'AVC d'origine ischémique	179
5.3.	Marqueurs innovants du risque d'AVC d'origine hémorragique.....	180

Chapitre 11 Marqueurs de dysfonctionnement cardiaque 183

Jacqueline Peynet, Monique Dehoux, Guillaume Lefèvre, Ivan Philip

1	■ L'insuffisance cardiaque	185
1.1.	Définition et classification de l'insuffisance cardiaque	185
1.2.	Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque	185
1.3.	Biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque	186
1.4.	Les peptides natriurétiques : le Brain Natriuretic Peptide	186
2	■ Syndromes coronariens aigus.....	194
2.1.	Définitions et rappels physiopathologiques.....	194
2.2.	Marqueurs d'ischémie et de nécrose	195
3	■ Stratégie « multimarqueurs » des syndromes coronariens aigus	203
3.1.	Marqueurs de nécrose.....	204
3.2.	Marqueurs d'ischémie	204
3.3.	Marqueurs hémodynamiques.....	204
3.4.	Marqueurs d'inflammation	205
3.5.	Marqueur de stress : la copeptine	206

Chapitre 12 Le diabète sucré 211

Didier Chevenne, Michèle Bordas-Fondrède, Maryline Chauffert, François Trivin, Dominique Porquet

1	■ Les diabètes sucrés et leur physiopathologie.....	213
1.1.	Le diabète sucré	213
1.2.	Glucose et nutriments intracellulaires.....	214
1.3.	L'homéostasie du glucose.....	214
1.4.	Le diabète sucré et l'insuline	214
1.5.	Mécanismes et conditions de la sécrétion pancréatique de l'insuline	214
1.6.	Le diabète sucré de type 1 (DT1).....	215
1.7.	Le diabète sucré de type 2 (DT2).....	216
1.8.	Les diabètes monogéniques.....	216
1.9.	Les complications chroniques du diabète sucré.....	216
1.10.	Diabète sucré gestationnel	217
2	■ Marqueurs de diagnostic de diabète	218
2.1.	Glucose.....	218
2.2.	Insuline.....	220
2.3.	Le C-peptide.....	222
2.4.	Les proinsulines	224
2.5.	Corps cétoniques	225
3	■ Marqueurs de l'autoimmunité des diabètes : les auto-anticorps.....	225
3.1.	Anti-îlots de Langerhans (<i>Islet Cell Autoantibodies</i> : ICA)	226
3.2.	Anticorps anti-GAD.....	226
3.3.	Anticorps anti-IA-2.....	227

3.4. Anticorps anti-insuline	227
3.5. Anticorps anti-ZnT8	229
3.6. Les auto-anticorps dans le cadre d'un dépistage du risque de développer un DT1	229
4 ■ Marqueurs génétiques	230
4.1. Association du DT1 avec les gènes du CMH	230
4.2. Association du diabète de type I aux gènes non HLA.....	231
4.3. Les diabètes monogéniques.....	231
4.4. DT2	231
5 ■ Marqueurs de suivi des diabètes	231
5.1. HbA _{1c}	231
5.2. Fructosamines	236
5.3. Microalbuminurie	237

Chapitre 13 Le syndrome métabolique 243

Éric Raynaud de Mauverger, Patrice Faure

1 ■ Physiopathologie du syndrome métabolique.....	245
1.1. Rôle clé de l'insulinorésistance	245
1.2. Troubles de la glycorégulation.....	246
2 ■ Données épidémiologiques et de prévalence	247
3 ■ Marqueurs biochimiques et cliniques	248
3.1. Les différents marqueurs selon les définitions	248
3.2. Techniques de référence à appliquer pour les critères diagnostiques	248
3.3. Indications : les apports de la biologie et de la clinique	248
4 ■ Perspectives thérapeutiques.....	249
4.1. Diététique et activité physique.....	249
4.2. Possibilités médicamenteuses	249

Chapitre 14 Marqueurs de la dénutrition protéino-énergétique 251

Frédéric Ziegler, Mette Berger, Christian Aussel, Luc Cynober

1 ■ Protéines sériques.....	254
1.1. Albumine	254
1.2. Transthyréline (TTR).....	255
1.3. Protéine vectrice du rétinol (RBP).....	255
1.4. Les protéines de la réaction inflammatoire.....	256
1.5. Méthodes usuelles de dosage des protéines	256
2 ■ Acides aminés plasmatiques et urinaires.....	257
2.1. Place en nutrition clinique.....	257
2.2. Méthodes de dosage des acides aminés dans les liquides biologiques.....	258
3 ■ Le bilan d'azote	258
3.1. Place en nutrition clinique.....	258
3.2. Calcul du bilan azoté	259
3.3. Interprétation des résultats	259
3.4. Méthodes usuelles de dosage de l'azote	259
4 ■ Formules composites comportant des marqueurs biochimiques	260
4.1. Index Pronostic Nutritionnel et Inflammatoire (PINI).....	260
4.2. Index de Buzby (ou Nutritional Risk Index : NRI).....	260
4.3. Geriatric Nutritional Risk Index : GNRI	261
5 ■ Micronutriments chez le patient en situation d'agression (réanimation).....	261
5.1. Généralités sur les micronutriments	261
5.2. Le patient de réanimation	261
5.3. Supplémentation et substitution.....	262
5.4. Évaluation biologique en pratique courante	262

Chapitre 15 Les vitamines : exploration du statut et interprétation 271

Jean-Claude Guillard, Bernard Herbeth, Gisèle Le Moël et les membres du groupe de travail de la Société Francophone Vitamines et Biofacteurs : Émilie Blond, Patrick Borel, Marie-Josèphe Cals, Charlotte Cuerq, Agnès Dauvergne, Jocelyne Draï, Fathi Driss, Henri Faure, Isabelle Gastin, Edmond Rock

1	■ Rappels sur le métabolisme et les rôles des vitamines	273
	1.1. Structure chimique et propriétés physicochimiques	273
	1.2. Métabolisme	274
	1.3. Rôles physiologiques	276
	1.4. Carence	278
2	■ Exploration du statut vitaminique.....	279
	2.1. Vitamine A.....	279
	2.2. Caroténoïdes	281
	2.3. Vitamine D.....	281
	2.4. Vitamine E	284
	2.5. Vitamine K.....	284
	2.6. Thiamine	285
	2.7. Riboflavine	286
	2.8. Vitamine PP	286
	2.9. Vitamine B ₆	287
	2.10. Vitamine B ₉	287
	2.11. Vitamine B ₁₂	288
	2.12. Vitamine C.....	289
	2.13. Assurance qualité	289

Chapitre 16 Les marqueurs en pathologie hépatique 291

Philippe Derache, Véronique Annaix, Philippe Charpiot

1	■ Organisation anatomique et fonctionnelle du foie	293
	1.1. Le foie, carrefour anatomique.....	293
	1.2. Le lobule hépatique, organisation et types cellulaires.....	293
2	■ Les grandes fonctions hépatiques	294
	2.1. Métabolisme énergétique	296
	2.2. Fonctions de synthèse.....	296
	2.3. Fonctions d'épuration	296
	2.4. Fonction biliaire.....	297
3	■ Exploration biologique du foie	297
	3.1. Les syndromes biologiques des hépatopathies	297
	3.2. Les marqueurs de cytolysé hépatocytaire.....	299
	3.3. Les marqueurs d'insuffisance hépatocellulaire	301
	3.4. Les marqueurs de cholestase.....	302
	3.5. Les marqueurs de l'inflammation	304
	3.6. Les marqueurs de la fibrose hépatique	304
4	■ L'exploration biochimique du foie : interprétation étiologique.....	306
	4.1. Conduite à tenir devant une hypertransaminasémie	306
	4.2. Conduite à tenir devant un bilan enzymatique hépatique anormal	306
	4.3. Conduite à tenir devant un ictère	306
	4.4. Diagnostic biologique de la stéatose.....	306
	4.5. Diagnostic biologique d'une cirrhose	306
	4.6. Dépistage des carcinomes hépatocellulaires	309
5	■ Foie et grossesse	309
6	■ Foie et variabilité individuelle aux xénobiotiques.....	309
7	■ Les traitements des pathologies hépatiques et leur suivi	310
8	■ La greffe de foie	310

Chapitre 17 Métabolisme du fer : marqueurs de surcharge et de carence 313

Véronique Annaix, Édith Bigot-Corbel

1	■ Métabolisme du fer	315
	1.1. Répartition du fer dans l'organisme.....	315
	1.2. Cycle du fer.....	315
	1.3. Besoins en fer de l'organisme	316
	1.4. Absorption intestinale du fer.....	316
	1.5. Transport plasmatique du fer et captation cellulaire	318
	1.6. Métabolisme intracellulaire du fer.....	319
2	■ Maintien de l'homéostasie du fer	320
	2.1. La protéine HFE	320
	2.2. L'hepcidine	320
3	■ Exploration du métabolisme du fer	321
	3.1. Dosage du fer sérique.....	321
	3.2. Dosage de la transferrinémie, calcul de la CTF et du CS.....	322
	3.3. Dosage de la ferritinémie	323
	3.4. Autres dosages	323
	3.5. Exploration dynamique	324
4	■ Interprétation du métabolisme pathologique du fer.....	324
	4.1. Les surcharges en fer : hémochromatoses héréditaires et autres hypersidérémies	324
	4.2. Les carences martiales	326
	4.3. Cas des anémies inflammatoires.....	327
	4.4. Les anomalies rares, de transport, d'utilisation du fer ou de régulation	327

Chapitre 18 Apport des biomarqueurs fécaux au diagnostic en gastroentérologie (hors cancérologie) 329

Nathalie Kapel

1	■ Biomarqueurs de la fonction pancréatique exocrine	331
	1.1. Activité chymotrypsique fécale.....	331
	1.2. Élastase 1 pancréatique	332
2	■ L'α1 antitrypsine, un biomarqueur des entéropathies exsudatives	333
	2.1. α1 antitrypsine	333
3	■ Biomarqueurs de la réponse inflammatoire intestinale.....	334
	3.1. TNF-α	335
	3.2. La lactoferrine	335
	3.3. La calprotectine	335
	3.4. Perspectives	339

Chapitre 19 Marqueurs de l'insuffisance rénale et prise en charge des patients en insuffisance rénale chronique, dialysés et transplantés 343

Claire Tournois-Hirzel, Éric Canivet

1	■ Marqueurs de l'insuffisance rénale chronique	345
	1.1. Créatinine plasmatique	345
	1.2. Mesure ou estimation du débit de filtration glomérulaire	349
	1.3. Protéines urinaires et anomalies du sédiment urinaire	353
	1.4. Cystatine C	355
2	■ Définition et classification de la maladie rénale chronique	356
3	■ Prise en charge de l'insuffisance rénale chronique non terminale.....	357
	3.1. Épidémiologie	357
	3.2. Prise en charge thérapeutique, notion de néphroprotection.....	357

4 ■	Prise en charge de l'insuffisance rénale chronique terminale.....	360
4.1.	Épidémiologie	360
4.2.	Contexte économique	362
4.3.	La dialyse.....	362
4.4.	La transplantation rénale	368
5 ■	Marqueurs de l'insuffisance rénale aiguë.....	370

Chapitre 20 Le métabolisme phosphocalcique : mécanismes de régulation, exploration biochimique et principaux déséquilibres pathologiques ————— 375

Saïd Kamel, Michel Brazier, Jean-Claude Souberbielle

1 ■	Le métabolisme du calcium et sa régulation	377
1.1.	Distribution du calcium dans l'organisme	377
1.2.	Échanges calciques dans l'organisme	377
1.3.	Régulation hormonale de la calcémie.....	380
2 ■	Le métabolisme du phosphore et sa régulation.....	383
2.1.	Distribution du phosphore dans l'organisme.....	383
2.2.	Échanges de phosphore dans l'organisme	384
2.3.	Régulation de la phosphatémie : rôle central du FGF 23	384
2.4.	Régulation de la phosphatémie : rôle de la PTH	386
3 ■	Principaux paramètres biochimiques nécessaires à l'exploration du métabolisme phosphocalcique en pratique clinique.....	386
3.1.	Quels paramètres mesurer ?	386
3.2.	Aspects analytiques et postanalytiques des dosages les plus courants	387
4 ■	Principaux désordres pathologiques du métabolisme phosphocalcique	390
4.1.	Pathologies parathyroïdiennes	390
4.2.	Pathologies de la vitamine D	391
4.3.	Hyperparathyroïdie secondaire due à l'insuffisance rénale chronique.....	393
4.4.	Troubles de la réabsorption rénale du phosphate : les diabètes phosphatés	395
4.5.	Pathologies tumorales	396
5 ■	Principes généraux d'interprétation du bilan phosphocalcique.....	396

Chapitre 21 Marqueurs biochimiques du remodelage osseux : intérêt dans l'évaluation des pathologies osseuses ————— 399

Saïd Kamel

1 ■	Physiologie et biologie normale du tissu osseux	401
1.1.	Remodelage osseux et régulation du métabolisme phosphocalcique.....	401
1.2.	Les différentes séquences du remodelage osseux	402
1.3.	Composition du tissu osseux	402
1.4.	Contrôle du remodelage osseux.....	406
2 ■	Principales pathologies osseuses	407
2.1.	Remodelage osseux, masse osseuse et ostéoporose	407
2.2.	Physiopathologie des ostéoporoses	409
3 ■	Marqueurs biochimiques de la résorption osseuse	410
3.1.	Les produits de dégradation du collagène	410
3.2.	Les marqueurs reflétant le nombre d'ostéoclastes actifs et l'activité des ostéoclastes	412
4 ■	Principaux marqueurs biochimiques de la formation osseuse	413
4.1.	La phosphatase alcaline totale et son isoenzyme osseuse.....	413
4.2.	L'ostéocalcine sérique.....	414
4.3.	Les peptides d'extension du collagène de type I	415
5 ■	Principales sources de variabilité des marqueurs du remodelage osseux et valeurs de référence	415
5.1.	Facteurs de variabilité contrôlables	415
5.2.	Facteurs de variabilité non contrôlables	416
5.3.	Établissement des valeurs de référence	417

