



HAL
open science

Mise en évidence d'une macrocréatine kinase induite par la prise de ténofovir : de l'analyse des résultats de l'étude clinico-biologique nancéienne à la mise en place d'une enquête de pratique professionnelle nationale

Anthony Leon

► To cite this version:

Anthony Leon. Mise en évidence d'une macrocréatine kinase induite par la prise de ténofovir : de l'analyse des résultats de l'étude clinico-biologique nancéienne à la mise en place d'une enquête de pratique professionnelle nationale. Sciences pharmaceutiques. 2013. hal-01734128

HAL Id: hal-01734128

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734128v1>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2013**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 29 octobre 2013

Par Anthony LEON
Né le 18 octobre 1986 à Remiremont (88)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**Mise en évidence d'une macrocréatine kinase induite par la prise
de ténofovir :**

**de l'analyse des résultats de l'étude clinico-biologique nancéienne à la mise en place
d'une enquête de pratique professionnelle nationale.**

Membres du Jury

Président : Monsieur le Professeur J.Y Jouzeau

Juges : Monsieur le Professeur J.L Guéant
Monsieur le Professeur T May
Madame le Docteur I Aimone-Gastin (Directeur)

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2012-2013

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL/Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|--------------------------------|----|--|
| Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ | 82 | Thérapie cellulaire |
| Chantal FINANCE | 82 | Virologie, Immunologie |
| Jean-Yves JOUZEAU | 80 | Bioanalyse du médicament |
| Jean-Louis MERLIN | 82 | Biologie cellulaire |
| Alain NICOLAS | 80 | Chimie analytique et Bromatologie |
| Jean-Michel SIMON | 81 | Economie de la santé, Législation pharmaceutique |

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | | |
|-------------------------------|----|--|
| Jean-Claude BLOCK | 87 | Santé publique |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | 86 | Pharmacologie |
| Raphaël DUVAL | 87 | Microbiologie clinique |
| Béatrice FAIVRE | 87 | Biologie cellulaire, Hématologie |
| Pascale FRIANT-MICHEL | 85 | Mathématiques, Physique |
| Christophe GANTZER | 87 | Microbiologie |
| Pierre LABRUDE | 86 | Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile |
| Isabelle LARTAUD | 86 | Pharmacologie |
| Dominique LAURAIN-MATTAR | 86 | Pharmacognosie |
| Brigitte LEININGER-MULLER | 87 | Biochimie |
| Pierre LEROY | 85 | Chimie physique |
| Philippe MAINCENT | 85 | Pharmacie galénique |
| Alain MARSURA | 32 | Chimie organique |
| Patrick MENU | 86 | Physiologie |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | 86 | Chimie thérapeutique |
| Bertrand RIHN | 87 | Biochimie, Biologie moléculaire |

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|-----------------|----|---|
| Béatrice DEMORE | 81 | Pharmacie clinique |
| Julien PERRIN | 82 | Hématologie biologique |
| Marie SOCHA | 81 | Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique |
| Nathalie THILLY | 81 | Santé publique |

MAITRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|-------------------|----|---------------------------------------|
| Sandrine BANAS | 87 | Parasitologie |
| Mariette BEAUD | 87 | Biologie cellulaire |
| Emmanuelle BENOIT | 86 | Communication et Santé |
| Isabelle BERTRAND | 87 | Microbiologie |
| Michel BOISBRUN | 86 | Chimie thérapeutique |
| François BONNEAUX | 86 | Chimie thérapeutique |
| Ariane BOUDIER | 85 | Chimie Physique |
| Cédric BOURA | 86 | Physiologie |
| Igor CLAROT | 85 | Chimie analytique |
| Joël COULON | 87 | Biochimie |
| Sébastien DADE | 85 | Bio-informatique |
| Dominique DECOLIN | 85 | Chimie analytique |
| Roudayna DIAB | 85 | Pharmacie galénique |
| Natacha DREUMONT | 87 | Biologie générale, Biochimie clinique |
| Joël DUCOURNEAU | 85 | Biophysique, Acoustique |

