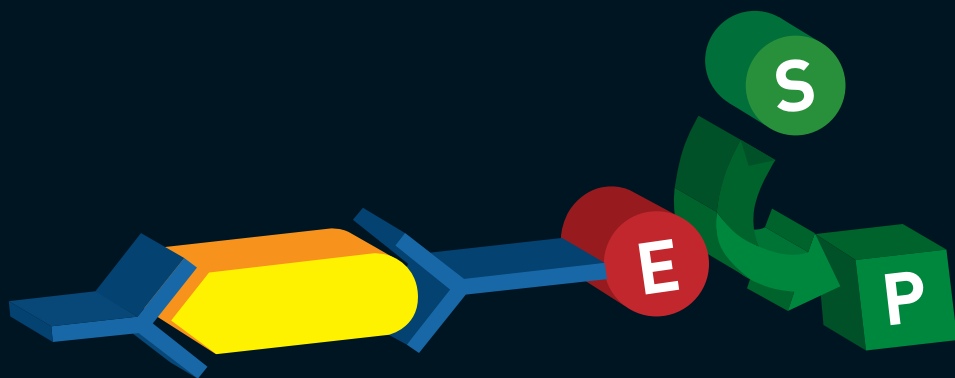


Immuno analyse

De la théorie
aux critères de choix
en biologie clinique



➤ Coordonnateur :
Catherine MASSART



IMMUNOANALYSE

De la théorie aux critères de choix
en biologie clinique

Coordonnateur :
Catherine Massart



Maquette intérieure et mise en page : idt

Imprimé en France

ISBN : 978-2-7598-0432-0

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays. La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective », et d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du code pénal.

© EDP Sciences 2009

LES AUTEURS

Catherine Massart, Biochimiste enseignant à la Faculté de Médecine de l'Université de Rennes 1, est responsable de l'Unité Fonctionnelle d'Hormonologie au CHU de Rennes. Pour coordonner cet ouvrage, elle a été mandatée par les membres d'un Groupe de Biologie Spécialisée présidé par Anne-Sophie Gauchez. Ces biologistes médecins, pharmaciens ou scientifiques issus de toute la France exercent dans des Services Hospitaliers ou Hospitalo-Universitaires de Biophysique, Médecine Nucléaire, Biochimie, Physiologie ainsi que dans des Centres de Recherche Contre Le Cancer ou au sein de grands laboratoires privés. Certains d'entre eux ont associé leur compétence multidisciplinaire pour la rédaction de cet ouvrage. Leur participation au groupe leur permet d'actualiser leur pratique, d'échanger leur savoir-faire et d'établir des normes de qualité pour de nouveaux dosages qu'ils mettent en place. Par ailleurs, ils utilisent tous en pratique quotidienne l'immunoanalyse mais certains effectuent également toutes les techniques qu'implique la réalisation d'analyse de biologie spécialisée (spectrométrie de masse, chromatographie, biologie moléculaire...). Leur spécialité les amène à travailler en étroite collaboration avec les cliniciens afin d'être en mesure de confronter les résultats biologiques avec les données cliniques. Au-delà de la qualité des services rendus, leur volonté est de pouvoir intervenir en tant qu'expert et référent en cas de discordance clinico-biologique, répondant ainsi aux exigences de la prochaine réforme de la biologie médicale. Par ailleurs, ces biologistes sont sollicités par les Autorités de Santé (HAS, AFSSAPS...) pour réaliser des études se finalisant par la rédaction de recommandations sur l'utilisation de certains paramètres ou sur leurs limites. La diversité de leur formation initiale et leur expérience multidisciplinaire en pratique biologique médicale permet une complémentarité scientifique en immunoanalyse, garantissant ainsi la cohérence finale de cet ouvrage.

Enfin, l'édition de ce livre a été réalisée grâce à l'ACOMEN (groupe d'Action Concertée des services de Médecine Nucléaire du Sud de la France), association loi 1901 créée en 1974, dont le siège social et l'administration sont situés à Montpellier (<http://www.acomen.fr>). Son but est de promouvoir et de faciliter les échanges liés à l'exercice professionnel de la médecine nucléaire, d'assurer la formation des personnes et de gérer les études de développement et de recherche dans le domaine de la médecine nucléaire et des techniques associées. L'action de l'ACOMEN se fait à travers des activités scientifiques, une formation continue et des publications.