6 ■	Utilité clinique des marqueurs du remodelage osseux dans l'ostéoporose	417
6.1.	Diagnostic de l'ostéoporose	417
6.2.	Estimation du risque fracturaire et aide à la décision thérapeutique	417
6.3.	Suivi des traitements anti-ostéoporotiques	419
6.4.	Utilité clinique des marqueurs du remodelage osseux dans d'autres affections du squelette	420

Chapitre 22 Biomarqueurs tumoraux circulants et tissulaires 423

Jean-Paul Brouillet, Jean-Christophe Boyer, Christine Bobin-Dubigeon, Jean-Marie Bard

1 ■	Marqueurs tumoraux circulants	425
1.1.	Marqueurs oncofœtaux	425
1.2.	Cytokératines	427
1.3.	Enzymes	428
1.4.	Hormones	429
1.5.	Autres marqueurs tumoraux	430
1.6.	Marqueurs non tumoraux associés au suivi des tumeurs	430
2 ■	Recommandations d'utilisation des marqueurs tumoraux circulants	431
2.1.	Marqueurs utiles au dépistage et/ou au diagnostic	431
2.2.	Marqueurs utiles au suivi et à la surveillance	432
2.3.	Recommandations pour la réalisation du dosage des marqueurs tumoraux circulants	433
2.4.	Conclusion sur les marqueurs circulants	433
3 ■	Marqueurs tumoraux tissulaires	434
3.1.	Techniques utilisées	434
3.2.	Tumeurs mammaires	434
3.3.	Tumeurs digestives	435
3.4.	Tumeurs bronchopulmonaires	438
3.5.	Neuroblastome	438

Chapitre 23 Marqueurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire 443

Sophie Mary, Patrice Faure

1 ■	Physiopathologie de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH)	445
1.1.	Rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil HH	445
1.2.	Marqueurs de l'hypothalamus et de l'hypophyse : aspects fonctionnels et moléculaires	446
1.3.	Contrôle de l'axe de régulation : le système intégratif	448
1.4.	Pathologies de l'appareil hypothalamo-hypophysaire	448
2 ■	Exploration (hypothalamo-antéhypophysaire) de l'axe gonadotrope	449
2.1.	Dosages statiques des gonadotrophines plasmatiques	449
2.2.	Épreuves dynamiques	449
3 ■	Exploration hypothalamo-antéhypophysaire de l'axe thyroïdienne	450
3.1.	Dosages statiques des hormones thyroïdiennes	450
3.2.	Épreuves dynamiques	450
4 ■	Exploration de l'axe corticotrope	450
5 ■	Exploration de l'axe lactotrope	450
5.1.	Dosage(s) statique(s)	450
5.2.	Test de stimulation de l'axe lactotrope	450
5.3.	Test de freinage	450
6 ■	Exploration de l'axe somatotrope	450
6.1.	Dosages statiques	450
6.2.	Épreuves de stimulation : exploration des déficits en GH	451
6.3.	Épreuves de freinage	453
7 ■	Explorations fonctionnelles des pathologies de l'axe hypothalamo-posthypophysaire	455
7.1.	Un dosage statique relevant : la vasopressine (AVP) (ou ADH)	455
7.2.	Exploration biochimique des diabètes insipides	455
7.3.	Exploration biochimique des SIADH	457

Chapitre 24 Exploration biologique de la thyroïde 459

Véronique Annaix, Philippe Charpiot

1	■ Rappels anatomiques et physiologiques	461
2	■ Les hormones iodées thyroïdiennes	461
	2.1. Apport alimentaire	461
	2.2. Biosynthèse au niveau de la thyroïde	462
	2.3. Régulation de la biosynthèse.....	463
	2.4. Transport sanguin des hormones thyroïdiennes	463
	2.5. Transformation de T4 en T3.....	464
	2.6. Mode d'action des hormones thyroïdiennes	464
	2.7. Catabolisme périphérique.....	464
3	■ Évaluation de la fonction thyroïdienne et place de la biologie.....	464
	3.1. Dosages hormonaux.....	464
	3.2. Dosage des auto-anticorps	465
	3.3. Test au TRH	465
	3.4. Surveillance biologique des traitements.....	465
	3.5. Bilan complémentaire dans le diagnostic et le suivi des cancers thyroïdiens.....	466
4	■ Imagerie médicale.....	466
5	■ Les pathologies thyroïdiennes	466
	5.1. Démarche diagnostique devant une anomalie morphologique	467
	5.2. Démarche diagnostique devant des anomalies fonctionnelles	468
6	■ Pièges dans l'interprétation des résultats.....	470
	6.1. Les variations physiologiques.....	470
	6.2. Les perturbations d'origine extrathyroïdienne	470
	6.3. Les interférences médicamenteuses sur l'interprétation des résultats	470

Chapitre 25 Marqueurs de la corticosurrénale 473

Sophie Mary, Jean-Paul Brouillet

1	■ La corticosurrénale : une glande endocrine indispensable à la vie	475
	1.1. Rappels anatomiques et physiologiques.....	475
	1.2. Biosynthèse des hormones corticosurrénaliennes.....	475
	1.3. Pathologies associées aux fonctions corticosurrénaliennes	476
2	■ Marqueurs des fonctions corticosurrénaliennes	477
	2.1. L'ACTH, marqueur hypophysaire	477
	2.2. Les glucocorticoïdes : le cortisol	477
	2.3. Les minéralocorticoïdes : l'aldostérone.....	478
	2.4. Les androgènes surrénaliens.....	479
	2.5. Marqueurs du métabolisme intermédiaire des stéroïdes surrénaliens	481
3	■ Utilisation des marqueurs dans l'exploration des désordres surrénaliens	481
	3.1. Marqueurs des hyperfonctionnements surrénaliens	481
	3.2. Marqueurs des hypofonctionnements : insuffisances surrénaliennes	486
	3.3. Synthèse	487

Chapitre 26 Marqueurs médulosurrénaliens 489

Jean-Pierre Garnier

1	■ Rappels physiologiques sur la médulosurrénale.....	491
	1.1. Anatomie-physiologie	491
	1.2. Embryologie.....	491
	1.3. Histologie.....	491
2	■ Présentation des catécholamines	491
	2.1. Les catécholamines	491
	2.2. Les métanéphrines	491

2.3.	Catabolites acides	491
2.4.	Biosynthèse	491
2.5.	Catabolisme	491
2.6.	Origine tissulaire, stockage.....	492
3	■ Les techniques usuelles de dosage	492
3.1.	Prélèvement	492
3.2.	Chromatographie liquide haute pression (CLHP) des catécholamines sanguines et urinaires	493
3.3.	CLHP des métanéphrines urinaires	493
3.4.	VMA – HVA	493
4	■ Interprétation : variations physiologiques et pathologiques	494
4.1.	Catécholamines plasmatiques.....	494
4.2.	Catécholamines urinaires libres	494
4.3.	Catécholamines urinaires totales.....	494
4.4.	Conversion anciennes unités – nouvelles unités	494
4.5.	Métanéphrines urinaires	495
4.6.	VMA – HVA	495
4.7.	Variations pathologiques	496
5	■ Indications biocliniques : Tumeurs Neuro-Endocrines : phéochromocytome, neuroblastome	496
5.1.	Phéochromocytomes.....	496
5.2.	Neuroblastomes.....	496
5.3.	Psychiatrie	497

Chapitre 27 Fertilité, reproduction, grossesse 501

Jean-Paul Brouillet, Anne Polge

1	■ La fertilité : une histoire de couple	503
1.1.	Rappels de la physiologie ovarienne	503
1.2.	Rappels de la physiologie testiculaire	504
1.3.	L'infertilité, parfois une histoire d'hormones	504
2	■ Fécondation naturelle et Assistance Médicale à la Procréation (AMP).....	504
2.1.	Rappels sur les mécanismes de la fécondation naturelle	504
2.2.	Principe des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP)	505
3	■ Marqueurs de fertilité/infertilité et du suivi d'AMP	505
3.1.	Marqueurs de l'axe hypophysio-gonadique	505
3.2.	Autres marqueurs utiles au diagnostic étiologique.....	510
3.3.	Marqueurs de fertilité/infertilité chez la femme.....	510
3.4.	Marqueurs de fertilité/infertilité chez l'homme	511
3.5.	Marqueurs de la réserve ovarienne	512
3.6.	Marqueurs du monitoring de l'ovulation	512
4	■ Grossesse	512
4.1.	L'hCG, marqueur biologique de la grossesse	512
4.2.	Dépistage et suivi des avortements spontanés et des grossesses ectopiques	514
4.3.	Dépistage et diagnostic des maladies trophoblastiques gestationnelles.....	515

Chapitre 28 Dépistage de la trisomie 21 fœtale par les marqueurs sériques maternels 517

Maguy Bernard, Françoise Muller

1	■ Principe du dépistage biologique	519
1.1.	Bases mathématiques du calcul du risque de trisomie 21	519
1.2.	Facteurs influençant la distribution des marqueurs sériques maternels	521
1.3.	Facteurs influençant le calcul de risque	522
1.4.	Aspects physiopathologiques des marqueurs sériques maternels.....	522

2 ■	Organisation du dépistage en France.....	522
2.1.	Dispositions réglementaires.....	522
2.2.	Les stratégies de dépistage.....	523
2.3.	Marqueurs sériques et dépistage d'autres anomalies.....	524
3 ■	Les performances du dépistage	524

Chapitre 29 Dépistage néonatal de maladies génétiques 527

Roselyne Garnotel, Patrice Théron

1 ■	Le prélèvement : le test de Guthrie.....	529
2 ■	La mucoviscidose	530
2.1.	Physiopathologie	530
2.2.	Manifestations cliniques	531
2.3.	Dépistage néonatal.....	531
2.4.	Recherche de mutations.....	532
3 ■	L'hypothyroïdie congénitale permanente.....	534
3.1.	Physiopathologie	535
3.2.	Dépistage biochimique et évaluation diagnostique.....	535
3.3.	Traitement.....	535
4 ■	L'hyperplasie congénitale des surrénales.....	535
4.1.	Physiopathologie	535
4.2.	Diagnostic néonatal	536
4.3.	Traitement.....	536
5 ■	La drépanocytose	537
5.1.	Physiopathologie	537
5.2.	Incidence	537
5.3.	Diagnostic néonatal	537
5.4.	Traitement.....	538
6 ■	La phénylcétonurie.....	538
6.1.	Physiopathologie	538
6.2.	Prévalence	538
6.3.	Tests biologiques.....	539
6.4.	Traitement.....	539
7 ■	L'innovation technologique au service de maladies génétiques : la spectrométrie de masse pour le dépistage du déficit de l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD).....	540
7.1.	Aspects analytiques.....	540
7.2.	Le déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne	540
8 ■	Acquis et perspectives.....	541

Chapitre 30 Évaluation biochimique des lésions neurodégénératives et des lésions cérébrales aiguës 545

Sylvain Lehmann, Jean-Louis Beaudoux

1 ■	Biomarqueurs de lésions neurodégénératives.....	547
1.1.	Le peptide amyloïde A β	547
1.2.	La protéine Tau	548
1.3.	La protéine 14-3-3	550
1.4.	Perspectives	551
2 ■	Biomarqueurs de lésions cérébrales aiguës	552
2.1.	La protéine S100B	553
2.2.	La Neuron Specific Enolase (NSE).....	556
2.3.	La protéine gliale fibrillaire acide (GFAP : Glial Acidic Fibrillary Protein)	557
2.4.	Perspectives	557

Chapitre 31	Biomarqueurs phénotypiques et génotypiques de la réponse thérapeutique et toxique aux médicaments	561
	Christine Bobin-Dubigeon, Jean-Pierre Goullé, Michel Lhermitte, Jean-Marie Bard, Alexandre Evrard	
1	■ Biomarqueurs prédictifs de réponse ou de toxicité	563
	1.1. Applications en oncopharmacologie	563
	1.2. Applications aux médicaments antithrombotiques	566
	1.3. Application aux médicaments antirétroviraux	567
2	■ Toxicologie et biologie clinique	567
Chapitre 32	Marqueurs en addictologie et toxicomanies : actualité et prospective	575
	Michèle Artur, Marie-Madeleine Galteau, Yves Artur	
1	■ Marqueurs de la consommation d'alcool	577
	1.1. Données épidémiologiques et aspects physiopathologiques	577
	1.2. Métabolisme de l'alcool	578
	1.3. Les marqueurs biochimiques d'utilisation courante	579
	1.4. Les tests anciens ou non adaptés au dépistage dans une population générale	582
	1.5. Les marqueurs émergents	583
	1.6. Les marqueurs génétiques de l'alcoolisme	584
	1.7. Les paramètres biologiques perturbés par la consommation d'alcool	584
2	■ Marqueurs du tabagisme	586
	2.1. Données épidémiologiques/santé publique	586
	2.2. Dépendance au tabagisme et facteurs génétiques	586
	2.3. Composition de la fumée de tabac	586
	2.4. Marqueurs du tabagisme	587
	2.5. Sensibilité et spécificité	591
	2.6. Les marqueurs génétiques du tabagisme (marqueurs de dépendance)	591
3	■ Marqueurs de la consommation de drogues illicites (stupéfiants) ou d'un usage détourné des médicaments	592
	3.1. La pharmacodépendance : systèmes réglementaires d'évaluation et de lutte contre l'abus de substances psychoactives	592
	3.2. Épidémiologie de la pharmacodépendance	593
	3.3. Stupéfiants (drogues illicites)	593
	3.4. Médicaments détournés de leur usage	598
Index		601