| ENSEIGNANTS (suite) | <i>Section CNU*</i> | <i>Discipline d'enseignement</i> |
|----------------------------|---------------------|--|
| Florence DUMARCAY | 86 | <i>Chimie thérapeutique</i> |
| François DUPUIS | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Adil FAIZ | 85 | <i>Biophysique, Acoustique</i> |
| Luc FERRARI | 86 | <i>Toxicologie</i> |
| Caroline GAUCHER-DI STASIO | 85/86 | <i>Chimie physique, Pharmacologie</i> |
| Stéphane GIBAUD | 86 | <i>Pharmacie clinique</i> |
| Thierry HUMBERT | 86 | <i>Chimie organique</i> |
| Frédéric JORAND | 87 | <i>Environnement et Santé</i> |
| Olivier JOUBERT | 86 | <i>Toxicologie</i> |
| Francine KEDZIEREWICZ | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Alexandrine LAMBERT | 85 | <i>Informatique, Biostatistiques</i> |
| Faten MERHI-SOUSSI | 87 | <i>Hématologie</i> |
| Christophe MERLIN | 87 | <i>Microbiologie</i> |
| Blandine MOREAU | 86 | <i>Pharmacognosie</i> |
| Maxime MOURER | 86 | <i>Chimie organique</i> |
| Coumba NDIAYE | 86 | <i>Epidémiologie et Santé publique</i> |
| Francine PAULUS | 85 | <i>Informatique</i> |
| Christine PERDICAKIS | 86 | <i>Chimie organique</i> |
| Caroline PERRIN-SARRADO | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Virginie PICHON | 85 | <i>Biophysique</i> |
| Anne SAPIN-MINET | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |
| Marie-Paule SAUDER | 87 | <i>Mycologie, Botanique</i> |
| Gabriel TROCKLE | 86 | <i>Pharmacologie</i> |
| Mihayl VARBANOV | 87 | <i>Immuno-Virologie</i> |
| Marie-Noëlle VAULTIER | 87 | <i>Mycologie, Botanique</i> |
| Emilie VELOT | 86 | <i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i> |
| Mohamed ZAIYOU | 87 | <i>Biochimie et Biologie moléculaire</i> |
| Colette ZINUTTI | 85 | <i>Pharmacie galénique</i> |

PROFESSEUR ASSOCIE

| | | |
|--------------------|----|-------------------|
| Anne MAHEUT-BOSSER | 86 | <i>Sémiologie</i> |
|--------------------|----|-------------------|

PROFESSEUR AGREGE

| | | |
|--------------------|----|----------------|
| Christophe COCHAUD | 11 | <i>Anglais</i> |
|--------------------|----|----------------|

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

Remerciements

A notre président de jury

Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU
Professeur des Universités, Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et
Physiopathologie Articulaire – UMR 7365, Université de Lorraine,
Faculté de Pharmacie de Nancy
Praticien Hospitalier au laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie,
Hôpital Central, CHRU de Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de mon jury.

*Veillez trouver ici l'expression de ma
gratitude et de mon profond respect.*

A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Isabelle AIMONE-GASTIN
Maître de Conférence, Laboratoire de Biochimie – UMR 954
INSERM, Faculté de Médecine de Nancy – Université de Lorraine
Praticien Hospitalier au laboratoire de Biochimie, Biologie
Moléculaire, Nutrition et Métabolisme, Hôpital de Brabois, CHRU de
Nancy

*Je vous remercie de m'avoir guidé tout au long de ce travail.
Vous avez été pour moi une parfaite directrice de thèse, impliquée,
disponible, mais également capable de m'écouter et me conseiller.*

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A nos juges

Monsieur le Professeur Jean-Louis GUEANT
Professeur des Universités, Laboratoire de Biochimie – UMR 954
INSERM, Faculté de Médecine de Nancy – Université de Lorraine
Praticien Hospitalier au laboratoire de Biochimie, Biologie
Moléculaire, Nutrition et Métabolisme, Hôpital de Brabois, CHRU de
Nancy

Vous me faites l'honneur de juger ce travail effectué au sein de votre service.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et le témoignage de mes remerciements sincères.

Monsieur le Professeur Thierry MAY
Professeur des Universités, Maladies Infectieuses et Tropicales à la
Faculté de Médecine de Nancy - Université de Lorraine
Praticien Hospitalier dans le service Maladies Infectieuses et
Tropicales, Hôpital de Brabois, CHRU de Nancy

Vous avez bien voulu m'honorer de votre présence dans ce jury de mémoire.

Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A l'ensemble de l'équipe technique et biologique du laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme du CHRU de Nancy et particulièrement à Sylvie pour son aide précieuse.