Dany Alcaraz-Galvain : CHU de LYON

Service fédéré de biochimie et biologie moléculaire
Unité fonctionnelle endocrinologie, métabolisme, nutrition
Centre hospitalier Lyon Sud
dany.alcaraz-galvain@chu-lyon.fr

Laurence Bordenave : Université de BORDEAUX 2

Faculté de médecine, INSERM U577
Hôpital du Haut-Lévêque PESSAC
Service de médecine nucléaire
Laboratoire hormonologie et marqueurs tumoraux
laurence.bordenave@bioiphs.u-bordeaux2.fr

Florence Boux de Casson : CHU d'ANGERS

Département de biochimie et génétique
Unité fonctionnelle d'hormonologie-métabolique
flbouxdecasson@chu-angers.fr

Anne Charrié : Université Claude Bernard de LYON I

Faculté de médecine Lyon Sud, Charles Mérieux EA 37-38
CHU de LYON
Service fédéré de biochimie et biologie moléculaire
Unité fonctionnelle endocrinologie, métabolisme, nutrition
Centre Hospitalier Lyon Sud
anne.charrie@chu-lyon.fr

Karim Chikh : Université Claude Bernard de LYON I

Faculté de pharmacie, INSERM U590
CHU de LYON
Service fédéré de biochimie et biologie moléculaire
Unité fonctionnelle endocrinologie, métabolisme, nutrition
Centre Hospitalier Lyon Sud
karim.chikh@chu-lyon.fr

Anne-Sophie Gauchez

Pôle de Biologie, INSERM U877
CHU Grenoble
Département de Biologie Intégrée
38043 Grenoble cedex
ASGauchez@chu-grenoble.fr

Michèle d'Herbomez : Université de LILLE 2

Faculté de médecine
CHRU de LILLE
Laboratoire de médecine nucléaire
Centre de biologie-pathologie
michele.d'herbonez@chru-lille.fr

Isabelle Lacroix : Laboratoire Pasteur Cerba, CERGY PONTOISE

ilacroix@pasteur-cerba.com

Pierre-Jean Lamy : Centre de Lutte Contre le Cancer Val d'Aurelle-Paul Lamarque, MONTPELLIER

Laboratoire de biologie spécialisée
Unité de transfert en cancérologie clinique
pjlamy@valdorel.fnclcc.fr

Catherine Massart : Université de RENNES 1

Faculté de médecine, INSERM 0203 Centre d'investigation clinique
CHU de RENNES
Unité fonctionnelle d'hormonologie
Pôle molécules
catherine.massart@chu-rennes.fr

Bruno Mathian : Université Claude Bernard de LYON I

Faculté de pharmacie
CHU de LYON
Service fédéré de biochimie et biologie moléculaire
Unité fonctionnelle endocrinologie, métabolisme, nutrition
Centre hospitalier Lyon Sud
bruno.mathian@chu-lyon.fr

Frédéric Montels : Centre de lutte contre le cancer Val d'Aurelle-Paul Lamarque, MONTPELLIER

Laboratoire de biologie spécialisée
frederic.montels@valdorel.fnclcc.fr

Jean-Marc Riedinger : Centre de lutte contre le cancer Georges François Leclerc, DIJON

Département de biologie et de pathologie des tumeurs
Unité de biologie clinique
jriedinger@dijon.fnclcc.fr

Rémy Sapin : Université Louis Pasteur de STRASBOURG

Faculté de médecine, ULP/CNRS UMR 7191

CHRU de STRASBOURG

Laboratoire d'explorations fonctionnelles par les isotopes

remy.sapin@chru-strasbourg.fr

Corinne Sault : Laboratoire Biomnis, LYON

corinne.sault@biomnis.com

Jean-Claude Souberbielle : Hôpital Necker-Enfants Malades, PARIS

Service d'explorations fonctionnelles

jean-claude.souberbielle@nck.ap-hop-paris.fr

Chantal Valat : Université François Rabelais de TOURS

Faculté de médecine, INSERM 618

CHU Bretonneau de TOURS

Laboratoire de médecine nucléaire

Pôle de biologie

cvalat@med.univ-tours.fr

Ont également participé à la rédaction Jean-Benoît Corcuff (Département de Médecine Nucléaire et Université de BORDEAUX), Guylène Charrière (Laboratoire Biomnis, LYON), Agnès Georges (Département de Médecine Nucléaire, BORDEAUX), Marie-Pierre Moineau (CHU de BREST) et François Roux (CHU La Timone, MARSEILLE).