Liste des abréviations

17 OHP	17 hydroxyprogestérone	AGE	Produits de glycation avancée
2-DE	Électrophorèse bidimensionnelle	AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
3HB	3β-hydroxybutyrate	ALB	Albumine
3-MH	3-méthylhistidine	ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
5-HTOL	5-hydroxytryptophol	ALE	Produits de lipoxydation avancée
5'-NT	5'-nucléotidase	ALT	Alanine aminotransférase (anciennement TGP ou ALAT)
αFP	Alpha-fœtoprotéine	AMM	Acide méthylmalonique
αGST	Alpha-glutathion S-transférase	AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
γGT	Gamma glutamyl transférase	AMPPD	Adamentyl 1,2-dioxetane arylphosphate
AAs	Acides aminés	AN	Acide nicotinique
AAT	Alpha1 antitrypsine	ANAES	Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé devenue HAS
ABM	Agence de la biomédecine		
ABTS	2,2'-azino-bis(éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)	ANCA	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
Ac anti-HBc totaux	Anticorps (IgG et IgM) dirigés contre la nucléocapside HBc du virus de l'hépatite B	APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
Ac anti-HBs	Anticorps dirigés contre l'antigène de surface HBs du virus de l'hépatite B	ARA2	Antagonistes de l'angiotensine II ou Sartans
Ac	Anticorps	ARC	Attaché de recherche clinique
AcAc	Acéto-acétate	ARH	Agence régionale d'hospitalisation
ACAT	Acylcoenzyme A cholestérol acyl-transférase	ARN	Acide ribonucléique
ACR	<i>Albumin Creatinine ratio</i>	ARNm	ARN messager
ACTH	Corticotropine (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)	ARPPD	Association régionale pour la promotion de la dialyse à domicile (établissement de santé privé à but non lucratif de Champagne Ardenne)
ADA	<i>American Diabetes Association</i>	ASAT	Aspartate aminotransférase
ADAG	<i>A1C-derived average glucose</i>	ASE	Agents stimulants de l'érythropoïèse
ADN	Acide désoxyribonucléique	AST	Aspartate aminotransférase (anciennement TGO ou ASAT)
ADNc	ADN complémentaire	ASTm	Aspartate aminotransférase mitochondriale
AdoCbl	5'-désoxyadénosylcobalamine	ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate	ATS	Antithyroïdiens de synthèse
AE	Activité enzymatique	AURA	Association pour l'utilisation du rein artificiel (établissement de santé privé à but non lucratif d'Île-de-France)
AER	<i>Albumin Excretion ratio</i>		
AFFPHE	Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant	AVC	Accident vasculaire cérébral
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé	AVED	Ataxie avec déficience isolée en vitamine E
Ag HBs	Antigène de surface HBs du virus de l'hépatite B		

AVK	Antivitamine K	CPG-SM	Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse
AVP	Arginine vasopressine ou ADH (<i>antidiuretic hormone</i>)	CPP	Comité de protection des personnes
BCR	Bureau communautaire de référence	CPY2E1	Cytochrome P-450 2E1 (protéine)
BH4	Tétrahydrobioptérine	CR	Cross-réactant ou molécule interférente dans une réaction croisée
BHT	Butylhydroxytoluène	CRCM	Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose
BK virus	Polyomavirus à ADN	CRF	<i>Corticotropin releasing factor</i>
BPC	Bonnes pratiques cliniques	CRH	Hormone de libération de l'ACTH (corticolibérine)
BPF	Bonnes pratiques de fabrication	CRISTAL	Registre national des patients greffés rénaux et de patients en attente de greffe, en relation avec l'agence biomédecine
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire	CRP	<i>C-reactive protein</i> (protéine C-réactive)
BSP	Bromosulfonephtaléine	CS	Coefficient de saturation
C3	Fraction C3 du complément	CS-Tf	Coefficient de saturation de la transferrine
C4	Fraction C4 du complément	CT	Cholestérol total
CAP	<i>College of American Pathologists</i>	CTF	Capacité totale de fixation du fer par la transferrine
CBG	<i>Cortisol Binding Globulin</i>	CV	Coefficient de variation
Cbl	Cobalamines	Cx	Carnitine substituée avec un acide gras dont le nombre de carbones est x
CCK-PZ	Cholécystokinine-pancréozymine	CYP2A6	Cytochrome P-450 2A6 (gène)
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>	CYP2A6	Cytochrome P-450 2A6 (protéine)
CDAI	<i>Crohn's disease activity index</i>	DA	Dopamine
CDT	Transferrine désialylée (« <i>carbohydrate-deficient transferrin</i> »)	DAP	<i>DMT1 Associated Protein</i>
CEBH	Collection d'échantillons biologiques humains	DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>	DC	Acide dicarboxylique
CEDIA	Cloned enzyme donor immunoassay	DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
CEIP	Centre d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance	DCP	Décarboxyprothrombine
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol	DEAE	Diéthylaminoéthyl
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	DFG	Débit de filtration glomérulaire
CgA	Chromogranine A	DG	Diabète gestationnel
CGH-array	<i>Comparative genomic hybridization array</i>	DHEA	Déhydroépiandrostérone
CH50	Fraction hémolytique 50 % du complément	DIC	Diabète insipide central
CHC	Carcinome hépatocellulaire	DIN	Diabète insipide néphrogénique
CK	Créatine kinase	DIT	Di-iodotyrosyl
CLAT	Clairance de l'alpha1 antitrypsine	DMOS	Diverses mesures d'ordre social
CLBP	Chromatographie liquide basse pression	DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
CLF	Capacité latente de fixation	DNN	Dépistage néonatal
CLHP	Chromatographie liquide haute pression (haute performance)	DNPH	Dinitrophénylhydrazine
CLHP-SM	Chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse	DOC	Désoxycorticostérone
CLHP-SM-SM	Chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse en tandem	DoE	Degré d'extrême
CLIA	<i>Chimiluminescent-immunoassay</i>	DP	Dialyse péritonéale
CLU	Cortisol libre urinaire	DPA	Dialyse péritonéale automatisée
CM	Chylomicron	DPCA	Dialyse péritonéale continue ambulatoire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	DPD	Dihydropyrimidine déshydrogénase
CMIA	<i>Chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay</i>	DPPP	Diphénylpyrénylphosphine
CMV	Cytomegalovirus	DT1	Diabète de Type 1
CN	Clarté nucale	DT2	Diabète de Type 2
CNAMTS	Caisse national d'assurance maladie des travailleurs salariés	DTP	Thiamine diphosphate
CNIL	Commission nationale informatique et libertés	DXM	Dexaméthasone
CNSP	Commission nationale des stupéfiants et des psychotropes (appartient à l' Afssaps)	EALT	Activité alanine aminotransférase érythrocytaire
COFRAC	Comité français d'accréditation	EAST	Activité aspartate aminotransférase érythrocytaire
CPG	Chromatographie en phase gazeuse	EBPG	<i>European Best Practice Guidelines</i>
		EBV	Epstein Barr Virus
		ECBU	Examen cytot bactériologique des urines
		ECG	Electrocardiogramme

EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique	GnRH	LH-RH, hormone de libération des gonadotrophines (gonadolibérine ou lulibérine)
EE	Entéropathie exsudative	GNRI	<i>Geriatric Nutritional Risk Index</i>
EER	Épuration extra rénale	GO	Glucose oxydase
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	GPX	Glutathion peroxydase
EGR	Activité glutathion réductase érythrocytaire	GSH	Glutathion réduit
EIA	<i>Enzyme-immunoassay</i>	GSSG	Glutathion oxydé
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	HAMA	<i>Human anti-mouse antibody</i>
ELU	Substance E (cortisone) libre urinaire	HAMP	<i>Hepcidine Antimicrobial Peptide</i>
EMA	Agence européenne du médicament (<i>European Medicine Agency</i>)	HAP	Hyperaldostérionisme primaire
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for drugs and drugs addiction</i>	HAS	Haute autorité de santé
EMIT	<i>Enzyme-multiplied immunoassay technique</i>	HbA1c	Hémoglobine A1 glyquée
EPO	Erythropoïétine	HbCO	Carboxyhémoglobine
ERBP	<i>European Renal Best Practice</i>	HBD-2	β -défensine 2
ERN	Espèces réactives de l'azote	HbS	Hémoglobine S
ERO	Espèces réactives de l'oxygène	HC	Haptocorrine
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	HC	Hypothyroïdie congénitale
EtG	Glucuronide d'éthyle	hCG	Hormone gonadotrophine chorionique
ETK	Activité transcétolase érythrocytaire	hCG β	Sous-unité β libre de l'hCG
EtS	Sulfate d'éthyle	HCP1	<i>Heme Carrier Protein 1</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide	HCS	Hyperplasie congénitale des surrénales
FAEEs	Esters éthyliques d'acides gras	Hcy	Homocystéine
FAV	Fistule artérioveineuse	HD	Hémodialyse
FDA	<i>Food and Drug administration</i>	HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> – Lipoprotéines de haute densité
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
FI	Facteur intrinsèque	h-GH	Hormone de croissance (humaine) ou STH (somatotropine)
FIA	<i>Fluoro-immunoassay</i>	HGPiV	Hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine	HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
FLU	Substance F (cortisol) libre urinaire	HH	Hypothalamo-hypophysaire
FMN	Flavine mononucléotide	HHS	Hypothalamo-hypophysio-surrénalien
FMOC	<i>9-fluorénylmethyloxycarbonyl</i>	HIC	Hémorragie intracrânienne
FSH	Hormone folliculostimulante	HL	Hydroperoxyde lipidique
FT-ICR	<i>Fourier transform – ionic cyclotron resonance</i>	HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
FTIR	<i>Fourier transform Infrared spectroscopy</i>	HMG-CoA réductase	Hydroxyméthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
G6PDH	Glucose 6-phosphate déshydrogénase	HNE	Hydroxynonéal
GABA	Acide gamma aminobutyrique	HNF	<i>Hepatic nuclear factor</i>
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i>	HODE	Acide hydroxyoctadécadiénoïque
Gas	<i>Growth arrest-specific protein</i>	HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
GBEA	Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale	HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
GCK	Glucokinase	HPODE	Acide hydroperoxyoctadécadiénoïque
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	HSP	<i>Heat shock protein</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
GGT	Gamma-glutamyltransférase	HTA	Hypertension artérielle
GHB	Gamma hydroxybutyrate	IA-2	<i>Insulinoma associated protein</i>
GHPB	Protéine de liaison à la GH : <i>Growth Hormone Binding Protein</i>)	IAA	<i>Insulin auto-antibody</i>
GHD	Déficit en GH	IADPSG	<i>International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups</i>
GHR	Récepteur de la GH	IATA	<i>International Air Transport Association</i>
GH-RH	Hormone de libération de la GH (somatolibérine ; somatocrine)	IC	Immuncomplexe
GLDH	Glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3)	IC95 %	Intervalle de confiance 95 %
GLP1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>	ICA	<i>Islet cell antibodies</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>	ICG	Vert d'indocyanine
		ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
		IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire

ID-MS	<i>Isotope dilution-mass spectrometry</i>	Lp(a)	Lipoprotéine (a)
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	LPH	β -lipotropin
IEF	Isoélectrofocalisation	LPL	Lipoprotéine lipase
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>	Lp-PLA2	Phospholipase A2 associée aux lipoprotéines
IGF	Facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1 : somatomédine C)	LSD	Diéthylamide de l'acide lysergique
IHC	Insuffisance hépatocellulaire	LT	Leucotriène
IL	Interleukine	MA	Maladie d'Alzheimer
IL-1	Interleukine-1	MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
IL-1Ra	Récepteur antagoniste à l'IL-1	MAO-A et MAO-B	Mono amino oxydases A et B
IMAO	Inhibiteur de la monoamine oxydase	MBDB	Méthylbenzodioxazolybutanamine
IMC	Indice de masse corporelle	MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
INR	<i>International Normalised Ratio</i>	MC	Maladie de Crohn
IPE	Insuffisance pancréatique exocrine	MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
IPF	<i>Insulin promoter factor</i>	MDA	<i>Malondialdéhyde</i>
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i>	MDA	Méthylènedioxyamphétamine
IRA	Insuffisance rénale aiguë	MDEA	Méthylènedioxyéthamphétamine
IRC	Insuffisance rénale chronique	MDMA	Méthylènedioxyméthamphétamine
IRCT	Insuffisance rénale chronique terminale	MDRD	<i>Modification of the Diet in Renal Disease</i>
IRE	<i>Iron Responsive Element</i>	MEC	Matrice extracellulaire
IRE-BP	<i>IRE – Binding Protein</i>	MeCbl	Méthylcobalamine
IRM	Imagerie structurale par résonance magnétique	MEGX	Monoéthylglycinoxylidide
IRMA	Dosage radioimmunométrique	MEOS	Système microsomal d'oxydation de l'alcool (« <i>Microsomal Ethanol Oxidizing System</i> »)
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>	Met	Méthionine
IRP	<i>Iron Regulatory Protein</i>	MGP	<i>Matrix Gla-protein</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>	miARN	MicroARN
IS	Immunsérum	MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
IS	<i>International standard</i>	MILDT	Mission interministérielle de lutte contre la drogue et la toxicomanie
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>	MIT	Mono-iodotyrosyl
ITT	Test d'hypoglycémie provoquée par l'insuline (<i>Insulin Tolerance Test</i>)	MMP	Métalloprotéase matricielle
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>	MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	MoM	Multiple de la médiane
IV	<i>Intraveineuse</i>	MRC	Maladie rénale chronique
JDF	<i>Juvenile Diabetes Foundation</i>	MS	<i>Mass spectrometry</i>
K/DOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiatives</i>	MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
kDa	Kilodalton	MUP	4-méthylombelliferyl phosphate
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>	NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
KGDH	α -cétoglutarate déshydrogénase	NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes in adults</i>	NAFLD	<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
LAP	Leucine aminopeptidase	NAM	Nicotinamide
LBA	Liquide broncho-alvéolaire	NASH	<i>Non alcoholic steatohepatitis</i>
LBM	Laboratoire de biologie médicale	NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>	NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardisation Program</i>
LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
LC/MS-MS	Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem	NKDEP	<i>National Kidney Disease Education Program</i>
LCAT	Lécithine cholestérol acyl transférase	NKF	<i>National Kidney Foundation</i>
LCC	Longueur crânio-caudale	NMN	N ¹ -méthylnicotinamide
LDH	Lactate déshydrogénase	NO	Monoxyde d'azote
LDL	Lipoprotéines de basse densité – <i>Low Density Lipoprotein</i>	nPNA	Index de catabolisme protéique corrigé par le poids
LH	Hormone lutéinisante	NRI	<i>Nutritional Risk Index</i>
LOCI	<i>Luminescent oxygen channeling immunoassay</i>	NSE	Enolase non spécifique
		NTP	<i>Neural Thread Protein</i>
		OCT	Ornithine carbamyltransférase
		OEDT	Observatoire européen des drogues et toxicomanies