Au bureau et conseil d'administration de la Société Française de Biologie Clinique pour leur soutien, ainsi qu'à l'ensemble des membres pour avoir participé à l'enquête de pratique.

A Lucile, Elise, Marie, Lucille et Cynthia pour leur lecture attentive de ce manuscrit et leurs remarques pertinentes.

A mes parents, pour leur soutien durant toutes mes études.

A Audrey et Florian qui sont toujours présents à mes côtés.

A mes co-internes :

les « vieux » qui m'ont soutenu au début de mon internat,
les « jeunes » avec qui j'ai eu le plaisir de travailler,
ainsi que Sylvain et les autres membres des bureaux de la
FNSIP.

A mes amies de la faculté.

A mes amis.

Aux différents biologistes et personnels des laboratoires qui m'ont transmis leurs savoirs et donné l'envie de persévérer dans cette discipline passionnante.

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Listes des abréviations | 15 |
| Listes des figures | 17 |
| Listes des tableaux | 19 |
| INTRODUCTION..... | 20 |
| I Interférences analytiques..... | 22 |
| I.1 Principes des interférences analytiques en biochimie | 23 |
| I.2 Interférences courantes en biochimie | 24 |
| I.3 Interférences provoquées par les médicaments | 26 |
| I.3.1 Interférences directes..... | 27 |
| I.3.2 Interférences indirectes | 28 |
| I.4 Les interférences en enzymologie | 29 |
| I.4.1 Erreurs courantes de dosage | 29 |
| I.4.2 Défaut de spécificité de la réaction enzymatique..... | 31 |
| I.4.3 Interférences provoquées par les macroenzymes | 32 |
| II Généralités sur les macroenzymes | 35 |
| II.1 Propriétés biochimiques | 37 |
| II.1.1 Macroenzymes de type 1 | 37 |
| II.1.1.1 Une liaison enzyme-anticorps anti-enzyme spécifique..... | 37 |
| II.1.1.2 Des anticorps anti-enzyme de nature et de spécificités variables | 37 |
| II.1.1.3 Deux théories avancées pour expliquer les mécanismes de formations de ces anticorps (37)..... | 38 |
| II.1.2 Macroenzymes de type 2 | 39 |
| II.1.2.1 Macro créatine kinase..... | 39 |
| II.1.2.2 Macro enzymes du système hépatobiliaire..... | 40 |
| II.1.2.3 Macroamylase | 40 |
| II.2 Méthodes de détection et d'analyse des macroenzymes | 41 |
| II.2.1 Ultrafiltration (UF)..... | 42 |
| II.2.2 Précipitation par le Polyéthylène Glycol (PEG) | 44 |
| II.2.3 L'électrophorèse séparative..... | 47 |
| II.2.4 Immunoprécipitation | 48 |

| | | |
|-----------|---|----|
| II.2.5 | Chromatographie d'exclusion stérique..... | 49 |
| II.2.6 | Autres méthodes..... | 52 |
| II.3 | Impact clinique de la présence de macroenzyme..... | 53 |
| II.3.1 | Impact clinique des interférences analytiques dues aux macroenzymes..... | 53 |
| II.3.2 | Macroenzymes de type 1..... | 55 |
| II.3.3 | Macroenzyme de type 2..... | 59 |
| II.3.3.1 | Macrocréatine Kinase..... | 59 |
| II.3.3.2 | Macroenzymes du système hépatobiliaire (GGT, PAL et leucine aminopeptidase)..... | 60 |
| II.3.3.3 | Macroamylases..... | 60 |
| III | Mise en évidence d'une macroenzyme liée aux médicaments..... | 61 |
| III.1 | Objectif de l'étude..... | 62 |
| III.2 | Matériels et méthodes..... | 62 |
| III.2.1 | Description de la population..... | 62 |
| III.2.2 | Techniques biochimiques utilisées..... | 63 |
| III.2.2.1 | Dosage des CK totales..... | 63 |
| III.2.2.2 | Dosage des CK-MB..... | 63 |
| III.2.2.3 | Dosage des troponines Ic..... | 64 |
| III.2.2.4 | Electrophorèse des isoenzymes des CK..... | 65 |
| III.3 | Résultats..... | 66 |
| III.3.1 | Résultats biochimiques..... | 66 |
| III.3.2 | Conclusion biologique..... | 67 |
| III.3.3 | Exploitations des données cliniques et thérapeutiques..... | 69 |
| III.3.4 | Analyse de 557 dossiers clinico-biologiques des patients infectés par le VIH et estimation de la prévalence des macroCK2 dans cette population..... | 70 |
| III.4 | Discussion..... | 73 |
| IV | Enquête sur les connaissances concernant les macroenzymes..... | 76 |
| IV.1 | Construction du questionnaire..... | 77 |
| IV.1.1 | Définition des objectifs..... | 77 |
| IV.1.2 | Les biologistes participants : données descriptives..... | 78 |
| IV.1.3 | Modalités d'envoi du questionnaire et du recueil des données..... | 78 |
| IV.1.4 | Choix du sujet du cas clinique..... | 79 |
| IV.2 | Compte rendu de l'enquête..... | 80 |
| IV.2.1 | Données démographique..... | 80 |

