

# Dosage de la CDT, l'apport attendu de la standardisation

Si la CDT (carbohydre déficient transferrin) constitue le meilleur outil biologique d'aide au diagnostic de la consommation d'alcool, plusieurs freins n'ont pas permis à ce marqueur de véritablement s'imposer. Une de ces principales limites se trouve liée au manque de standardisation. La mise en place d'un groupe de travail IFCC (IFCC-WG-CDT) pourrait à terme permettre de résoudre ce problème. Ainsi, la définition d'un analyte et la proposition d'une méthode de référence ont déjà fait l'objet d'une publication (1). François Schellenberg\*, biologiste au laboratoire de biochimie de l'hôpital Trousseau à Tours, est membre de ce groupe de travail IFCC, il nous fait part de l'avancement des travaux réalisés et de leur intérêt.

**Spectra Biologie - A quel stade en sont rendus aujourd'hui les travaux concernant la standardisation du dosage de la CDT menés par le groupe de travail de l'IFCC?**

**François Schellenberg** - Une réunion du groupe de travail a été organisée durant la semaine du 4 juin dans le cadre d'Euromedlab à Amsterdam. Il en ressort aujourd'hui que l'analyte est défini, la méthode de référence également, et nous disposons désormais d'une ébauche d'étalon primaire répondant, a priori, aux attentes du groupe de travail. Pour ce qui est de l'évolution des travaux par rapport à ce qui a été publié en avril dernier (1), nous en sommes actuellement à vérifier que la méthode retenue constitue effectivement une méthode de référence et donc qu'elle peut être utilisée d'un laboratoire à un autre sans modification avec une variabilité très limitée. Plusieurs laboratoires ont pu tester cette méthode sur une série de premiers échantillons et les résultats ont présenté suffisamment de concordance pour pouvoir être acceptés. Nous disposons également maintenant d'un schéma de production d'un étalon primaire dont l'utilité sera de permettre aux industriels de préparer les étalons secondaires. Les premiers éléments d'information fournis concernant cet étalon paraissent satisfaisants. Les participants ont pu tester 5 niveaux de cet étalon en juillet, la première analyse des résultats montrait une homogénéité acceptable, que nous allons tenter d'améliorer.

**Spectra Biologie - Quel est le niveau d'utilisation de la CDT comme marqueur d'abus d'alcool en France?**

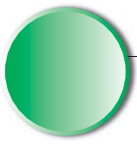
**François Schellenberg** - L'utilisation de ce marqueur se révèle en France beaucoup plus limitée que chez certains de nos voisins européens. A titre d'exemple, alors que la consommation d'actes de biologie n'est pas très différente en France et en Allemagne, le nombre d'analyses CDT réalisées dans l'hexagone ne représente qu'environ une dizaine de pour cent du total des analyses effectuées Outre-Rhin. Pourquoi cette analyse est-elle

moins prescrite et le dosage correspondant peu réalisé ? Il est vrai que l'inscription du test à la nomenclature est finalement assez récente ce qui a pu constituer un frein. Toutefois, deux éléments apparaissent selon moi peut-être plus déterminants. A la différence de leurs collègues d'autres pays, les médecins spécialisés en alcoologie, très majoritairement psychiatres, n'ont pas une culture clinico-biologique intégrant les outils biologiques d'aide au diagnostic. Les médecins de prévention et les généralistes, de leur côté, n'ont vraisemblablement pas bénéficié de la même qualité d'information que dans d'autres pays, notamment en raison de l'approche différente des leaders d'opinion que sont les spécialistes. Quant à nous, les biologistes, en général, nous n'avons peut-être pas assez communiqué auprès des prescripteurs sur ce que peut apporter notre discipline vis-à-vis de cette problématique. Dans la pratique, la mise en œuvre d'un examen peu prescrit, utilisant jusqu'à un passé tout récent des techniques consommatrices de temps et nécessitant éventuellement un investissement spécifique, se trouve naturellement défavorisée dans un pays caractérisé par un maillage très dense de laboratoires de taille plus modeste que chez la plupart de nos voisins européens. Le volume d'analyse étant faible, investir dans ce type d'activité apparaît donc hors propos pour la très grande majorité des biologistes. De fait, il ne doit exister, en France, qu'une poignée de laboratoires spécialisés traitant un volume d'analyses véritablement « conséquent », de 50 à 100 dosages par jour.