OFDT	Observatoire français des drogues et des toxicomanies	RAR	Ratio aldostéronémie/activité rénine
OMS	Organisation mondiale de la santé	RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
OPA	Orthophtaldialdéhyde	RB	Riboflavine
OPD	Ortho-phénylènediamine	RBP	Retinol Binding Protein (protéine vectrice du rétinol) – <i>Retinol binding protein</i>
Oroso	Orosomucoïde	RCH	Rectocolite hémorragique
OT	Ocytocine	RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
PAC	Phosphatase acide	RDPLF	Registre de dialyse péritonéale de langue française
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide	REIN	Réseau épidémiologique et information en néphrologie
PAGE-SDS	Électrophorèse en gel de polyacrylamide – dodécylsulfate de sodium	RG	Récepteur des glucocorticoïdes
PAL	Phosphatase alcaline	rHu-EPO	Erythropoïétine recombinante humaine
PAPP-A	Protéine plasmatique A associée à la grossesse (<i>pregnancy-associated plasma protein A</i>)	RI	Réaction inflammatoire
PBH	Ponction biopsie hépatique	RIA	Dosage radioimmunologique
PC	Phosphatidylcholine	RIA	Radio-immunoanalyse
PCOOH	Hydroperoxyde de la phosphatidylcholine	RM	Récepteur des minéralocorticoïdes
Pcr	Créatinine plasmatique ou créatininémie	RMN	Résonance magnétique nucléaire
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	RPA	Activité rénine plasmatique
PCT	Procalcitonine	Rs-Tf	Récepteur soluble de la transferrine
PCU	Phénylcétonurie	RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
PDH	Pyruvate déshydrogénase	SA	Semaine d'aménorrhée
PEG	Polyéthylène glycol	SAA	Serum amyloïde A
PENIA	<i>Particle enhanced nephelometric immunoassay</i>	SAL	Sérum antilymphocytaire
PET test	<i>Peritoneal equilibration test</i>	SAU	Service d'accueil des urgences
PETH	Phosphatidyléthanol	SC	Surface corporelle
PETIA	<i>Particle enhanced turbidimetric immunoassay</i>	SDS	Dodécylsulfate de sodium
PGF2	Prostaglandine F2	SELDI®	<i>Surface-enhanced laser desorption/ionization</i>
PIF	Prolactostatine (<i>prolactin inhibitory factor</i>)	SFAR	Société française d'anesthésie-réanimation
PIIINP	Peptide amino-terminal du procollagène de type III	SFBC	Société française de biologie clinique
PINI	<i>Pronostic Inflammatory and Nutritional Index</i>	SFTA	Société française de toxicologie analytique
PITC	Phénylisothoncyanate	SHBG	<i>Sex hormone binding globulin</i>
PIVKA	<i>Protein induced vitamin K absence or antagonist</i>	SIADH	Syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique
PKC	Protein kinase C	SII	Syndrome de l'intestin irritable
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate	SIJ	Index de sialylation de l'apolipoprotéine J plasmatique
PLTP	Protéine de transfert des phospholipides	SI-RH	Somatostatine ou SRIF (<i>somatotropin release inhibiting factor</i>)
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
pmh	Patients par million d'habitants	SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
PNPP	Paranitrophénylphosphate	SPP	Syndrome polyuropolydipsique
POD	Peroxydase	SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
POMC	Pro-opiomélanocortine	SRDA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
PP	Phosphate de pyridoxal	SRH	Système réticulo-histiocytaire
PP	Polydipsie primaire	SRM	<i>Standard Reference Material</i>
ppm	Partie par million	SVCT	<i>Sodium vitamin C transporter</i>
PR	Polyarthrite rhumatoïde	T	Thiamine
PRGP	<i>Proline-rich Gla protein</i>	T3 et T4	Hormones thyroïdiennes (T3 : triiodothyronine et T4 : thyroxine)
PRI	Protéines de la réaction inflammatoire	T3	Tri-iodothyronine
PRL	Prolactine	T3L ou FT3	T3 libre
PSA	Antigène prostatique spécifique	T3r	T3 reverse
PSPH	Hôpitaux privés sans brut lucratif participant au service public hospitalier	T4	Tétraiodothyronine ou thyroxine
PTH	Parathormone	T4L ou FT4	T4 libre
PTHi	Parathormone intacte 1-84	TBA	Acide thiobarbiturique
PTP	<i>Pancreatic Thread Protein</i>		
QUICKI	<i>Quantitative Insulin-sensitivity Check Index</i>		
RA	Récepteur des androgènes		

TBAb	<i>Thyroid Blocking Antibody</i>	TPI	Triose phosphate isomérase
TBARS	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique – <i>Thiobarbituric acid-reactive substances</i>	TPMT	Thiopurine méthyltransférerase
TBG	<i>Thyroxin-Binding Globulin</i>	TPO	Thyroperoxydase
TBPA	<i>Thyroxin-Binding PreAlbumine</i>	TPP	Thiamine pyrophosphate
TC	Transcobalamine	TRACE	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>
TC	Traumatisme crânien	TRF	Transferrine
TCA	Temps de céphaline activée	TRH	<i>Thyrotropin-Releasing Hormone</i> ou thyrolibérine
TCMH	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine	TSAb	<i>Thyroid Stimulation Antibody</i>
TDP	Thiamine diphosphate	TSH	Thyréostimuline (<i>thyroid-stimulating hormone</i>)
Tf	Transferrine	TTP	Thiamine triphosphate
TfR	Récepteur de la transferrine	TTR	Transthyréine
Tg	Thyroglobuline	ucMGP	<i>Uncarboxylated matrix Gla protein</i>
TG	Triglycérides	ucOS	<i>Uncarboxylated osteocalcine</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>	UCP	<i>Uncoupling protein</i>
TGLH	Triglycéride lipase hépatique	Ucr	Créatinine urinaire
THA	Tétrahydro-aldostérone	uE3	Oestriol non conjugué
THC	Tétrahydrocannabinol	UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
THF	Tétrahydrofolate	UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
ThTR	<i>Thiamine transporter</i>	UOsm	Osmolalité (ou osmolarité) urinaire
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases	VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
TIR	Trypsine immunoréactive	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TK	Transcétolase	VGM	Volume globulaire moyen
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine	VHDL	Lipoprotéines de très haute densité
TMG	<i>Transmembrane Gla protein</i>	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
TMO-MRC	Troubles du métabolisme minéral et osseux asso- ciés aux maladies rénales chroniques	VIP	Peptide vasoactif intestinal
TMP	Thiamine monophosphate	VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	VNTR	<i>Variable-number tandem repeat</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor type α</i>	VPN	Valeur prédictive négative
TOF	<i>Time of flight</i>	VPP	Valeur prédictive positive
TP	Taux de prothrombine	VS	Vitesse de sédimentation
		ZnT	Transporteur de zinc

Les marqueurs biologiques, définitions et concept

Michel Sève, Alain Favier

1 ■ QU'EST-CE QU'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE ?

2 ■ COMMENT UN PARAMÈTRE BIOCHIMIQUE DEVIENT UN MARQUEUR ?

3 ■ LES DIFFÉRENTES CATÉGORIES DE MARQUEURS

- 3.1. Les marqueurs de risque
- 3.2. Les marqueurs d'exposition
- 3.3. Les marqueurs des systèmes de défense
- 3.4. Les marqueurs de statut nutritionnel
- 3.5. Les marqueurs de polymorphisme génétique
- 3.6. Les marqueurs prédictifs
- 3.7. Les marqueurs diagnostiques
- 3.8. Les marqueurs de suivi thérapeutique
- 3.9. Les marqueurs de pronostic

4 ■ LES CRITÈRES ET L'ÉVALUATION D'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE

5 ■ LES LIMITATIONS DES MARQUEURS BIOLOGIQUES

6 ■ LA RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS

Références bibliographiques

La médecine moderne, afin d'améliorer le diagnostic des maladies ou leur traitement et dans un souci d'efficacité comme de sécurité, fait de plus en plus appel à l'analyse de paramètres biologiques du malade. Ces paramètres constituent des indicateurs biologiques de l'état du sujet, appelés marqueurs biologiques. La discipline consistant à étudier les marqueurs biochimiques est la Biochimie clinique dite Chimie clinique pour les Anglo-Saxons. Cette discipline dynamique est complémentaire de la biochimie pathologique qui étudie les aspects cellulaires et moléculaires des maladies (Delattre *et al.*, 2003). La biochimie clinique connaît depuis des années un développement considérable, portée par les progrès des connaissances fondamentales des mécanismes des maladies et des méthodes de chimie analytique. L'utilisation de ces marqueurs sort du cadre de l'homme malade pour s'intéresser à l'homme sain, soit pour définir son état physiologique ou sa prédisposition aux maladies, soit pour des études d'impact de l'environnement.

1 ■ QU'EST-CE QU'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE ?

Un marqueur d'une maladie devrait être un composé présent dans les fluides biologiques des malades mais absent de ceux des sujets sains. Toutefois cette définition s'avère un leurre utopiste. Entre une cellule normale et une cellule malade il ne peut exister que des différences quantitatives, mais qui parfois sont suffisamment énormes pour ne permettre la détection de ce composé, par des méthodes classiques, que chez les seuls sujets malades. Un marqueur sera donc un composé biochimique dont les teneurs chez un ensemble homogène de malades, sont statistiquement très éloignées de celles d'un ensemble de sujets sains, donnant un caractère discriminant à sa mesure. Toutefois il faut garder à l'esprit qu'il ne s'agit que d'une différence statistique et que la présence de faux positifs et de faux négatifs ne peut pas la plupart du temps être évitée (figure 1).

La nature de ces marqueurs est extrêmement variable et reflète toutes les catégories de molécules biologiques existantes, toutefois les protéines étant les plus nombreuses de ces molécules, la majorité des marqueurs biologiques se recruteront en leur sein.

2 ■ COMMENT UN PARAMÈTRE BIOCHIMIQUE DEVIENT UN MARQUEUR ?

Il existe de nombreux mécanismes qui peuvent faire varier une constante biologique lors d'une maladie et permettre son utilisation comme marqueur. Pour les métabolites en dehors des excès de synthèse ou de catabolisme, il peut s'agir d'une anomalie d'un transporteur membranaire empêchant son entrée dans les tissus et donc son accumulation dans le plasma. C'est le cas du glucose augmentant lors du diabète par manque d'insuline activant les transporteurs. Un cas général est celui des barrages métaboli-

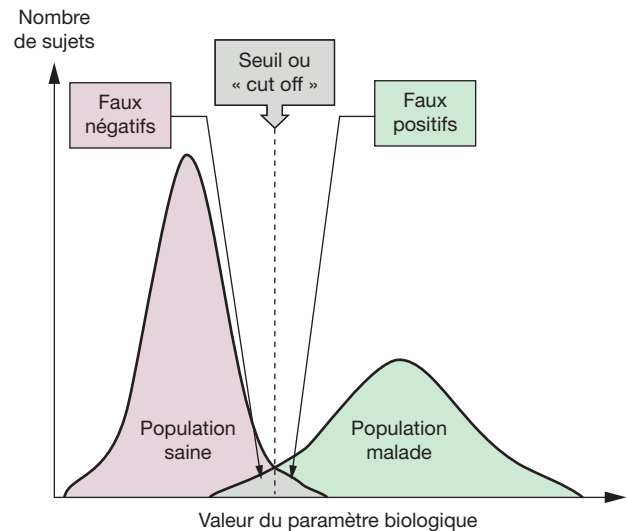


Figure 1 ■ Un marqueur biologique permet de différencier statistiquement une population saine d'une population malade avec toutefois fréquemment la présence de faux positifs et de faux négatifs.

ques dus à des baisses importantes d'activités enzymatiques acquises ou héréditaires qui entraînent une accumulation tissulaire et périphérique du métabolite non utilisé. Il passe alors par des voies mineures du métabolisme qui, devenant prépondérantes, produisent des quantités inhabituelles de métabolites rares.

Les teneurs en protéines peuvent varier aussi pour de multiples raisons (figure 2) : anomalies de synthèse par dérégulation de l'expression de leur gène, anomalies de maturation, modifications sous l'action d'un excès de métabolites réactifs comme lors de la glycation, accélération de leur destruction par le protéasome. Généralement ces anomalies sont intracellulaires et ne seront aisément détectées dans le sang que pour les protéines de sécrétion. Un mécanisme général aboutissant à une augmentation plasmatique du taux de certaines protéines est la cytolysse, mécanisme au cours duquel la membrane cellulaire laisse sortir les protéines et parfois éclate. Le dosage d'une protéine, souvent une enzyme, particulièrement abondante dans un tissu particulier, permettra alors un diagnostic spécifique du tissu atteint. Une attaque par des protéases activées lors d'un processus pathologique pourra aussi libérer dans la circulation des protéines ancrées dans les membranes.

Par contre, il faut se méfier des changements d'hydratation importants entraînant une augmentation générale des concentrations apparentes de tous les constituants du plasma sanguin en cas de déshydratation ou une dilution en cas d'hyperhydratation.