| | | |
|----------|--|-----|
| IV.2.2 | Cas clinico-biologique : dossier clinique | 83 |
| IV.2.2.1 | Conduite à tenir face à la découverte d'une hypertransaminémie | 83 |
| IV.2.2.2 | Etiologies à explorer face à une hypertransaminémie chronique..... | 86 |
| IV.2.2.3 | Conclusion du cas clinique..... | 89 |
| IV.2.3 | Cas clinico-biologique : exploration d'une interférence analytique | 89 |
| IV.2.3.1 | Erreurs analytiques pouvant être mises en cause | 89 |
| IV.2.3.2 | Démarches effectuées par les laboratoires en présence de cette interférence 90 | |
| IV.2.3.3 | Utilité de l'identification de l'interférence..... | 91 |
| IV.2.3.4 | Techniques utilisées pour mettre en évidence les macroenzymes | 92 |
| | CONCLUSION | 96 |
| | BIBLIOGRAPHIE..... | 97 |
| | ANNEXES | 108 |

Listes des abréviations

| | |
|-----------|--|
| A1AT | Alpha-1 antitrypsine |
| Ac | Anticorps |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| Ag | Antigène |
| ALAT | Alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2) |
| ASAT | Aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1) |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CDT | Transferrine carbodéficente - Transferrine désialylée |
| CHRU | Centre Hospitalier Régional et Universitaire |
| CK | Créatine kinase (EC 2.7.3.2) |
| CK-B | sous-unité B de la créatine kinase |
| CNIL | Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés |
| CSP | Code de la Santé Public |
| cTn | Isoforme cardiaque des troponines |
| DPC | Développement Professionnel Continu |
| EAL | Exploration d'une anomalie lipidique |
| EFV | Efavirenz |
| Fab | Fragment variable de l'immunoglobuline |
| FTC | Emtricitabine |
| GGT | Gamma-glutamyltransférase (EC 2.3.2.2) |
| HAS | Haute Autorité de Santé |
| HMG-CoA | Hydroxy-méthyl-glutaryl Coenzyme A |
| IFCC | International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgA | Immunoglobuline A |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IgM | Immunoglobuline M |
| IRC | Insuffisance rénale chronique |
| LBM | Laboratoire de biologie médicale |
| LDH | Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27) |
| macroALAT | Macroalanine aminotransférase |
| macroASAT | Macroaspartate aminotransférase |
| macroCK | Macrocréatine kinase |
| macroCK1 | Macrocréatine kinase de type 1 |
| macroCK2 | Macrocréatine kinase de type 2 |
| macroLDH | Macrolactate déshydrogénase |
| macroPAL | Macrophosphatase alcaline |
| macroPRL | Macroprolactine |
| MDRD | Modification of Diet in Renal Disease |

| | |
|----------|--|
| MEφ | Mobilité électrophorétique |
| MICI | Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin |
| MM | Masse moléculaire |
| MMr | Masse moléculaire relative |
| MtCK | Créatine kinase mitochondriale |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| PAL | Phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1) |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| Rs | Rayon de Stockes |
| SFBC | Société Française de Biologie Clinique |
| sMtCK | Créatine kinase mitochondriale sarcomérique |
| TAT | Turnaround time |
| TBG | Thyroid binding globulin |
| TDF | Ténofovir |
| TnC | Troponine C |
| TnI | Troponine I |
| TnT | Troponine T |
| UF | Ultrafiltration |
| uMtCK | Créatine kinase mitochondriale ubiquitaire |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| χ^2 | Chi 2 |