LES RELECTEURS

Arnaud AGIN, Dany ALCARAZ-GALVAIN, Yves BARBIER, Laurence BORDENAVE, Florence BOUX DE CASSON, Anne CHARRIÉ, Karim CHIKH, Guylène CHARRIÈRE, Richard COHEN, Jean-Benoît CORCUFF, Henri DECHAUD, Christine DEMANGEAT, Michèle d'HERBOMEZ, Yvonne FULLA, Odile GALLE-DELMAS, Agnès GEORGES, Anouk GIREME, Daniel HUE, Anne-Sophie GAUCHEZ, Isabelle LACROIX, Pierre-Jean LAMY, Catherine MASSART, Bruno MATHIAN, Marie-Pierre MOINEAU, Marie-Liesse PICKETTY, Jean-Marc RIEDINGER, François ROUX, Rémy SAPIN, Corinne SAULT, Jean-Claude SOUBERBIELLE, Chantal VALAT.

AVANT-PROPOS

Catherine MASSART

L'immunoanalyse connaît depuis quelques années un essor considérable dans des disciplines biologiques très variées. Quel que soit le domaine où il exerce, le biologiste va se retrouver confronté à la prochaine réforme de la biologie proposant notamment de renforcer le caractère médical de la discipline et les compétences des professionnels de santé, ainsi que d'optimiser les normes de qualité. Cet ouvrage souhaite aider le lecteur dans cette démarche pour lui apporter le complément scientifique nécessaire à un travail en symbiose avec la clinique et faire progresser une biologie de qualité tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué.

Le chapitre 1 regroupe les principes immunologiques essentiels à la compréhension de la réaction antigène-anticorps impliquée dans toute technique par immunoanalyse. Le chapitre 2 permet de prendre connaissance des différents immunodosages avec marqueurs associant un antigène, un anticorps et un troisième élément, le traceur, constitué d'un antigène ou d'un anticorps, couplé à un marqueur qu'il soit radioactif, enzymatique, fluorescent ou luminescent. Cette partie pédagogique s'adresse tout particulièrement aux étudiants des IUT, des instituts de recherche et des facultés de sciences, qu'elles soient techniques, médicales, pharmaceutiques, dentaires ou vétérinaires, leur permettant d'appréhender tout immunodosage de son concept théorique à sa mise en œuvre en pratique. Les pièges méthodologiques multiples qui sous-tendent en permanence l'immunoanalyse sont détaillés dans le chapitre 3. Cette partie doit être considérée comme le cœur de l'ouvrage pour tout biologiste futur ou confirmé, susceptible de pratiquer ce type de techniques, afin de faire progresser une biologie cohérente et de qualité. En effet, le lecteur prendra connaissance dans ce chapitre de tous les pièges et subtilités propres à ces techniques et pourra ainsi apprendre à les repérer et savoir y remédier. Ce chapitre est également destiné aux cliniciens de médecine générale ou de spécialités pour les sensibiliser aux difficultés de ces méthodes et à la nécessité d'un dialogue étroit avec le biologiste en cas de discordance de certains résultats avec la clinique lors du diagnostic ou du suivi des patients traités. L'émergence d'une biologie compétente sur le plan de la qualité se voit renforcée par les hautes autorités de santé. La mise en place de contrôles de qualité évoqués dans le chapitre 4 reste à l'heure actuelle une exigence primordiale pour tout laboratoire de routine confronté de plus en plus à une réglementation et à des directives française et européenne exposées dans le chapitre 5. Enfin les critères de choix analytique de techniques en fonction du paramètre biologique sont proposés en fin d'ouvrage, dans le chapitre 6. Ce chapitre est destiné tout particulièrement aux biologistes soumis à la remise en cause régulière du choix des réactifs

et des dosages face aux diverses offres qui leur sont proposées. Ils pourront ainsi choisir de façon raisonnée et adaptée leurs trousseaux et leur matériel d'immunoanalyse en fonction des forces et des faiblesses de chaque technologie, ainsi que des paramètres biologiques qu'ils souhaitent ou non doser par méthode automatisée.

Ce livre permet de réactualiser et de compléter l'ancien ouvrage¹, édité en 1988, qui n'est plus commercialisé. Il est le fruit d'une collaboration amicale avec les différents membres du Groupe de Biologie Spécialisé (GBS), constitué de biologistes issus de toute la France et chargés en tant que référents et experts de partager leur expérience et leur savoir-faire en immunoanalyse. Il convient d'y associer certains fournisseurs de réactifs qui ont participé à la relecture finale. Nous tenons tout particulièrement à remercier rédacteurs et relecteurs de nous avoir accordé le temps nécessaire à la réalisation optimale de l'ouvrage face à des exigences inhérentes notamment à la pluralité des auteurs.