Les variations des constituants du sang se retrouveront souvent dans l'urine qui constitue aussi un liquide analysé à la recherche de marqueurs de maladies. Le passage dans l'urine n'est pas passif, mais régulé par le néphron qui constitue une barrière pour les protéines et réabsorbe une grande partie des métabolites. L'analyse de ces paramètres permettra ainsi d'avoir une idée de l'intégrité du rein.

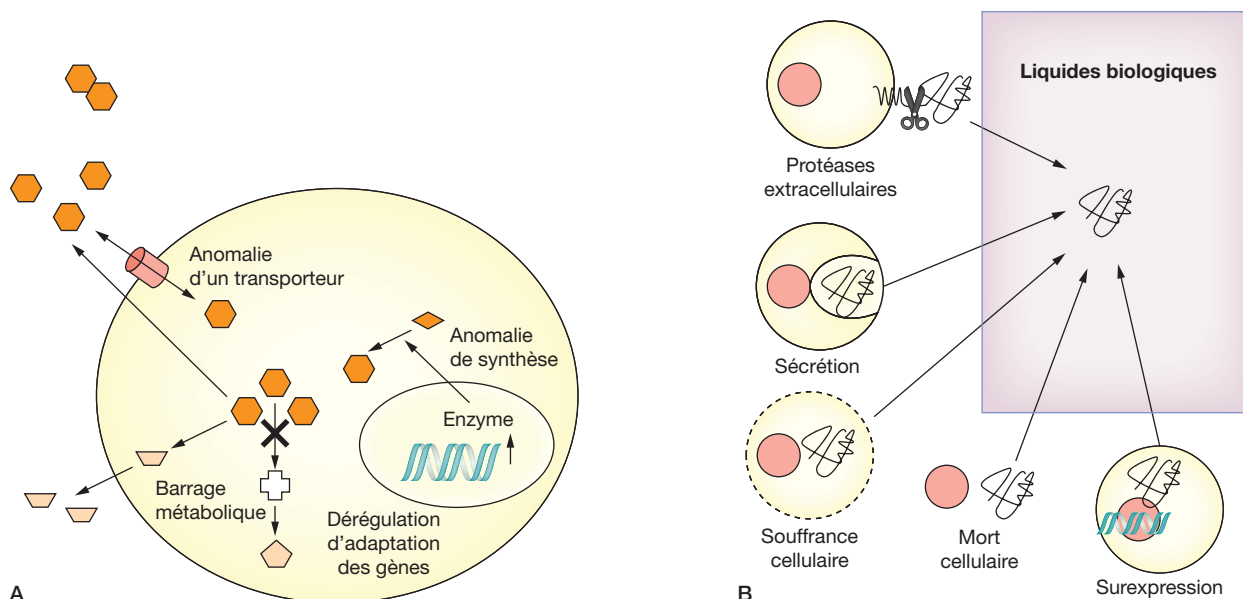


Figure 2 ■ Quelques-uns des mécanismes pouvant expliquer la variation d'un marqueur de type métabolite (A) ou protéine (B).

3 ■ LES DIFFÉRENTES CATÉGORIES DE MARQUEURS

3.1. Les marqueurs de risque

Les variations de ces marqueurs biologiques ne sont pas les conséquences des perturbations dues à une maladie, mais font souvent partie des mécanismes initiaux créant la maladie. Ils sont très importants lors d'étude sur les causes des maladies, pour démontrer le lien réel avec le mécanisme biologique mis en évidence par des questionnaires ou enquêtes statistiques. C'est pourquoi ces marqueurs sont de plus en plus utilisés lors des études épidémiologiques, car ils pourront être prélevés dès le début des études plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des symptômes.

3.2. Les marqueurs d'exposition

La biologie peut permettre de mesurer l'exposition d'un individu à un agent toxique apporté par le comportement (tabac, alcool), l'environnement ou le travail. Le plus souvent, on mesurera directement la teneur du composé dans les fluides biologiques (benzène dans le sang), mais il est aussi possible de mesurer des métabolites (cotidine pour l'imprégnation tabagique) ou des enzymes spécifiquement induits par ce toxique (gamma glutamyl transférase pour l'imprégnation alcoolique).

3.3. Les marqueurs des systèmes de défense

Les capacités d'un sujet à se défendre contre les agents infectieux, mais aussi à éliminer un agent toxique ou à en réparer les

dégâts, lui permettront de présenter un plus ou moins grand risque de développer des maladies au cours de sa vie. Dans l'analyse des facteurs de risque on pourra donc utiliser la mesure de l'immunité non spécifique ou spécifique (souvent en réponse à une vaccination), comme les capacités de détoxification (cytochromes, glutathion transférases...), ou les capacités de réparation (capacités de réparation de l'ADN par exemple).

3.4. Les marqueurs de statut nutritionnel

Le statut est censé être la teneur globale du corps en un composé, souvent un nutriment, dont la mesure reflétera le statut carencé, normal ou excédentaire. Ces mesures qui permettent de calculer un risque biologique de carence sont souvent comparées aux apports alimentaires qui permettent de calculer un risque diététique. On distinguera les marqueurs directs de statut consistant à doser le nutriment dans le sang, des marqueurs indirects consistant à doser des métabolites ou activités enzymatiques dépendant étroitement du taux de ce nutriment. On pourra aussi étudier des conséquences plus globales du comportement alimentaire comme la mesure des taux de glucose ou de cholestérol qui font partie des marqueurs des risques nutritionnels, comme la mesure de protéines à vie courte (Protéine C-réactive ou CRP, préalbumine) comme reflet d'un apport protéique insuffisant.

3.5. Les marqueurs de polymorphisme génétique

Les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique permettent de définir des variantes d'un gène retrouvées plus fréquemment dans certaines maladies. L'analyse de ces polymorphismes

génétiques à risque, risque plus ou moins fort selon la pénétrance du gène, se développe très vite en médecine. Ces polymorphismes sont souvent des mutations ponctuelles sur une position d'un nucléotide du gène et il faudra distinguer les deux sortes d'homozygotes, des hétérozygotes. Mais il peut aussi s'agir de délétion ou de répétition. Toutefois ces analyses génétiques sont actuellement réservées à des familles à risque de maladies héréditaires et réalisées sur la demande d'un généticien. La recherche de la fréquence de ces polymorphismes dans les maladies est par contre une voie de recherche actuelle très forte particulièrement pour l'industrie pharmaceutique à la recherche de nouvelles cibles de médicaments.

3.6. Les marqueurs prédictifs

La mesure de ces paramètres est censée indiquer le risque de maladie, qui souvent se traduira par un taux relatif d'augmentation de ce risque par rapport à l'ensemble de la population (Odd ratio, RR). Souvent on utilisera un score calculé par la mesure d'un ensemble de paramètres, faisant souvent partie des facteurs de risque. Par contre ces marqueurs ne possèdent un caractère prédictif fiable que lorsqu'ils sont utilisés sur un grand nombre de sujets et ne doivent donc être appliqués à prédire le risque pour un seul individu qu'avec beaucoup de prudence, malgré la pression de la médecine dite prédictive vers une telle utilisation. En effet beaucoup de ces maladies ne relèvent hélas pas d'un traitement possible et de plus un type génétique n'est qu'un facteur insuffisant à lui seul pour déclencher le processus pathogène qui dépendra aussi d'autres gènes, du mode de vie, de la nutrition et des infections (De Bouvet *et al.*, 2006).

3.7. Les marqueurs diagnostiques

Ce sont les plus souvent mesurées des constantes biologiques, ceci dans le but d'aider le clinicien à établir son diagnostic, de la même manière que les images obtenues par diverses sources de rayonnements et que les examens électrophysiologiques. Il faudra garder à l'esprit que de nombreux phénomènes perturbant les constantes biochimiques, telle l'inflammation, se retrouvent dans des maladies diverses ; on aura alors un marqueur de syndrome et non pas de maladie. Les marqueurs de diagnostiques se répartiront aussi en marqueurs rapides, perturbés très tôt dès le début des signes cliniques mais souvent de façon fugace, et en marqueurs lents dont l'anormalité persistera plusieurs semaines après le début de la maladie. L'analyse simultanée de plusieurs de ces marqueurs permettra de préciser l'évolution de la maladie (voir exemple figure 3).

3.8. Les marqueurs de suivi thérapeutique

Il est parfois utile de suivre l'efficacité d'un traitement par des mesures de constantes biologiques pour en moduler la dose et la durée. Ce suivi peut être obtenu soit en mesurant des paramètres biochimiques liés au mécanisme d'action du médicament ou à l'intensité de la maladie, soit en dosant le médicament ou ses métabolites dans les milieux biologiques.

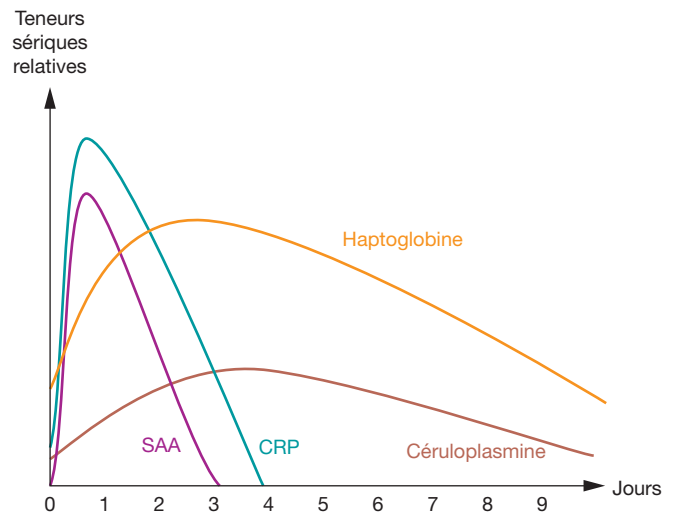


Figure 3 ■ Évolution relative des marqueurs après une inflammation aiguë (SAA : Sérum Amyloïde A ; CRP : C-Reactive protein).

3.9. Les marqueurs de pronostic

Ces paramètres biologiques permettent d'établir un score de gravité et de prédire la rapidité d'évolution et les chances de guérison ou de survie du malade. Ils seront très utiles au clinicien pour choisir l'acte thérapeutique en pesant le rapport bénéfice/risque.

4 ■ LES CRITÈRES ET L'ÉVALUATION D'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE

Un marqueur de qualité doit non seulement varier au cours des maladies, mais le faire de manière rapide, spécifique et sensible. Mais ces qualités biologiques ne seront exploitables en clinique que si les méthodes de mesure de ce marqueur s'avèrent elles-mêmes dotées de qualités analytiques suffisantes. Les qualités analytiques ont fait l'objet de protocoles recommandés par des sociétés savantes comme la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), telle la méthode d'évaluation Valtec (Vassault *et al.*, 1986). Les points clés d'une méthode seront sa sensibilité, sa précision, sa reproductibilité intra ou inter laboratoires, sa fiabilité. La *précision* ou *fidélité* mesure la dispersion des résultats des mesures d'un paramètre dans des conditions déterminées. La précision est exprimée par le coefficient de variation CV qui est égal à l'écart type en pourcentage de la valeur moyenne. Il serait souhaitable de mesurer ces critères pour des teneurs basses et des teneurs hautes en marqueur. Selon les conditions, on distinguera la *répétabilité* ou *reproductibilité intrasérielle*, dans laquelle l'analyse est reproduite au moins 30 fois consécutive au sein d'une même série (même expérimentateur, même réglage d'appareil, mêmes réactifs), la *reproductibilité intersérielle*, ou de jour en jour, dans laquelle le même échantillon est analysé chaque jour dans

une série de dosages différents et enfin la *reproductibilité interlaboratoire* dans laquelle un même échantillon est analysé dans plusieurs laboratoires par la même méthode. La *justesse* de la méthode ou *exactitude* mesure la différence entre la valeur trouvée et la valeur « réelle » théorique. La moyenne des mesures d'un échantillon certifié est comparée à la valeur indiquée par l'organisme public ou privé ayant fourni l'échantillon de référence ou comparée à la moyenne des valeurs du même échantillon mesuré par une méthode dite de référence et exprimée par le coefficient de récupération. En effet, à défaut d'échantillon ou de méthode de référence, il est possible de rajouter à un échantillon biologique une quantité connue du marqueur et d'en mesurer la récupération. La *limite de détection* (ou quantité minimale détectable non quantifiable) égale par convention à trois fois la valeur du bruit de fond et la limite de quantification, proche de la *limite de linéarité*, seront déterminées afin de préciser les limites d'utilisation de l'analyse. La connaissance des autres pathologies ou des traitements entraînant des faux positifs ou des faux négatifs devra être recherchée pour préciser la *sensibilité* et la *spécificité*, tout comme l'absence d'interaction pharmacologique ou analytique avec les traitements les plus courants. Ces méthodes tendent à être standardisées par des commissions ou des sociétés savantes aboutissant à des méthodes recommandées dont la bonne réalisation peut être établie par l'assurance qualité, vérifiée par des étalons de référence et suivie par un contrôle de qualité volontaire mais aussi obligatoire réalisé sous le contrôle de l'AFS-SAPS et dans une démarche qualité décrite dans un Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA, 1999). Afin d'assurer une biologie de qualité, les instruments et réactifs destinés à l'analyse des milieux biologiques humains doivent disposer d'un agrément Européen, figuré par le marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*).

Enfin la méthode doit être pratique, si possible automatisable, et de plus en plus d'un coût raisonnable. En effet l'évaluation du coût de la biologie est de plus en plus surveillée aussi bien dans les hôpitaux publics que dans le privé. Les problèmes de coût sont rendus plus aigus par le fait que l'introduction d'un nouveau marqueur plus performant ne supprime hélas pas assez souvent la prescription des marqueurs préexistants et ne fait qu'alourdir la composition des bilans biologiques. Les biologistes doivent donc s'investir de plus en plus dans la formation des jeunes cliniciens et l'obtention de consensus de prescription.