Listes des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Principe de dosage en immunoanalyse par une méthode compétitive (A) et non compétitive immunométrique (B). | 27 |
| Figure 2 : Formules chimiques de la triiodothyronine (A) et du diclofénac (B). | 28 |
| Figure 3 : Cinétique d'une réaction enzymatique | 30 |
| Figure 4 : Schéma de compétition entre deux substrats pour une même enzyme et équation de Michaelis-Menten..... | 31 |
| Figure 5 : Schéma d'un tube à ultrafiltration | 42 |
| Figure 6 : Principe de l'ultrafiltration dans le cas de la mise en évidence de macroenzymes . | 43 |
| Figure 7 : Formule chimique du polyéthylène glycol | 44 |
| Figure 8 : Principe de la précipitation par le PEG dans le cas de la mise en évidence de macroenzymes | 45 |
| Figure 9 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique | 49 |
| Figure 10 : Principe de la séparation des enzymes par chromatographie d'exclusion dans le cas de la mise en évidence de macroenzymes..... | 51 |
| Figure 11 : Principe de la mesure de l'activité CK. | 63 |
| Figure 12 : Profil de migration des isoenzymes des CK..... | 65 |
| Figure 13 : Electrophorèse des iso-CK chez les patients étudiés..... | 66 |
| Figure 14 : Principe du dosage des CK-MB par immunoinhibition et de l'interférence analytique provoquée par les macroenzymes..... | 68 |
| Figure 15 : Formule chimique du ténofovir et du tenofovir disoproxil fumarate (forme orale du ténofovir)..... | 73 |
| Figure 16 : Répartition des participants par spécialités..... | 81 |
| Figure 17 : Répartition des participants à l'enquête en fonction de leur lieu d'exercice | 81 |
| Figure 18 : Répartition des automates utilisés par les participants | 82 |
| Figure 19 : Démarche des participants à l'enquête lors d'une augmentation isolée des ASAT. | 84 |
| Figure 20 : Réponses des participants à la question 2 : Etiologies supprimées après la réalisation du bilan de contrôle | 86 |
| Figure 21 : Réponses des participants à la question 3 : Répartition de la principale étiologie à explorer après le bilan de contrôle | 87 |

| | |
|---|----|
| Figure 22 : Conduite adoptée par les participants lors de la recherche d'une macroenzyme .. | 91 |
| Figure 23 : Répartition des participants en fonction de leur avis sur l'utilité des explorations complémentaires..... | 92 |
| Figure 24 : Techniques de dépistage proposées par les biologistes. | 93 |

Listes des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Résumé des principales variations biochimiques induites par la prise de médicaments..... | 26 |
| Tableau 2 : Principales macroenzymes de type 1 et les isotypes impliqués (39,59,60)..... | 38 |
| Tableau 3 : Principales macroenzymes de type 2 et leurs mécanismes de formation (39,59) . | 41 |
| Tableau 4 : Effet de la précipitation par la PEG 6000 sur différentes molécules d'après Davidson et Watson (85)..... | 46 |
| Tableau 5 : Les pathologies observées lors de la découverte d'une macroenzyme, d'après Galasso <i>et al.</i> (120)..... | 57 |
| Tableau 6 : Macroenzymes de type 1 : lien avec les pathologies et prévalence (53,59,107,123,132–134). | 58 |
| Tableau 7 : Synthèse des différents dosages et quantification des macroCK2 par électrophorèse..... | 67 |
| Tableau 8 : Résumé des caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients présentant une macroCK2 | 69 |
| Tableau 9 : Répartition des patients en fonction de la prise de ténofovir et des activités CK totale et CK-MB. | 71 |
| Tableau 10 : Résultats des tests de χ^2 : valeurs calculés et théoriques pour chaque test effectué | 72 |
| Tableau 11 : Répartition des participants en fonction des classes d'âge | 80 |
| Tableau 12 : Erreurs analytiques suspectés par les participants (nombre de réponses). | 89 |
| Tableau 13 : Comparaison des techniques de dépistage selon que les LBM effectuent l'exploration <i>in situ</i> ou pas..... | 93 |

INTRODUCTION

La mise en évidence d'une interférence analytique n'est pas toujours chose aisée pour le biologiste. Certaines de ces interférences, telles que l'hémolyse, l'ictère ou la lipémie, sont connues et facilement détectables. D'autres, en revanche, ne sont pas décelées par les systèmes de détections automatiques. Dans ces derniers cas, c'est en confrontant les résultats biologiques, entre eux ou avec le contexte clinique, que l'on est amené à suspecter la présence d'une interférence.