**Spectra Biologie - Pourriez-vous nous préciser les enjeux associés à la standardisation du dosage de la CDT ? Et les conséquences attendues suite aux travaux du groupe IFCC, peut-on mettre en parallèle ces travaux avec ceux qui ont été réalisés concernant le dosage de l'HbA1c?**

**François Schellenberg** - Le parallèle avec l'HbA1c a du sens, d'autant que le groupe de l'IFCC qui s'est chargé de l'HbA1c était piloté par

\*Laboratoire de biochimie – CHRU de Tours – Hôpital Trousseau – Avenue de la République – 37170 Chambray-lès-Tours



Jan-Olof Jeppsson (Hôpital universitaire de Malmö, Suède) qui est maintenant le doyen et le pilote du groupe CDT. Nos travaux bénéficient donc de ce qui a pu être réalisé au niveau de l' HbA1c et devraient profiter de cette expérience pour progresser plus rapidement. Pour bien cerner les enjeux associés, on doit se rappeler l'évolution et la diversité des modes d'expression des résultats au fil du temps, en mg/L, en unité/L, en % de transferrine, des modes d'expression pour chacun desquels des valeurs de référence différentes ont été à chaque fois définies. Cette hétérogénéité se révèle pénalisante pour les cliniciens, ceux-ci souhaitant bien naturellement n'avoir à mémoriser qu'un seul intervalle de référence pour un résultat exprimé dans une seule unité. Si l'on ajoute à cela les difficultés associées au suivi des patients dans la durée : l'impossibilité de changement de laboratoire ou encore l'incapacité à comparer aisément les résultats en cas de changement de technique et donc à déterminer l'évolution du patient,... on comprend que l'un des objectifs majeurs de la standardisation est bien d'obtenir une homogénéité de résultats. Cette homogénéité devrait, selon moi, être proche de ce que l'on peut aujourd'hui constater dans le domaine de l'immuno-analyse, un niveau très appréciable au regard de la situation actuelle. L'intérêt de tout notre travail est donc de disposer de toutes les références en matière de méthodologie et d'étalon primaire afin de pouvoir les fournir aux industriels.

**Spectra Biologie - Quelles ont été les actions menées par le groupe de travail de l'IFCC à ce niveau et quelles ont été les principales difficultés rencontrées dans le cadre de ces travaux ?**

**François Schellenberg** - Le groupe de travail fonctionne de façon collégiale, le pilote effectif du groupe, Anders Helander (Karolinska Institut, Stockholm, Suède), possède une très grande expérience dans le domaine des protéines et joue le rôle d'interface avec les industriels. En effet, afin de gagner du temps, notamment par rapport à ce qui a été réalisé par le groupe HbA1c, nous avons souhaité impliquer tous les industriels intéressés dès le début du projet. Les représentants de l'industrie sont donc tenus informés de l'avancement des recherches à chaque réunion du groupe de travail et peuvent exprimer leurs attentes concrètes vis-à-vis de ces travaux. Les difficultés de la standardisation sont liées notamment à l'hétérogénéité des méthodes. En effet, il existe des méthodes fondées sur la reconnaissance de charges électriques, techniques chromatographiques et électrophorétiques, qui sont caractérisées par des méthodes de détection différentes, la mesure de l'absorbance du complexe fer-transferrine en chromatographie liquide haute performance (CLHP) et l'absorbance de la liaison peptidique à 200 nm pour l'électrophorèse capillaire. A côté de cela, il existe également une méthode directe qui met en œuvre des anticorps spécifiques qui reconnaissent la structure de gly-

coformes de la transferrine. L'objectif initial étant de fournir un étalon primaire qui puisse être utilisé par l'ensemble des parties impliquées, la définition d'un analyte et d'un étalon primaire se devait d'être consensuelle.

**Spectra Biologie - Ces travaux ont abouti à la recommandation d'un analyte, la disialotransferrine, et d'une technique analytique la CLHP, quelles sont les principales raisons justifiant ces choix, notamment en regard d'autres méthodologies disponibles ?**

**François Schellenberg** - Concernant l'analyte, trois glycoformes de transferrine se trouvent augmentées en cas de consommation d'alcool. Parmi celles-ci, la disialotransferrine constitue la forme majeure, sa concentration basale se situe aux environs de 2 % et peut augmenter en cas de consommation d'alcool jusqu'à environ 30-35 %. Autre forme, la monosialotransferrine présente une concentration de base d'environ 0,1%, elle est généralement non quantifiable. Son élévation, quand elle existe, est très limitée et se trouve également liée aux variations des proportions d'autres glycoformes de transferrine. Ainsi, les augmentations de monosialotransferrine sont surtout observées chez les patients dont la concentration de trisialotransferrine est augmentée et qui consomment de l'alcool, ces augmentations ne dépassant pas les 1 % au grand maximum. La dernière fraction, l'asialotransferrine est à l'état basal aux environs de 0,1 % et non détectable, elle est augmentée avec la consommation d'alcool et, avec un effet de seuil, elle devient détectable quand la concentration de disialotransferrine atteint et dépasse deux fois la normale. Donc pour la partie la plus sensible de la standardisation, c'est à dire autour des valeurs de référence, il apparaît clairement qu'un seul analyte est mesurable : la disialotransferrine. De plus, sur un plan pratique, l'utilisation d'un étalon primaire contenant par exemple de l'asialotransferrine aurait été quelque peu difficile à gérer, avec la nécessité de réaliser une cascade d'étalons primaires avec des proportions variables des deux glycoformes (dénués d'asialotransferrine pour ceux dont l'activité est la plus basse et, à partir de certaines concentrations de disialotransferrine, additionnés de quantités croissantes d'asialotransferrine). Au final, concernant la définition de l'analyte de base, celui-ci sera constitué d'une transferrine avec une chaîne glycanique terminée par deux acides sialiques. La notion de chaîne va être réintroduite dans la définition de l'analyte de base.