L'interprétation par le clinicien de la concentration d'un marqueur biologique nécessite de connaître les variations physiologiques de ce paramètre qui vont dépendre de l'âge, du sexe, de rythmes biologique (heure, période), de l'état de jeun ou postprandial, des états de grossesse et parfois du mode de vie (tabac, alcool, altitude...) (tableau 1) (Métais *et al.*, 1997). On essaiera aussi de limiter le nombre de ces variables par exemple en prélevant tous les sujets le matin à jeun pour éviter l'effet du rythme nyctéméral et des repas. Le nombre de paramètres influençant les constantes biologiques est tellement élevé qu'il est difficile de définir un sujet sain, et qu'il faudrait un nombre de catégories considérables. C'est pourquoi pour évaluer un marqueur biologique on le comparera non pas à des valeurs dites « normales »

Tableau 1 ■ Facteurs de variation d'un marqueur biologique.

variations pré-analytiques	conservation du prélèvement, anticoagulant
variations analytiques	variations pré instrumentales : prise d'échantillon, de réactifs, température variations instrumentales : longueur d'onde, détecteur... <i>précision intra-sérielle, inter-sérielle, inter-laboratoire</i>
variations biologiques	variations intra-individuelles : repas, rythmes nyctéméraux, stress, exercice variations inter-individuelles : taille, poids, sexe, âge, grossesse environnement, habitudes (tabac, alcool...)

mais à des valeurs dites « usuelles ». Lorsque ces valeurs sont établies sur une population particulièrement sélectionnée pour éviter toute anomalie on parlera alors de valeurs de « référence » de la constante biologique. Plusieurs ouvrages recensent ces valeurs de référence, soit par marqueurs biochimiques (Kamoun et Frejaville, 2002), soit par pathologie (Doré, 1994).

Ces valeurs usuelles dépendront fortement de la méthode d'analyse utilisée et il sera donc capital de comparer les valeurs mesurées chez le malade à des valeurs usuelles obtenues par la même technique.

5 ■ LES LIMITATIONS DES MARQUEURS BIOLOGIQUES

De nombreux facteurs limitent l'utilisation des marqueurs biologiques en médecine. Il s'agit de facteurs liés à la méthode utilisée, comme un manque de sensibilité ou de spécificité, mais surtout de facteurs biologiques, telle la difficulté d'accès aux variations du compartiment intracellulaire au sein duquel se produisent pourtant l'essentiel des modifications biochimiques pathogènes. L'accès aux tissus est très difficile ou réduit à des biopsies de quelques microgrammes, rendant impossible les dosages. De plus, les tissus sont composés de nombreux types cellulaires et la biopsie peut aussi bien ramener un tissu noble, que des vaisseaux ou un tissu fibreux de remplacement. Or de nombreuses anomalies sont limitées à une partie d'un tissu. Parfois il serait même utile d'avoir accès aux teneurs dans un compartiment de la cellule (noyau, mitochondrie, lysosome), car la maladie est due soit à des anomalies au sein de ces organites, soit à des anomalies de translocation entre le cytosol et ces organites. On peut espérer que les nanotechniques analytiques qui apparaissent permettront rapidement ce type de mesure sur de petits échantillons.

Enfin il existe de grandes variabilités biochimiques entre les individus et pour une même maladie un grand nombre de variantes qui n'entraînent pas les mêmes perturbations biochimiques.

6 ■ LA RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS

La miniaturisation des méthodes chromatographiques, les progrès de l'électronique appliqués à la spectrométrie de masse et ceux de l'informatique ont permis le développement de nouvelles technologies d'analyse biologiques permettant la mesure globale d'un ensemble de constituants biologiques : gène (génomique), ARN (transcriptome), protéines (protéome), lipides (lipidome), métabolites (métabolome). Même si cette mode de nouvelle dénomination est parfois irritante, et si ces techniques sont utilisées parfois comme une arme absolue sans grands discernements ni compé-

tences biologiques, elles constituent un progrès considérable de la biologie.

Ces méthodes apportant pour un même sujet des milliers et bientôt des millions d'informations biologiques permettent de rechercher non seulement de nouveaux marqueurs isolés mais aussi de nouvelles méthodes globales d'appréhender les variations des biomolécules par l'application des techniques de biostatistiques (clusterisation, analyses en composantes principales...). Les nouveaux paramètres issus de ces techniques globales doivent être validés par une logique mécanistique. Ceci est rendu possible par les progrès considérables dans la connaissance des mécanismes moléculaires des maladies humaines (Ameziane *et al.*, 2006) que réciproquement la biologie clinique contribue aussi à enrichir.

Références bibliographiques

- Ameziane N, Bagard M, Lamoril J (2006). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier, Paris.
- Delattre J, Durand G, Jardillier J-C (2003). Biochimie pathologique. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- De Bouvet A, Boitte P, Aiguier G (2006). Questions éthiques en médecine prédictive. John Libbey Eurotext, Paris.
- Doré D (1994). Biochimie clinique, Maloine, Paris.
- GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (1999). Arrêté du 26 novembre 1999, publié au J.O. du 11 décembre 1999.
- Kamoun P et Frejaville J-P (2002). Guide des examens de laboratoires, 4^e édition. Flammarion, Paris.
- Métais P, Agneray J, Féraud G, Frichard J-C, Jardillier J-C, Revol A, Siest G, Stahl A (1997). Biochimie Clinique 2. Simep, Villeurbanne.
- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC (1986). Protocole de validation de techniques (Document B). *Ann Biol Clin*, **44** : 686-745.

Dosage des marqueurs biologiques par immunoanalyse

Jean François Benoist, Daniel Biou, Didier Chevenne

1 ■ UN BREF HISTORIQUE DES DÉVELOPPEMENTS DE L'IMMUNOANALYSE

- 1.1. Période initiale (~ 1860-1935)
- 1.2. Quelques mots sur la réaction Ag/Ac en milieu liquide : courbe de précipitation d'Heidelberger
- 1.3. Immunoprécipitation en milieu gélifié (~ 1860-1935)
- 1.4. Immunoprécipitation en milieu liquide (~ 1930-2011)
- 1.5. Immunoanalyses avec marqueur (1959-2011)

2 ■ IMMUNOPRÉCIPITATION EN MILIEU LIQUIDE ET DÉTECTION PAR NÉPHÉLOMÉTRIE OU TURBIDIMÉTRIE

- 2.1. Principe
- 2.2. Paramètres modulant les critères de performance d'un dosage en IT/IN
- 2.3. Avantages et inconvénients des techniques par IT/IN
- 2.4. Marqueurs en biochimie clinique dosés par IN ou IT

3 ■ IMMUNOANALYSES AVEC AG OU AC MARQUÉS

- 3.1. Immunoanalyses en phase hétérogène
- 3.2. Immunoanalyses en phase homogène

4 ■ GÉNÉRATION DU SIGNAL ET SYSTÈMES DE DÉTECTION

- 4.1. Limites de détection des immunoanalyses
- 4.2. Marqueurs radioactifs
- 4.3. Marqueurs enzymatiques : « enzyme immunoassay : EIA »
- 4.4. Marqueurs directement fluorescents
- 4.5. Marqueurs directement chimiluminescents
- 4.6. Marquage amplifié par le système streptavidine/avidine-biotine
- 4.7. Marquage par la protéine A

5 ■ INTERFÉRENCES DANS LES IMMUNODOSAGES

- 5.1. La réaction croisée
- 5.2. Interférences par des Ac
- 5.3. Interférence par excès d'Ag : effet crochet « *hook effect* »
- 5.4. Autres types d'interférences (liste non exhaustive)
- 5.5. Problèmes liés à la standardisation

6 ■ AUTOMATISATION DE L'IMMUNOANALYSE

7 ■ PRINCIPAUX BIOMARQUEURS ACTUELLEMENT DOSÉS PAR IMMUNOANALYSE

8 ■ ÉVOLUTIONS RÉCENTES ET FUTURES DE L'IMMUNOANALYSE

Références bibliographiques

Un marqueur biologique est une molécule ou un paramètre physiologique qui témoigne d'un éventuel dysfonctionnement biologique. Il est choisi, compte tenu de ses qualités de sensibilité et spécificité vis-à-vis d'un processus pathologique donné, pour ses performances aux différents stades de l'investigation : diagnostic, suivi thérapeutique ou pronostic. Idéalement et en l'absence de prescription redondante tous les paramètres d'un bilan biologiques peuvent être considérés comme des marqueurs biologiques, même les plus classiques comme une simple natrémie.

Il ne saurait être question dans ce bref exposé de revisiter toute la biochimie analytique.

En pratique, l'appellation marqueurs recouvre un ensemble très hétérogène de molécules de tailles variables, e.g. stéroïdes, protéines... Parmi leurs nombreuses propriétés physicochimiques et biologiques utiles pour leur analyse, ces marqueurs possèdent en commun le caractère antigénique. Cette propriété à la fois universelle et spécifique à chaque marqueur explique le succès de l'immunoanalyse (IA), pour l'investigation à la fois qualitative et quantitative de ces marqueurs.

L'IA se caractérise par la très grande diversité de son ingénierie et de ses domaines d'applications, e.g. biologie humaine, biologie animale, sciences de l'environnement...

Ce bref chapitre, qui ne peut être exhaustif, se propose de présenter les principaux concepts de l'IA et leurs applications aux automates actuels d'IA équipant les laboratoires de biologie. Le paragraphe 5 est consacré aux principaux pièges que l'on peut rencontrer dans l'interprétation des résultats. Le paragraphe 6 est consacré au marché de l'IA. Il présente une brève description des critères constitutifs du cahier des charges d'un automate. Le paragraphe 7 liste les principaux biomarqueurs actuellement dosés dans le domaine de la biochimie clinique.

N'ont pas été traitées dans ce chapitre :

- les analyses qualitatives des marqueurs en milieu gélifié qui, à de rares exceptions, ne sont pratiquement plus d'actualité ;
- les techniques manuelles ou semi-automatiques proposées pour les investigations au lit du malade ou chez soi.

Ces techniques, notamment celles concernant la biochimie délocalisée ont certainement un fort potentiel d'avenir pour le biologiste, mais pour l'instant la panoplie des marqueurs proposés et leurs installations sur automates sont assez restreintes.

Nous invitons vivement le lecteur qui souhaiterait approfondir les nombreuses facettes du vaste domaine de l'IA à consulter les dernières éditions de trois ouvrages très complets (Price et Newman, 1997, Wild, 2005, Tietz, 2006).

1 ■ UN BREF HISTORIQUE DES DÉVELOPPEMENTS DE L'IMMUNOANALYSE

1.1. Période initiale (~ 1860-1935)

Au cours de cette période il a été établi que :

- L'injection chez un animal (immunisation) d'une entité étrangère dénommée antigène (Ag) induit la production dans le sérum de

l'animal (immunsérum : IS) de protéines dénommées anticorps (Ac) reconnaissant l'Ag.

- L'IS peut flocculer le milieu de culture contenant la substance étrangère et produire ainsi une turbidité ou un précipité.
- La réaction de l'Ag avec l'Ac en milieu gélifié, produit un précipité stable.

1.2. Quelques mots sur la réaction Ag/Ac en milieu liquide : courbe de précipitation d'Heidelberger

Les nombreux déterminants antigéniques ou épitopes d'une protéine peuvent en solution s'associer avec les paratopes correspondants d'Ac spécifiques pour former des agrégats (IC) de taille variable. Ces IC pourront être détectés/dosés par leur propriété de diffusion (néphélométrie) ou d'atténuation (turbidimétrie) d'une lumière incidente.

La taille et la masse des IC formés dépendront des concentrations relatives en Ag et en Ac. Ainsi pour une concentration fixée en Ac et pour des concentrations croissantes en Ag on distingue 3 zones en fonction de la taille des IC (figure 1).

1) Zone I : grand excès d'Ac $\rightarrow (Ac) \gg (Ag)$.

Dans la partie ascendante de la courbe les molécules d'Ag ajoutées sont rapidement saturées par les molécules d'Ac en excès. Les IC sont en moyenne de petites tailles, e.g. $Ag-(Ac)_n$ et isolés (pas ou peu de ponts Ac entre les molécules d'Ag). On note la présence de molécules d'Ac libres. Avec l'ajout d'Ag, la taille des IC augmente par établissement progressif de ponts Ac entre les molécules d'Ag et ce jusqu'à épuisement des molécules d'Ac libres.

2) Zone II : zone d'équivalence ou d'excès modéré d'un des partenaires par rapport à l'autre.

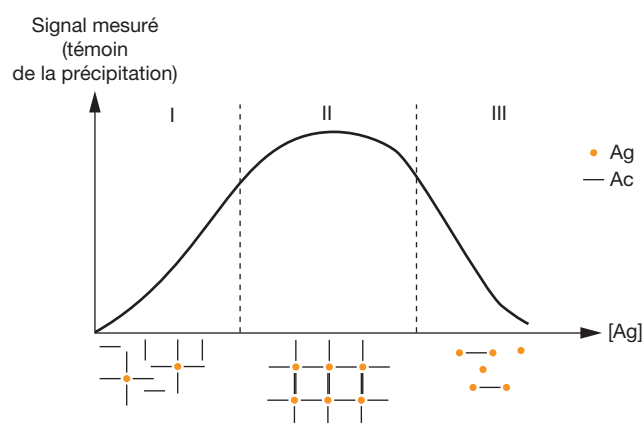


Figure 1 ■ Courbe de précipitation du complexe Ag-Ac.

Zone I : zone d'excès relatif en Ac par rapport à l'Ag. Les épitopes de l'Ag sont saturés par les paratopes de l'Ac. L'immun-complexe (IC) est de faible taille et précipite peu.

Zone II : zone d'équivalence. La proportion en épitopes et en paratopes est optimale pour former un réseau tridimensionnel. L'IC est de grande taille et précipite.

Zone III : zone d'excès relatif en Ag par rapport à l'Ac. Les paratopes de l'Ac sont saturés par les épitopes de l'Ag. L'immun-complexe (IC) est de faible taille et précipite peu.