Certaines techniques analytiques permettent de mettre en évidence la présence d'une substance interférente. En revanche, pour identifier la substance en cause, un examen approfondi du dossier clinico-biologique est inévitable. Les médicaments sont une cause probablement fréquente d'interférence analytique mais leur imputabilité reste difficilement démontrable.

Lors de notre pratique, nous avons été confrontés à une interférence médicamenteuse portant sur les dosages des activités créatines kinases (CK) et de l'iso-forme CK-MB. L'absence de troubles cardiaques biologiques et cliniques a fait suspecter la présence d'une interférence lors de la réalisation de ces dosages. Les explorations biologiques effectuées ont permis de mettre en évidence la présence d'une macroenzyme (la macrocréatine kinase) dans le plasma des patients à l'origine de l'interférence. L'apparition de cette macromolécule semble liée à la prise du ténofovir.

Les biologistes médicaux sont les premiers et bien souvent les seuls praticiens de santé à pouvoir suspecter la présence de macroenzyme, cause rare d'interférence, et donc à pouvoir stopper les explorations complémentaires effectuées pour expliquer les discordances clinico-biologiques. Pour ce faire, ils doivent être sensibilisés à la présence éventuelle de cette interférence et connaître les techniques usuelles de mise en évidence des macroenzymes. Ces différents constats ont été le point de départ d'une enquête nationale réalisée auprès des biologistes médicaux hospitaliers et libéraux. Cette dernière a pu être réalisée grâce au soutien de la Société Française de Biologie Clinique. Ce travail était surtout l'occasion de rappeler le rôle des biologistes dans la mise en évidence des macroenzymes. Aucune recommandation ne définissant la conduite à tenir pour dépister ces macromolécules, nous avons souhaité relever les techniques utilisées par les laboratoires participants. Les résultats obtenus, ainsi qu'une étude des travaux parus dans la littérature, nous ont permis de proposer une conduite à tenir pour dépister les macroenzymes.

Le premier chapitre de ce document est un rappel de la notion d'interférence en biochimie, suivi d'un point sur les interférences médicamenteuses. Un focus sur les interférences dans le domaine de l'enzymologie conclut cette partie.

Une seconde partie bibliographique fait un point sur les macroenzymes. Nous abordons successivement leurs structures biochimiques, les méthodes de détection utilisées ainsi que leurs impacts cliniques.

Notre étude proprement dite est exposée dans le chapitre suivant. Les explorations biochimiques effectuées menant à la mise en évidence de la macroenzyme sont détaillées ainsi que l'étude des dossiers clinico-biologiques conduisant à l'imputabilité d'un médicament.

Pour conclure, nous rapportons les résultats de l'enquête de pratiques professionnelles menée auprès de nos collègues biologistes. Sa conception, sa mise en place ainsi que les résultats obtenus sont détaillés et commentés. Enfin, des conseils sont proposés pour aider les biologistes à mettre en place le dépistage des macroenzymes.

I Interférences analytiques

I.1 Principes des interférences analytiques en biochimie

Kroll et Elin définissent **une interférence analytique** comme étant : « **l'effet d'une substance** présente dans un échantillon **modifiant les résultats exacts**, habituellement exprimés en concentration ou activité, **pour un analyte** » (1).

Les modifications biologiques dues à la prise d'un xénobiotique **ou les erreurs analytiques sont donc exclues** de cette définition.

Les évolutions biologiques induites par certaines molécules qui modulent les concentrations *in vivo* des analytes, doivent être prises en compte lors de l'interprétation, mais ne sont pas des incidents analytiques.

De même, il est nécessaire de distinguer les interférences des erreurs analytiques dues aux limites de la méthode. Par exemple, lorsque des concentrations très importantes d'un analyte sont présentes, il est probable que la mesure effectuée soit prise en défaut. C'est le principe de l'effet crochet en immunoanalyse, ou encore de l'épuisement de substrat en enzymologie. Le point commun avec les erreurs analytiques et les interférences pour le biologiste est la conduite à tenir dans sa pratique quotidienne : il doit dans les deux cas mettre en place des mesures adaptées pour pouvoir s'en affranchir (dilution, augmentation de la prise d'essai, changement de gamme de calibration).