1. Référence : *Les Immunodosages. De la théorie à la pratique*, ed. ACOMEN, 1988, ISBN 2-907794-00-0.

SOMMAIRE

Abréviations	10
Chapitre 1	
Bases immunologiques de la réaction antigène-anticorps	15
Chapitre 2	
Principes et techniques en immunoanalyse	39
Chapitre 3	
Problèmes et pièges en immunoanalyse	115
Chapitre 4	
Critères et contrôles de qualité	159
Chapitre 5	
Réglementation	185
Chapitre 6	
Critères de choix analytiques des principaux paramètres biologiques	219
Glossaire	257

Abréviations

AAHT : anticorps anti-hormone thyroïdienne.
ABTS : 2,2' azino di [3-éthyl-benzothiazoliny]-6-sulfonate d'ammonium].
Ac : anticorps.
Ac anti-R-TSH : anticorps antirécepteur de la TSH.
Ac anti-TPO : anticorps antithyroperoxydase.
ACE : Antigène CarcinoEmbryonnaire.
ACTH : Adréno Corticotrophic Hormone ou hormone adrénocorticotrope.
ACMIA : Antibody Conjugated Magnetic ImmunoAssay.
ADH : hormone antidiurétique ou vasopressine.
AFAQ : association française d'assurance qualité.
AFNOR : association française de normalisation.
AFP : alpha foetoprotéine.
AFSSAPS : agence française de sécurité sanitaire et produits de santé.
Ag : antigène.
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.
AMP : assistance médicale à la procréation.
AMPc : adénosine monophosphate cyclique.
AMPPD : ester d'adamantyl-1, 2-dioxétane phénylphosphate.
ANAES : agence nationale d'accréditation et evaluation en santé.
ANS : 8 analino- 1 naphtalène sulfonate de sodium.
ATA : American Thyroid Association.
BGP1 : biliaire glycoprotéine P1.
Bq : becquerel.
BLIA : BioLuminescence ImmunoAssay.
BVQI : Bureau Veritas Quality International.
CA : carbohydate antigen.
CA 125 : carbohydate antigen 125.
CA 15-3 : carbohydate antigen 15-3.
CA 19-9 : carbohydate antigen 19-9.
CCD : Charge-Coupled Device.
CEN : centre européen de normalisation.
CENELEC : Comité Européen de Normalisation Électrotechnique.
Ci : curie.
CL : chimiluminescence.
CLEIA : Chemiluminoenzymoimmunoassay.

CLIA : Chemiluminescence Immunoassay.
COFRAC : comité français d'accréditation.
CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.
cpm : coup par minute.
CTX : télépeptide C terminal.
DHEA : déhydroépiandrosterone.
DHEAS : sulfate de déhydroépiandrosterone.
DMDIV : dispositif médicaux de diagnostic in vitro.
dpm : désintégration par minute.
EC : Enzyme Commission.
ECCLS : comité européen des standards de laboratoires cliniques.
ECL : electrochimiluminescence.
ECLIA : ElectrochemiluminescenceImmunoassay.
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.
E2 : œstradiol.
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
ELFIA : Enzyme Linked Fluoroimmunoassay.
EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technique.
FDH : dysalbuminémie familiale hyperthyroxinémique.
FETIA : Fluoro Energy Transfert Immunoassay.
FIA : Fluoroimmunoassay.
FPIA : Fluorescence Polarization Immunoassay.
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer.
FSH : Follicle Stimulating Hormone ou hormone folliculostimulante.
GAD : glutamique acide décarboxylase.
GBEA : guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale.
GH : Growth Hormone ou hormone de croissance.
GICA : Gastro Intestinal Carbohydrate Antigen.
Gn-RH : Gonadotrophin Releasing Hormone.
HAMA : Human Anti-Mouse Antibody.
HAS : haute autorité de santé.
HBR : Heterophilic Blocking Reagent.
HBT : Heterophilic Blocking Tube.
HAT (milieu) : hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (milieu contenant).
hCG : Human Chorionic Gonadotrophine ou choriogonadotrophine humaine.
HGPRT : hypoxanthine guanidine phosphoryle transférase.
HOMA : Homeostasis Model Assessment.
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance.
HRP : Horse-Raifort Peroxydase.

25OH-D : 25 hydroxy vitamine D.

Hz : Herz.

IBMA : Immunobioluminometric Assay.

ICEMA : Immunochemiluminoenzymometric Assay.