Quant au choix de la technique de référence nous avons commencé à aborder ce point à Orlando, en juillet 2005, dès la première réunion du groupe de travail. La comparaison des différentes techniques disponibles a permis d'identifier assez rapidement les critères clés qui devaient caractériser la méthode de référence. Premier point, le groupe de travail s'est prononcé pour une méthode qui permette de doser les glycoformes de transferrine et qui ne soit pas liée à un industriel donné.

Quatre méthodes pouvaient potentiellement être mises en œuvre : la chromatographie d'échange d'ions sur microcolonne, une méthode directe fondée sur la néphélométrie, la CLHP et l'électrophorèse capillaire (EC). La chromatographie d'échange d'ions sur microcolonne a été rapidement écartée car elle présente une précision acceptable en routine mais peu satisfaisante pour une méthode de référence, elle est sensible à certaines contaminations et ne permet pas la visualisation des fractions. Par ailleurs, même si la fabrication de microcolonne est envisageable au laboratoire, la technique est largement « industriel dépendante » avec des colonnes spécifiques des différents fabricants. La méthode directe par néphélométrie a également été éliminée pour des raisons du même ordre. Certes sa qualité analytique est nettement supérieure à la chromatographie sur microcolonne, toutefois elle est totalement dépendante des anticorps fournis par le fabricant qui l'a développée et ne constitue pas une méthode descriptive. Il restait donc la CLHP et l'EC. Finalement le choix s'est porté sur la CLHP, une technique à la fois descriptive et la plus spécifique grâce à la mesure de l'absorbance du complexe fer-transferrine à 460 nm. La seule interférence rencontrée est liée à des hémolyses importantes, toutefois, qu'une méthode de référence ne soit pas applicable à des échantillons hémolysés à plus de 2 g/L ne constitue pas un problème majeur. Dans le cas de l'EC la mesure de la CDT consiste à « faire un zoom » sur la zone des Béta2globulines et à réaliser une mesure des protéines. Or cette approche peut être entachée d'anomalies associées à la présence de chaînes légères libres ou d'immunoglobulines entières.

Une démonstration d'électrophorèse bidimensionnelle a également permis de souligner que l'EC offrait moins de garantie que la CLHP au niveau spécificité.

**Spectra Biologie - La CLHP est qualifiée de « méthode de référence provisoire » dans l'attente de la mise à disposition d'une méthode fondée sur la spectrométrie de masse (SM). Quels avantages supplémentaires apportera la spectrométrie de masse et à quel horizon pourrait-on voir cette méthode publiée ?**

**François Schellenberg -** Pour le groupe de travail, l'intérêt de mettre en œuvre la spectrométrie de masse repose sur la précision que cette technique pourrait apporter au niveau de la définition de l'analyte. La transferrine présente plusieurs niveaux d'hétérogénéité. Il existe notamment deux sites de glycolysations l'un en position 413 et l'autre en 611. Or, on ignore encore lorsque la CDT augmente, si la perte de la chaîne glycanique se fait de façon aléatoire ou plutôt de façon préférentielle sur l'un ou l'autre de ces deux sites. La spectrométrie de masse sera mise en œuvre afin d'élucider ce point. Ceci nous permettra de disposer d'informations utiles au développement d'autres méthodes, comme par exemple la nature de la molécule vis-à-vis de laquelle cibler l'affinité d'un anticorps. Pour l'heure, les résultats obtenus par les membres du groupe de travail qui mettent en œuvre la SM sont satisfaisants au niveau qualitatif, mais doivent encore être significativement améliorés au niveau quantitatif. Je ne pense pas qu'on aura de méthode en SM avant la fin du groupe de travail c'est à dire à l'horizon de la fin 2008.

(1) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferrin (IFCC-WG-CDT) : JEPPSSON JO, ARNDT T., SCHELLENBERG F., WIELDERS JPM, ANTON RF, WHITFIELD JB & HELANDER A., Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, 45(4), 558-562.