Lors de la mise en place ou de la commercialisation d'un test de diagnostic *in vitro*, un nombre restreint d'interférences sont évaluées. Le biologiste doit garder un regard critique sur les données fournies dans les fiches techniques et considérer qu'il s'agit « d'éléments incomplets » ou « *a priori* incomplets ».

Les interférences les plus couramment appréciées sont les effets de l'hémolyse, de l'ictère, de la lipémie, ainsi que les effets des additifs contenus dans les tubes de prélèvement. Par exemple, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) utilisé comme anticoagulant est un chélateur ionique notamment du calcium et du zinc (lesquels sont nécessaires aux enzymes utilisées lors des dosages).

Plusieurs modalités sont possibles pour mettre en évidence ces interférences (2,3) :

- On peut **comparer** l'effet d'une substance sur un dosage en le confrontant à **une autre technique**, utilisant un principe différent ou ne présentant pas les mêmes caractéristiques (enzymes, anticorps différents). L'idéal est d'effectuer une comparaison avec une technique de référence n'interférant pas avec la substance étudiée. Pour pouvoir interpréter la différence observée, une étude de corrélation réalisée au préalable entre ces méthodes est indispensable.
- Des **dilutions en série** sont envisageables, une rupture de linéarité permettra de soupçonner la présence d'une interférence.
- Dans le même principe, on peut effectuer un **mélange** entre l'échantillon et un niveau de **calibrant** (ou de contrôle titré). Si la valeur mesurée est différente de la valeur théorique, une interférence est probable.
- La **méthode des ajouts dosés** peut être effectuée pour évaluer les effets d'une substance potentiellement interférente. Le principe est de rajouter des quantités croissantes de la substance suspecte et d'observer une éventuelle déviance des valeurs obtenues lors des dosages. Ce procédé est généralement utilisé pour évaluer l'influence de l'hémolyse, de l'ictère ou de la lipémie lors de la mise au point d'une méthode. En revanche, elle n'est pas réalisable lorsque la substance susceptible d'interférer est inconnue.

Dans de nombreux cas, **une interférence peut être soupçonnée sans que l'on puisse identifier** la substance à l'origine de cette perturbation. **Seule une étude au cas par cas des dossiers clinico-biologiques va pouvoir orienter vers une interférence particulière.** Cette recherche sera approfondie par une étude bibliographique pour en préciser la cause.

Dans tous les cas, le biologiste doit déterminer la conduite à tenir de manière à rendre au clinicien une interprétation correcte et explicite du résultat. Le biologiste doit, s'il le juge nécessaire, ne pas rendre un résultat aux prescripteurs. C'est le rôle du biologiste de s'assurer que les résultats fournis aux cliniciens sont adaptés au contexte clinique.

- ∞ **Une interférence est une perturbation de la mesure d'un analyte *in vitro* et non une modification *in vivo*.**
- ∞ **Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence une interférence, mais dans la majeure partie des cas, seule une étude bibliographique permet au biologiste de déterminer la conduite à tenir.**
- ∞ **Le biologiste se doit de rendre un résultat exact c'est-à-dire mettre en évidence les interférences et de les éliminer. Si c'est impossible, il doit interpréter les résultats en fonction des données bibliographiques, de son expérience et du dialogue clinico-biologique ou rendre le résultat « ininterprétable ».**

1.2 Interférences courantes en biochimie

La phase de prélèvement de l'échantillon peut induire des erreurs analytiques. Lorsque la coagulation est incomplète, la fibrine, en suspension dans le sérum, peut être prélevée et perturber le prélèvement de l'échantillon ou le déroulement de la réaction. Plus rarement, une bulle d'air peut produire les mêmes effets. En général, les automates détectent ces interférences, ce qui ne dispense pas de rester vigilant.

Dans toutes les méthodes analytiques utilisant des mesures spectrophotométriques, **différents composés peuvent perturber la mesure du signal.** C'est la raison pour laquelle la plupart des automates utilisent des indices de mesures de l'hémolyse, de l'ictère et de la lipémie.