Dans cette zone les IC forment des réseaux ou agrégats qui atteignent une taille et une masse maximale lorsque les concentrations en Ag et en Ac sont dans un rapport d'équivalence.

NB : au point d'équivalence l'IC précipitant peut être emprisonné dans les mailles d'un gel et ainsi être visualisé. C'est le principe de l'immunochimie en milieu gélifié.

3) Zone III : grand excès d'Ag → (Ac) << (Ag). Les molécules d'Ag ajoutées en saturant progressivement les molécules d'Ac entraînent une décomposition des réseaux avec formation d'IC isolés et de petites tailles, e.g. Ac-(Ag)₂, et présence de molécules d'Ag libres en excès.

Pour résumer : considérant un IC à son point d'équivalence (zone II), la taille de cet IC diminuera quand on s'éloignera du rapport d'équivalence, i.e. zones d'excès d'Ag ou d'Ac. Cette diminution de taille de l'IC précipitant par excès d'Ag ou d'Ac est aussi dénommée phénomène de zone.

Applications et conséquences de la courbe d'Heidelberger :

- zone 1 : dosage d'Ag par immunoturbidimétrie (IT) ou immunonéphélométrie (IN) ;
- zone 2 : immunochimie en milieu gélifié ;
- zone 3 : faux négatifs par excès d'Ag ou effet crochet.

1.3. Immunoprécipitation en milieu gélifié (~ 1860-1935)

Cette technique inclut la période initiale jusqu'aux années 1980. Cependant les principales applications, aussi bien qualitatives que quantitatives, ne furent développées qu'au cours des décennies 1940-1980 tout d'abord par Oudin 1946 puis successivement par Ouchterlony 1948, Grabar et Williams 1953, Mancini 1963 et Laurell 1965.

- En milieu gélifié la diffusion ou migration électrophorétique de l'Ag vers l'Ac conduit à la formation au point de rencontre d'un immunocomplexe (IC), de stœchiométrie variable. Au-delà d'une certaine taille, lorsque les partenaires en présence sont dans un rapport optimal dit rapport d'équivalence, cet IC est emprisonné dans les mailles du gel et précipite (zone II de la figure 1). En dehors de la zone d'équivalence, ce précipité stable peut se resolubiliser par excès ou défaut relatif d'un des partenaires, c'est le phénomène de zone (zones I et III de la figure 1).
- À l'équilibre de la diffusion/migration, l'IC précipité dans son rapport d'équivalence apparaît dans le gel (selon les formats expérimentaux) sous forme d'arc, de cercle, ou de pics. Cet IC est stable et peut être visualisé d'emblée ou après fixation et coloration. Dans certains formats, e.g. techniques de Mancini et de Laurell, la surface des cercles ou des pics est proportionnelle à la quantité d'Ag déposée, permettant ainsi une quantification.
- L'immunoprécipitation en milieu gélifié a été progressivement remplacée par des techniques plus rapides et plus sensibles, en phase liquide homogène ou hétérogène et avec ou sans marqueurs.
- Une exception est toutefois observée pour l'électrophorèse de zone en agarose, suivie d'une immunofixation. Cette technique

en milieu gélifié demeure incontournable pour caractériser les pathologies associées à une dysfonction de la synthèse des immunoglobulines (Ig) monoclonales.

1.4. Immunoprécipitation en milieu liquide (~ 1930-2011)

Les applications cliniques de cette technique sont progressivement apparues à partir de 1948 et se sont développées avec la mise au point par les industriels d'IS et d'appareils de lecture de plus en plus performants permettant d'atteindre des limites de sensibilité de l'ordre du mg/L (voir paragraphe 2).

1.5. Immunoanalyses avec marqueur (1959-2011)

La quantification d'un Ag (ou celle d'un Ac) par la mesure d'une marque préalablement fixée sur l'un des partenaires de la réaction Ag/Ac, regroupe la majorité des dosages de marqueurs biologiques actuellement installés sur les automates d'IA. Les différentes facettes de cette technologie, qui constituent le *corpus* de ce chapitre consacré aux immunodosages, seront développées à partir du paragraphe 3. Les progrès au cours des dernières décennies ont été multidirectionnels : production d'Ac de grande spécificité (Ac monoclonaux), de haute affinité et de faible immunogénicité, évolution à partir des marqueurs isotopiques traditionnels vers des systèmes hautement sensibles par amplification enzymatique couplés à des détecteurs par chimiluminescence ou fluorescence. On estime en 2011 que le développement du concept d'IA avec marqueur a atteint sa maturité.

2 ■ IMMUNOPRÉCIPITATION EN MILIEU LIQUIDE ET DÉTECTION PAR NÉPHÉLOMÉTRIE OU TURBIDIMÉTRIE

La néphélométrie et la turbidimétrie sont des techniques apparentées basées sur l'incidence de particules dispersées en solution, e.g. immunocomplexes, sur la diffusion/transmission d'une radiation lumineuse incidente (Kricka *et al.*, 2006). En biochimie médicale cette technique est essentiellement appliquée au dosage des protéines.

2.1. Principe

Les dosages par immunoprécipitation en milieu liquide se déroulent dans la zone I de la courbe d'Heidelberger (figure 1). Pour une concentration d'Ac définie et en excès la concentration en IC augmente avec la concentration en Ag. Les IC formés, compte tenu de leur taille, ont la propriété de diffuser ou d'absorber une lumière incidente et cette diffusion/absorption est proportionnelle (jusqu'à une certaine limite) à la concentration d'Ag à doser. Il en résulte une courbe de calibration analogue à la partie ascendante de la figure 1.

En IN, on mesure l'intensité de la lumière diffusée par les particules en suspension (ici les IC) dans un certain angle par rapport au rayon incident (e.g. de 70° à 5°) et à une longueur d'onde définie. L'intensité de la lumière diffusée dépend entre autres facteurs de la longueur d'onde, de la taille des particules, de leur concentration...

En IT, on mesure la diminution (par réflexion, diffusion ou absorption par les particules en suspension) de la lumière transmise dans l'axe du rayon incident (i.e. 180°). Le terme absorbance, bien qu'inapproprié, est souvent utilisé car la démarche est analogue à la mesure d'une absorbance mais le phénomène physique est ici complètement différent de l'absorption moléculaire. Le choix de la longueur d'onde tient compte des interférences par la bilirubine et les porphyrines.

Interférences possibles : par d'autres particules en solution (poussières, lipoprotéines, macro protéines, agrégats non spécifiques : donc opérer si possible en solution diluée) ou par le bruit de fond des instruments.

Choix entre IN et IT ?

La néphélométrie est en principe plus sensible que la turbidimétrie donc mieux adaptée à la mesure de faibles concentrations en Ag mais la méthodologie est plus onéreuse (source laser) et plus délicate à mettre en œuvre.

La plupart des automates d'analyse multiparamétriques de biochimie sont équipés de spectrophotomètres et sont donc capables de réaliser des mesures en turbidimétrie. L'optimisation est simple et le principal souci est d'obtenir un rapport signal/bruit de fond optimal (e.g. bruit de fond < 0,0002 unité d'absorbance).

2.2. Paramètres modulant les critères de performance d'un dosage en IT/IN

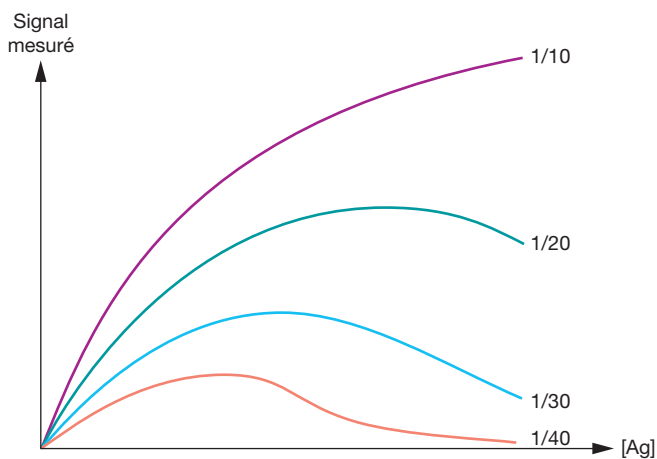


Figure 2 ■ Effet de la dilution en Ac sur la qualité du signal mesuré en IT ou en IN.

Lorsque la concentration en Ac augmente :

- le signal mesuré augmente ;
- la zone d'équivalence se déplace vers des concentrations en Ag plus élevées ;
- il en résulte une plage de lecture plus étendue,
- l'effet de zone par excès d'Ag est bien visible sur les 3 courbes correspondant aux plus fortes dilutions en Ac.

2.2.1. Concentration en Ac

La plage des concentrations en Ag directement accessibles au dosage est étroitement dépendante de la concentration en Ac (figure 2). En situation d'excès d'Ac on constate que lorsque la concentration en Ac augmente :

- le signal généré par l'IC augmente ;
- la 1^{re} partie de la courbe devient de plus en plus linéaire ;
- la concentration en Ag correspondant au point d'équivalence augmente.

Il résulte de ces 3 observations que la précision et la plage de lecture du dosage augmentent avec la concentration en Ac.

2.2.2. Concentration en Ag

Le domaine de mesure des concentrations en Ag doit être le plus large possible compte tenu des variations physiopathologiques.

2.2.3. Ajout de polymères

L'addition de polymères non ioniques, e.g. PEG 6000, diminue par un phénomène d'exclusion le volume de solvant disponible pour solvater les macromolécules. On observe dans le volume réactionnel résiduel une augmentation des concentrations en Ag et en Ac et donc du matériel immunoprécipité.

Inconvénients : le PEG diminue aussi la solubilité d'autres protéines de l'échantillon augmentant ainsi la valeur du blanc échantillon (qui peut parfois représenter plus de 50 % du signal).

2.2.4. Cinétique de la réaction

La lecture du matériel précipité peut se faire selon les automates en mode cinétique (lecture plus rapide) ou en mode point final.

2.2.5. Nature de l'immunsérum

L'IS est de préférence polyclonal, de titre et d'avidité élevés en Ac. Le titre conditionne la dilution de travail tandis que l'avidité conditionne la rapidité du dosage. L'utilisation d'Ac monoclonaux n'est envisageable (si l'on souhaite une bonne agrégation) que sous forme de mélange d'Ac monoclonaux bien défini, donc finalement en reconstituant un mélange polyclonal. Dans ce cas l'avantage serait dans une amélioration substantielle de la qualité du dosage par une définition très précise et reproductible de l'IS.

2.3. Avantages et inconvénients des techniques par IT/IN

2.3.1. Avantages

- Coût relativement faible comparé aux IA utilisant des partenaires marqués.
- Rapidité.
- Nombreux protocoles en ligne (ou facile à installer) sur les automates de biochimie générale.

2.3.2. Inconvénients

a) Risque de faux négatif par excès d'Ag

Le signal dans ce cas émane d'un point situé dans la zone III de la courbe de précipitation (figure 1) mais est lu dans la zone I. On observe un biais important par défaut.

Exemple : au cours de syndrome néphrotique, certaines albuminuries dosées sur urines non diluées peuvent être rendues par l'automate < seuil de détection 3 mg/L !!! Une réanalyse sur dilution convenable permet d'obtenir la vraie valeur (souvent > 2 000 mg/L).

Il convient donc d'être particulièrement vigilant pour les analyses présentant de fortes variations physiopathologiques, e.g. marqueurs tumoraux, étalées sur plusieurs ordres de magnitude.

Quelles sont les parades possibles ?

- Doser systématiquement sur 2 dilutions différentes (mais augmentation du coût).
- Choisir une configuration de dosage telle que le plateau correspondant à la zone d'équivalence (zone II de la figure 1) soit déplacé vers la droite. Cet objectif peut être atteint en choisissant un IS de titre et d'avidité élevés (e.g. dosage de l'albuminurie par la trousse Diasys®).
- Être vigilant lors de la validation (historique, renseignements cliniques...).

b) Effets de matrice

Par les particules et macromolécules de l'échantillon, e.g. lipoprotéines, IC endogènes, agrégats d'Ig (particulièrement après plusieurs cycles de congélation/décongélation de l'échantillon). Ces interférences augmentent la valeur du blanc échantillon diminuant ainsi la sensibilité du dosage.

Quelles sont les parades possibles ?

- Opérer si possible sur des prélèvements à jeun et dilués.
- Délipider préalablement (e.g. traité par Lipoclear^R).
- Filtrer les réactifs pour éliminer les poussières.
- Faire des lectures en mode cinétique et/ou en bi-chromatisme.

c) Sensibilité insuffisante pour beaucoup de biomarqueurs présents à faible concentration.

Quelles sont les parades possibles ?

- Améliorer la qualité de l'IS (titre et avidité).
- Utiliser la néphélométrie.
- Utiliser des polymères ou des particules (latex) recouvertes d'Ac.

Actuellement la sensibilité optimale est de l'ordre de 0,2 mg/L. Ce seuil annoncé pour le dosage ultrasensible de la CRP correspond pour cette protéine à une concentration d'environ 1,4 nM.

2.4. Marqueurs en biochimie clinique dosés par IN ou IT

2.4.1. Protéines

La condition nécessaire pour une protéine candidate est d'être suffisamment concentrée dans l'échantillon, e.g. > 1 mg/L. Ainsi sont classiquement dosés : des marqueurs de la réponse inflammatoire, du statut nutritionnel, du statut martial, de l'immunité humorale, de l'hémostase, des composés du complément, des marqueurs tumoraux, des marqueurs de la fonction glomérulaire, de la fonction tubulaire, etc.

2.4.2. Haptènes

La formation d'agrégats précipitant à partir d'haptènes, pas ou peu polyvalents, e.g. stéroïdes, médicaments, est théoriquement difficile. Cette formation est néanmoins rendue possible en couplant préalablement l'haptène pur à une macromolécule ou une particule de latex pour former un haptène traceur, puis en agglutinant les particules de traceur par l'Ac. En présence d'haptène libre à doser, on observe une inhibition d'agglutination des particules de traceur et un signal inversement proportionnel à la concentration en Ag à doser. Le principe est donc ici différent d'une immunoprécipitation classique.