ICIA : Ion Capture Enzyme Immunoassay.

ICMA : Immunochemiluminometric Assay.

IFMA : Immunofluorometric Assay.

ILMA : Immunoluminometric Assay.

Ig : immunoglobuline.

IGF : Insulin Growth Factor.

IGF BP : Insulin Growth Factor Binding Protein.

ipm : impulsion par minute.

IRMA : Immunoradiometricassay.

IRP : International Reference Preparation.

IS : International Standard.

ISO : organisation internationale de normalisation.

JOCE : journal officiel du Conseil européen.

JORF : journal officiel de la République française.

Kat : katal.

kDa : kilodalton.

keV : kilo électron Volt.

kUI : kilo international unit.

L : litre.

LABM : laboratoire d'analyse de biologie médicale.

LDCR : limite de détection de cancer résiduel.

LH : Luteinizing Hormone ou hormone lutéinisante.

LIA : Luminescentimmunoassay.

LNS : liaison non spécifique.

LOCI™ : Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay.

LPH : Lipotropic Hormone ou hormone lipémiant.

MEIA : Microparticule Enzyme Immunoassay.

mol : mole.

MSH : Mélano Stimulating Hormone ou hormone mélanostimulante.

NABM : nomenclature des actes de biologie médicale.

NABT : Non Specific Antibody Blocking Tube.

NCA : Non Specific Cross Reactive Antigen.

NFA : Normal Fecal Antigen.

NIBSC : National Institute for Biological Standards and Control.

NTX : Téloptide N Terminal.

NSE : Neurone Specific Enolase.

OMS : organisation mondiale de la santé.
OPD : o-phénylenediamine.
PAL : phosphatase alcaline.
PEG : polyéthylèneglycol.
PhIA : Phosphoroimmunoassay.
POMC : proopiomélanocortine.
PSA : Prostate Specific Antigen.
PSA libre : Prostate Specific Antigen libre.
PTH : parathormone.
PTH-rp : parathormone-related peptide.
RC : réaction croisée.
RFU : Relative Fluorescence Unit.
RIA : Radioimmunoassay.
RLU : Relative Luminescence Unit.
RM : Reference Materials.
RMP : Reference Measurement Procedures.
R-TSH : récepteur de la TSH.
SepFIA : Separation Fluoroimmunoassay.
SFBC : société française de biologie clinique.
SHBG : Sex Hormone Binding Globulin.
SI : Standard International.
SPA : Scintillation Proximity Assay.
TBG : Thyroid Binding Globulin.
TMB : 3, 3', 5, 5'-tétraméthyl-benzidine.
TRFIA : Time-Resolved Fluoroimmunoassay.
TRIFMA : Time-Resolved Immunofluorometric Assay.
TRH : Thyrotrophin Releasing Hormone ou thyroïlibérine.
TSH : Thyrostimulating hormone ou hormone thyroïstimulante ou thyroïstimuline.
T3 : Triiodothyronine.
T3L : Triiodothyronine Libre.
T4 : Thyroxine.
T4L : Thyroxine Libre
TPA : TripPropylAmine.
TRFIA : Time-Resolved Fluoroimmunoassay.
TRIFMA : Time-Resolved Immunofluorometric Assay.
TPO : Thyroperoxydase.
TUV : Technischer Überwachungs Verein.
UI : unité internationale.
WHO : World Health Organisation.

Bases immunologiques de la réaction antigène-anticorps

Auteurs : Pierre-Jean Lamy, Frédéric Montels

1. Les antigènes

1.1. Rappel immunologique

Les antigènes sont par définition des molécules naturelles ou synthétiques dont la reconnaissance spécifique par des anticorps ou par des cellules du système immunitaire provoque le déclenchement de la réponse immunitaire. Les antigènes sont le plus souvent des protéines, des glycoprotéines ou des polysaccharides.

L'épitope est la région de l'antigène reconnue de façon spécifique par les récepteurs membranaires des lymphocytes B (BCR) et des lymphocytes T (TCR).

1.1.1 Antigènes protéiques

Dans le cas d'un Ag protéique, l'épitope peut être :

- une séquence peptidique continue : l'épitope est dit séquentiel ;
- deux séquences peptidiques discontinues : l'épitope est dit conformationnel, lié à la structure de la protéine et donc sensible à la dénaturation.

Les lymphocytes B, ayant comme récepteur une immunoglobuline (Ig) de membrane, reconnaissent les épitopes séquentiels mais aussi les épitopes conformationnels des antigènes protéiques à l'état natif.