L'IN et l'IT sont encore très utilisées pour doser certaines protéines classiques présentes dans le plasma, les urines ou le liquide céphalorachidien. De nombreux protocoles sont installés sur la plupart des automates de biochimie générale. Ils concernent des protéines possédant le statut de biomarqueur et en concentration suffisante dans leur échantillon biologique (> mg/L) pour être détectable par ce type de technique. Lorsque la concentration est insuffisante, des techniques plus sensibles faisant appel à des partenaires marqués, sont proposées (voir paragraphe 3).

3 ■ IMMUNOANALYSES AVEC AG OU AC MARQUÉS

Le marché actuel des immunodosages est dominé par des méthodes conçues à partir d'Ag ou d'Ac marqués. Le marqueur peut être un atome ou une molécule plus ou moins complexe, e.g. enzyme. Pour éviter toute confusion avec le concept de « marqueur » biologique nous avons choisi les termes *traceur* ou encore les symboles Ag* ou Ac* pour désigner un Ag ou un Ac marqué.

Les traceurs radioactifs (RIA ou IRMA) ont dans un premier temps largement dominé le marché des immunodosages mais les contraintes liées à l'utilisation des radioéléments conduisent progressivement à leur remplacement par des traceurs non radioactifs : activité enzymatique (EIA), fluorescence (FIA), chimioluminescence (CLIA)... Malgré tout, les dosages par RIA restent encore utilisés (pour des raisons de coût et de simplicité, en technique manuelle ou semi-manuelle) pour le dosage d'analytes peu prescrits ou récemment proposés et pour lesquels il n'existe pas d'alternative par d'autres méthodes.

Les très nombreux schémas réactionnels proposés en IA sont le plus souvent classés :

- en fonction du mode d'interaction entre l'analyte à doser et l'Ac : dosages de type compétitif (Ac en défaut) *versus* type non compétitif (Ac en excès) ;
- en fonction du mode de différenciation des formes libres et liées du traceur : dosages en phase hétérogène (séparation obligatoire des formes libres et liées du traceur) *versus* dosages en phase homogène (pas de séparation nécessaire).

3.1. Immunoanalyses en phase hétérogène

3.1.1. Mode compétitif

En mode compétitif l'analyte à doser (en général un Ag de masse moléculaire < 3 000 Da) entre en compétition avec le traceur (*i.e.* Ag*) pour se fixer sur l'Ac (le plus souvent en quantité limitée par rapport au traceur : $Ac < Ag^*$). Après atteinte de l'équilibre, la quantité de traceur lié à l'Ac est inversement proportionnelle à la concentration en analyte à doser (figure 3).

Lorsque les formes libres et liées du traceur (Ag* et Ag*-Ac) présentent la même activité ou émettent le même signal, une étape de séparation de ces deux formes est indispensable pour ne mesurer que le signal émis par la forme liée. Dans ce cas la technique d'immunoanalyse se déroule en phase dite hétérogène, la forme liée du traceur étant insolubilisée.

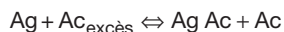
NB : lorsque les activités des formes libres et liées du traceur sont très différentes leur séparation n'est pas nécessaire. Dans ce cas la technique d'immunoanalyse se déroule en phase dite homogène (voir paragraphe 3.2.).

- Pour l'addition des réactifs il y a 2 façons de procéder :
1) Addition simultanée de l'ensemble des réactifs, *e.g.* Ag* + Ac + Ag à doser. L'analyte à doser (Ag) et le traceur (Ag*) sont en compétition pour la fixation sur l'Ac en défaut.

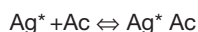


- 2) Addition séquentielle : l'Ac est en excès par rapport à l'analyte à doser mais en défaut par rapport au traceur *e.g.* $Ag < Ac < Ag^*$. Ce procédé, qui augmente la sensibilité du dosage d'un facteur 2 à 4, est particulièrement indiqué pour doser de faibles concentrations d'Ag.

- l'analyte à doser est d'abord ajouté à l'Ac en excès :



- après atteinte de l'équilibre le traceur est ajouté :



- Après insolubilisation des formes liées de l'Ag (Ag Ac et Ag* Ac), la quantité de traceur lié est mesurée par le signal émis par la marque* (radio-activité, activité enzymatique, fluorescence, chimiluminescence...).

- La concentration en analyte (inversement proportionnelle à la quantité de traceur lié) est ensuite calculée en se reportant à une courbe d'étalonnage reliant le signal mesuré à des concentrations connues de l'analyte.

- *Applications* : le mode compétitif en phase hétérogène est particulièrement indiqué pour le dosage de petits Ag ou haptènes de masse moléculaire < 3 000 Da disposant de peu d'épitopes. Pour des molécules plus grosses, *e.g.* protéines, possédant de nombreux épitopes ce mode est avantageusement remplacé par le mode non compétitif plus sensible et plus spécifique.

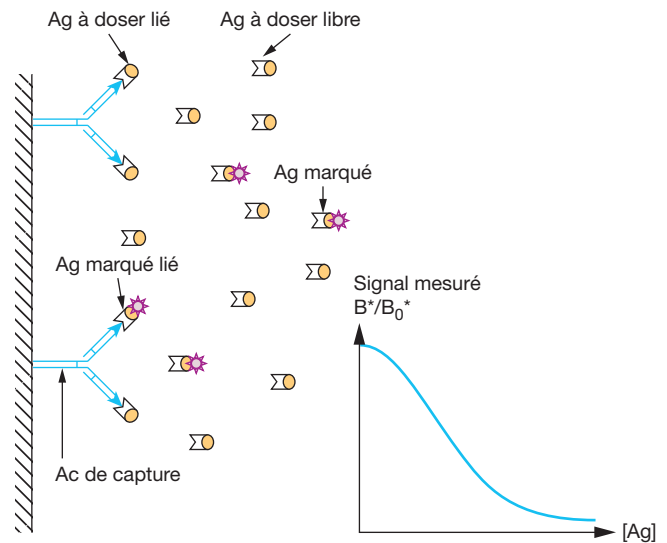


Figure 3 ■ Principe du dosage compétitif en phase hétérogène.

L'Ac de capture est le plus souvent en défaut par rapport à l'Ag traceur et à l'Ag à doser.

F^* (free : fraction libre) : signal émis par la concentration en traceur libre.
 B^* (bound : fraction liée) : signal émis par le traceur lié à l'Ac de capture.
 B_0^* : signal émis par le traceur lié à l'Ac de capture en absence d'Ag à doser.
 Dans cet exemple 12 molécules d'Ag à doser sont en compétition avec 4 molécules d'Ag* traceur. Le rapport B^*/F^* du traceur est donc de 1 : 3.

3.1.2. Mode non compétitif : méthode dite sandwich ou immunométrique

- L'analyte à doser (Ag) est pris en sandwich entre deux réactifs spécifiques introduits en excès : un Ac de capture et un Ac* traceur (ces deux Ac ont en général des spécificités différentes) (figure 4) :

- l'Ac de capture est introduit d'emblée en phase hétérogène par adsorption ou fixation covalente sur un support solide (micro-cuvettes, billes de polymère, particules aimantées...);

- l'Ag à doser, totalement fixé par l'Ac de capture en excès, est aussi d'emblée insolubilisé ;

- l'Ac* traceur (ajouté en excès), va se fixer sur un épitope libre de l'Ag insolubilisé et former en principe autant de sandwich que de molécules d'Ag à doser ;

- la séparation des formes libre et liée du traceur est obtenue par simple lavage puisque la forme liée est déjà insolubilisée sur le « sandwich » ;

- après révélation de l'activité du traceur lié, le signal mesuré est directement proportionnel à la concentration en Ag à doser.

- Quelle est la condition nécessaire pour ce type de dosage ?

L'Ag doit posséder au moins 2 épitopes indépendants et suffisamment éloignés pour éviter les phénomènes d'encombrement stérique. Pour une meilleure spécificité il est conseillé de cibler des épitopes structurellement différents, mais ce n'est pas une obligation.

- Comment fixer l'Ac de capture ?

La méthode la plus simple est une fixation directe de l'Ac sur la phase solide ; mais ce procédé peut entraîner une diminution de

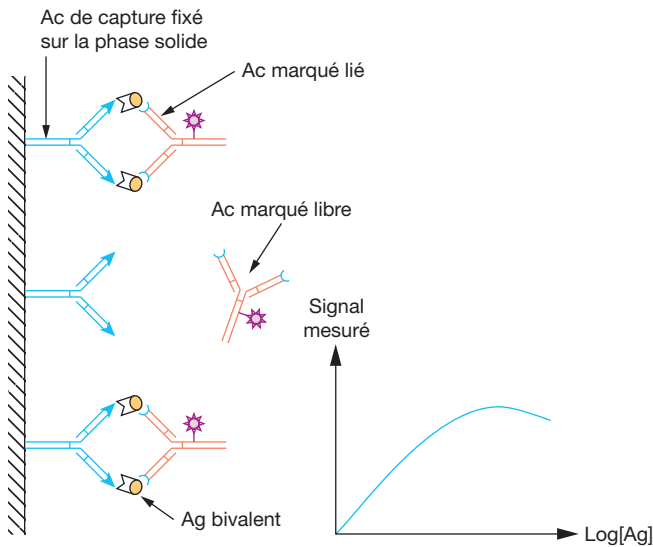


Figure 4 ■ Principe du dosage non compétitif en phase hétérogène. Les Ac de capture et Ac traceur sont en principe en excès par rapport à l'Ag à doser.

la capacité de liaison par encombrement stérique ou par fixation de l'Ac *via* son fragment Fab. Pour optimiser cette capacité de liaison, des modes de fixation indirects ont été proposés en recouvrant successivement la phase solide :

- par un Ac anti-Fc de l'espèce produisant l'Ac de capture puis par l'Ac de capture ;
- ou par un Ac anti-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) puis par l'Ac de capture couplé à FITC ;
- ou par une ancre protéine-streptavidine puis par l'Ac de capture couplé à de la biotine ;
- ou par des récepteurs bactériens du fragment Fc de l'Ac de capture, e.g. protéine A ou protéine G.

• **Choix des Ac :**

Les Ac de capture et les Ac traceurs peuvent être polyclonaux ou monoclonaux, de spécificité identique ou différente. La tendance actuelle est à l'utilisation d'Ac monoclonaux de souris de spécificité bien définie, de qualité constante et de plus en plus « humanisés » pour éviter les interférences par les éventuels Ac anti-Ig animales du patient (voir paragraphe 5.2.)

• **Ordre d'addition des réactifs : mode simultané ou séquentiel ?**

Avec deux Ac monoclonaux de spécificités différentes, il est possible d'opérer en 1 étape (addition simultanée de l'échantillon, de l'Ac de capture et de l'Ac* traceur) ce qui simplifie le protocole sur automate. Cependant pour des concentrations en analyte très élevées (dépassant les capacités des Ac, pourtant introduits en excès) les paratopes des Ac de capture et des Ac traceurs peuvent être occupés par des molécules d'Ag différentes donc sans formation de sandwichs. Dans ces conditions une fraction de l'Ag lié à l'Ac traceur n'est pas fixée par l'Ac de capture. Cette fraction est éliminée lors du lavage ce qui entraîne une sous-évaluation plus ou moins importante de la concentration en Ag du patient. Ce comportement que l'on peut comparer au phénomène de zone observé par excès d'Ag en IN ou IT (zone III, figure 1) est

classiquement désigné par le terme effet crochet ou « hook effect » (voir paragraphe 5.3. et figure 14). En pratique ce type de comportement s'observe pour les protéines caractérisées par de fortes variations physiopathologiques, e.g. albumine urinaire, hCG, AFP, ferritine...

Le concept du sandwich peut aussi s'appliquer au dosage ou à la caractérisation d'un Ac témoin d'une infection ou d'un processus auto-immun. Dans ce cas le système de capture peut être différent de celui impliqué dans un sandwich classique. Des pseudo-sandwichs sont ainsi formés avec pour la capture :

- Soit l'Ag ayant induit la réponse humorale (e.g. un antigène de surface d'un microorganisme, tel que l'antigène HBS). L'Ac à caractériser est ainsi pris en sandwich entre l'Ag de l'agent infectieux fixé en excès sur la phase solide et l'Ac* traceur dirigé contre un isotype du fragment Fc de l'Ac de la réponse humorale (figure 5).

- Soit de la protéine A (ou G) insolubilisée. Dans ce cas l'Ac à caractériser est pris en sandwich entre la protéine A et l'Ac* marqué contre lequel est dirigé l'Ac.

Exemple : caractérisation au cours du diabète des auto-Ac anti-GAD et anti-insuline (IAA).

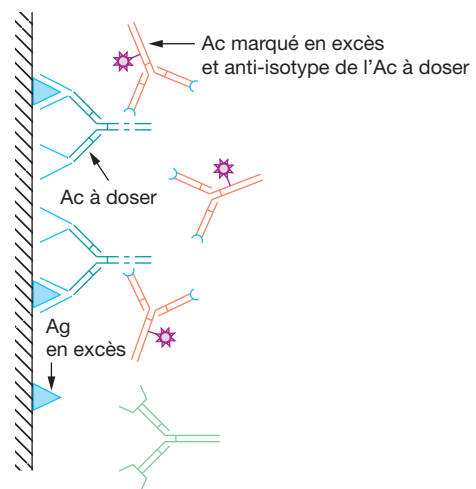


Figure 5 ■ Dosage d'un Ac par une méthode de type sandwich.

3.1.3. Techniques de séparation des formes libres et liées du traceur

Elles se répartissent en deux principaux groupes :

1) *Adsorption ou fixation covalente sur un support solide* (démarche la plus courante)

L'Ac de capture est d'emblée fixé sur un support solide :

- soit la surface intérieure de tubes en plastique ou de puits de plaques de microtitration (dans ce cas le traceur libre est éliminé par une étape de lavage) ;