Par contre, les lymphocytes T ne reconnaissent pas les épitopes conformationnels des antigènes protéiques à l'état natif. Leur récepteur TCR ne reconnaît que des séquences peptidiques obtenues après protéolyse de l'Ag natif.

1.1.2 Antigènes polysaccharidiques

Les antigènes polysaccharidiques sont constitués par des séquences répétitives de cinq à six sucres en moyenne.

Le récepteur BCR des lymphocytes B reconnaît les épitopes des antigènes polysaccharidiques à l'état natif. Le caractère répétitif des séquences épitopiques permet une agrégation des récepteurs, dans une même région

membranaire des lymphocytes B, provoquant ainsi leur activation directe, sans intervention coopératrice des lymphocytes T.

Ces antigènes, non reconnus par les récepteurs TCR sont dits thymo-indépendants. Ils provoquent une réponse immune faible, sans production de cellules B mémoires, sans réponse secondaire et sans commutation épitopique entre Ig de classe M (IgM) et de classe G (IgG).

1.1.3 Haptènes

Les molécules de faible poids moléculaire sont antigéniques, c'est-à-dire capables de se lier à un anticorps, mais ne sont pas immunogènes, ce qui signifie qu'elles ne peuvent pas induire une réaction immunitaire aboutissant à la production d'anticorps. Ces molécules appelées haptènes (du grec *haptein*, lier) doivent nécessairement être couplées à des protéines ou des groupements glucidiques porteurs appelés « *carriers* » pour devenir immunogènes. Les *carriers* les plus utilisés sont l'hémocyanine, l'ovalbumine et l'albumine bovine. Des réactifs bi-fonctionnels, réagissant d'une part avec un groupement de l'haptène et d'autre part avec le *carrier*, assurent une jonction de type liaison covalente entre les deux.

1.2. Antigènes et immunodosages

Dans le cadre des immunodosages, les antigènes correspondent aux molécules à doser, à condition que l'on dispose des anticorps spécifiques de ces antigènes.

Ces molécules sont le plus souvent des macromolécules exprimant de nombreux épitopes différents. Ce qui est appelé « antigène » est donc en fait une mosaïque de déterminants antigéniques différents dont un ou deux seulement seront utilisés au cours de la réaction d'immunoanalyse. C'est pourquoi le terme d'analyte semble mieux indiqué, ou encore ligand lorsque le dosage fait appel à une méthode par liaison.

D'un point de vue technique, la concentration en antigène est déterminée au moyen d'une courbe d'étalonnage en comparant les signaux (désintégration radioactive, absorbance, luminescence, etc.) obtenus pour l'échantillon à doser avec les signaux de solutions de référence ou solutions étalon, de concentrations connues.

L'étude des antigènes doit donc être envisagée d'une part en tant qu'étalons dans une solution de référence, d'autre part en tant que molécules à doser (ou analytes), dans un échantillon biologique ou un échantillon de contrôle.

1.2.1 L'antigène en tant qu'étalon biologique

1.2.1.1 Les solutions étalon

Les solutions étalon utilisées au cours de chaque série de dosage permettent d'établir une courbe d'étalonnage et de déterminer ensuite la concentration de l'analyte dans les échantillons biologiques.

La validité d'un immunodosage repose donc sur deux critères d'identité :

- une identité de comportement entre l'analyte présent dans l'échantillon à doser et celui présent dans la solution étalon. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu réactionnel pouvant intervenir, il est souhaitable qu'il y ait une identité entre le milieu dans lequel est placé l'étalon et celui de l'échantillon biologique ;
- une identité de structure entre molécule étalon et molécule à doser ce qui est d'autant plus difficile à obtenir que la molécule est complexe.

Il est possible de vérifier l'identité de liaison par une épreuve de parallélisme : la courbe d'étalonnage est comparée à une courbe de dilution de l'échantillon dans les conditions propres de la réaction. Si les deux courbes ne sont pas parallèles (après transformation linéaire si nécessaire), l'identité n'est pas réalisée et l'étalon ne peut pas être utilisé dans les conditions données. Toutefois, si le parallélisme est essentiel pour la validité d'un dosage, il ne permet pas d'affirmer à lui seul l'identité de structure entre la molécule étalon et la molécule contenue dans l'échantillon.

1.2.1.2 Les étalons biologiques internationaux (1, 2)

Il est souhaitable que l'analyse d'une molécule par différents laboratoires conduise à des résultats comparables. Pour les substances biologiques dont la structure n'est pas complètement définie par des méthodes chimiques ou physiques, il est nécessaire de se référer à un étalon international.

Dans le cas de molécules de faible masse molaire et de structure bien définie (comme les médicaments, les hormones thyroïdiennes ou stéroïdes), il est facile de se procurer des préparations antigéniques étalon sous forme purifiée, et identiques d'un lot à l'autre. Les valeurs de concentrations peuvent alors être exprimées sous forme de concentration massique (masse en gramme ou sous-multiple par litre) ou de concentration molaire (mole ou sous-multiple par litre).

Dans le cas de molécules de masse molaire élevée et de structure complexe (comme les hormones glycoprotéiques ou les marqueurs tumoraux), les étalons sont obtenus par extraction à partir de liquides ou de tissus biologiques. L'identité de structure et donc l'identité antigénique est alors difficile à assurer, du fait de l'hétérogénéité métabolique (présence de nombreuses formes métaboliques) ou génétique (présence d'isoenzymes) de la substance considérée.

Pour ces molécules complexes, la préparation des étalons est confiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à des organismes experts, comme le National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), qui fournit la majorité des standards utilisés pour les immunodosages. Ces étalons de référence sont régulièrement répertoriés et publiés par l'OMS (3).

En dehors des caractéristiques d'identité, ces étalons doivent être disponibles en quantité suffisante pour répondre aux besoins des fabricants au moins dix ou quinze années. De plus, leur titre doit rester stable

au cours de leur conservation et de leur distribution. Pour éviter une perte trop importante d'activité, ces solutions sont traitées (bactériostatiques, antiprotéases...), réparties en fractions aliquotes lyophilisées, scellées sous azote et conservées à très basse température. Ces précautions permettent pour la plupart des étalons de l'OMS une perte d'activité biologique inférieure à 1 % par an.

Deux types de préparations peuvent être utilisées :

- l'« *International Standard* » (IS) qui est une préparation issue d'une étude collaborative à grande échelle entre des laboratoires utilisant des méthodes de dosage différentes ;
- l'« *International Reference Preparation* » (IRP), issue d'une étude à moins grande échelle et destinée spécifiquement aux immunodosages.

L'« *Unité Internationale* » (UI) est définie comme l'activité biologique contenue dans une masse définie d'IS ou d'IRP.

Pour la fabrication de leurs trousses, les fabricants utilisent des étalons dits « secondaires », calibrés par rapport aux différents IS ou IRP, permettant d'exprimer les concentrations de l'analyte en UI/L. La calibration des solutions étalon d'une trousse étant réalisée, par rapport à l'étalon international, avec des réactifs bien établis et dans des conditions précisées dans le protocole, la valeur nominale attribuée à ces étalons dans ces conditions peut s'avérer incorrecte avec une méthodologie et des réactifs différents.

Lorsqu'il n'existe pas de standard international disponible (comme c'est le cas actuellement pour la majorité des marqueurs tumoraux), l'absence de calibration par rapport à une telle préparation de référence augmente considérablement la variabilité entre les différentes techniques. Les concentrations d'analytes ne peuvent alors être exprimées qu'en « unités arbitraires ».

1.2.2 L'antigène en tant qu'analyte

1.2.2.1 Influence de la nature de l'échantillon

La molécule à doser peut se trouver sous différentes formes selon la nature du prélèvement et les conditions physicochimiques du milieu : pH, force ionique, concentration totale en protéines (albumine, ...) et en protéine liant l'analyte en particulier, comme par exemple la *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG), l'*Insulin Growth Facteur Binding Globulin* (IGF BP), etc.

Ces formes sont variables d'un milieu à un autre, modifiant la réaction entre la molécule et son anticorps. Par conséquent, un immunodosage mis au point pour une molécule et un milieu donné ne sera pas forcément directement applicable aux autres milieux.

1.2.2.2 Influence des conditions pré-analytiques

Le mode de prélèvement peut altérer la molécule à doser ou apporter des contaminants interférant avec la réaction. La présence d'anticoagulants et leur nature, la durée et la température de conservation du prélèvement, la

valeur du pH pour certains milieux, la nature du récipient (adsorption), la présence d'hémoglobine, etc. peuvent jouer un rôle.

Certaines molécules présentes à des concentrations différentes dans les milieux extra et intracellulaires et pouvant diffuser à travers la paroi globulaire nécessitent une séparation rapide des érythrocytes et du plasma. D'autres demandent une séparation préalable à leur dosage.

Si le dosage n'est pas réalisé rapidement, les conditions de conservation de l'échantillon peuvent modifier la structure de certaines molécules. C'est la raison pour laquelle doivent être déterminées ces conditions : température, addition de conservateurs ou d'agents chimiques protecteurs, pH, etc.

1.2.2.3 Hétérogénéité antigénique (4)

Les anticorps monoclonaux, largement utilisés aujourd'hui, étant spécifiques d'un épitope et non de la molécule entière, le dosage de molécules complexes et hétérogènes peut être pris en défaut :

- si l'épitope reconnu n'est pas exprimé ou n'est pas accessible ;
- si les épitopes présents ne sont pas reconnus par les anticorps utilisés du fait de l'existence de formes moléculaires variables ;
- si les mêmes épitopes sont communs à des formes moléculaires d'activité biologique différente.

Exemples :

- **La prolactine** : la forme moléculaire principale est monomérique mais circulent également des formes dimériques (« *big prolactin* ») et polymériques (« *big big prolactin* ») dont l'activité biologique reste à préciser.
- **LH** (*luteinizing hormone* ou hormone lutéinisante) : cette hormone, de nature glycoprotéique, se trouve dans la circulation sous plusieurs formes plus ou moins glycosylées parmi lesquelles certaines ne sont pas reconnues par les anticorps de certains immunodosages (LH « invisibles »).
- **PSA** (*prostate specific antigen*) : le PSA ou kallikréine hK3 se trouve dans la circulation sous forme libre et sous formes liées à des inhibiteurs circulants, essentiellement l' α_2 et l' α_1 -anti-chymotrypsine. La α_2 -macroglobuline formant un manchon et masquant les épitopes du PSA total, les dosages dits de PSA total ne prennent pas en compte les formes de PSA liées à la α_2 -macroglobuline, bien qu'elles représentent environ la moitié du PSA sanguin. La fraction de PSA dite libre comprend des formes moléculaires différentes (fractions clivées, variants de glycosylation) et des fragments de dégradation d'antigénicité variable.
- **hCG** (*human chorionic gonadotropin* ou choriogonadotrophine humaine) : l'hCG existe sous plusieurs formes circulantes (forme dimérique, sous-unités α et β libres, fragments de chaînes, variants de glycosylation) reconnues de manière variable en fonction des anticorps

Paratope : partie de l'anticorps qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène.

Phase hétérogène (Méthode en) : méthode nécessitant la séparation des complexes antigène-anticorps et des formes libres.

Phase homogène (Méthode en) : méthode de dosage ne nécessitant pas la séparation des complexes antigène-anticorps et des formes libres.

Phosphorescence : phénomène de photoluminescence caractérisé par une durée de vie longue des états excités.

Photoluminescence : phénomène provoqué par l'excitation lumineuse d'un luminophore. Fluorescence et phosphorescence sont deux types de photoluminescence.

Population de référence : ensemble de tous les individus répondant à des critères bien définis (le nombre d'individus la constituant est le plus souvent inconnu).

Précision : cf. **Fidélité**.

Quantile α (ou d'ordre α) de la distribution d'une concentration : concentration en deçà de laquelle la probabilité de trouver une valeur est égale à α (par exemple, la médiane est le quantile d'ordre 0,5).

Quenching : affaiblissement de l'intensité de luminescence d'une substance par les molécules environnantes (désexcitation non radiative et/ou absorption par le milieu).

Rendement de marquage : quantité de marqueur fixé sur la molécule à marquer, rapportée à la quantité totale de marqueur mise en jeu au cours de la réaction de marquage.

Répétabilité : étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande, mesurages effectués dans la totalité des mêmes conditions de mesure.

Reproductibilité interlaboratoires : qualité de l'accord, dans une zone définie de concentrations, entre des mesures répétées, effectuées dans différents laboratoires.

Sandwich (Méthode) : méthode de dosage immunométrique utilisant deux anticorps spécifiques complémentaires en excès, dont l'un est marqué et l'autre fixé sur une phase solide.

Site anticorps : partie de la molécule d'anticorps qui reconnaît le site antigénique.

Site antigénique : synonyme d'**épitope**.

Spécificité : la spécificité d'un anticorps pour un antigène est sa capacité à ne reconnaître que cet antigène.

Taux de marquage : nombre de moles de marqueur par mole d'antigène ou d'anticorps marqué.

Traceur : molécule marquée (antigène ou anticorps) utilisée dans les immunodosages.

Valeurs de référence : valeurs obtenues pour une variable biologique particulière sur les individus de l'échantillon de référence.