- L'**hémolyse** provoque une libération de substances intra-érythrocytaires. Ces molécules peuvent être responsables d'une augmentation de la concentration plasmatique d'une substance présente en forte quantité au sein des globules rouges (notamment ASAT, potassium, phosphore, créatine kinase, fer...). De plus, par sa couleur caractéristique, l'hémoglobine libérée peut perturber la mesure d'un signal spectrophotométrique mesuré à des longueurs d'onde proche de 415 nm. L'hémoglobine a aussi la propriété d'inhiber certaines enzymes comme la lipase. Des interférences avec les immunodosages ont également été mises en évidence. Par exemple, l'hémolyse peut être responsable d'interférences négatives ou positives avec certaines trousse de dosage des troponines (4).
- La présence de **bilirubine** gêne les lectures spectrophotométriques s'effectuant aux environs de 400-500 nm. Cette molécule peut perturber les réactions utilisant la peroxydase, enzyme souvent utilisée comme marqueur.
- Quant à l'**hyperlipémie**, la lactescence qu'elle génère peut être à l'origine d'interférences dans la mesure du signal, notamment lors de mesures d'absorbance ou de diffusion de la lumière. De plus, une augmentation de la viscosité, une perturbation du coefficient d'extraction de certaines molécules (notamment les stéroïdes) ou des

liaisons antigène-anticorps peuvent être observées lorsque le prélèvement est hyperlipémique (1,5).

Actuellement, la plupart des automates de biochimie évalue ces interférences et dans l'idéal, les fournisseurs transmettent les seuils au-delà desquels leurs méthodes ne sont plus fiables permettant ainsi de prendre les mesures adaptées (dilution, ultracentrifugation, rendre le résultat « ininterprétable » etc.). Néanmoins, il est nécessaire de rester attentif, car les évaluations de ces interférences sont généralement effectuées en fonction d'indices qui ne correspondent pas forcément à des concentrations précises en hémoglobine, bilirubine ou triglycérides. Selon les industriels, les fiches techniques précisent les valeurs à partir desquelles une interférence est observée soit en fonction d'indices (unités et détermination propres à chaque système), soit en fonction des concentrations en molécules interférentes.

Lorsque les systèmes de mesure utilisent une révélation fluorimétrique, certaines substances présentes dans l'échantillon peuvent atténuer l'intensité de la lumière reçue ou émise par absorption de la fluorescence (effet Quenching) (6).

La présence de **forte concentration en protéines**, notamment dans un contexte de gammopathies monoclonales, est fréquemment responsable d'interférences de nature variable. Ces immunoglobulines peuvent présenter des activités d'anticorps (activités d'anticorps hétérophiles, facteur rhumatoïde, anti-analyte) et peuvent être supprimées en utilisant un prétraitement par le polyéthylène glycol ou par des sérums non immuns qui font précipiter ces anticorps. De plus, ces immunoglobulines peuvent être à l'origine d'une augmentation de la viscosité, d'un effet agglutinine, d'une pseudohyponatrémie ou d'une auto-précipitation. Cette dernière, liée à de multiples variables (pH, force ionique, conservateurs...) donc non prévisible, peut être responsable d'une augmentation de la turbidité ou de l'absorbance de l'échantillon. Les anticorps hétérophiles, bien que fréquemment présents, posent peu de problèmes en pratique car les réactifs utilisés contiennent généralement un inhibiteur dirigé contre ces molécules (2,7).

Une bande « anormale » lors de l'utilisation de techniques électrophorétiques peut également être attribuée à la présence d'une protéine en forte concentration (immunoglobuline, fibrinogène ou hémoglobine).

De nombreuses interférences sont simplement observées sans être expliquées. Par exemple, Kaitwatcharachai *et al.* ont montré qu'une hyperglycémie importante risque de provoquer une interférence analytique sur la mesure de la créatinine de manière plus importante avec la technique enzymatique qu'avec la méthode de Jaffé sans fournir d'explication (8).

Les dosages en biochimie sont sensibles aux conditions de leur microenvironnement. Une modification de ce dernier par une substance peut perturber les réactions biologiques et *in fine* les résultats obtenus. Ceci est communément appelé « **effet matrice** » et explique pourquoi il n'est pas envisageable d'effectuer des mesures sur un milieu non validé ou d'utiliser des diluants qui n'ont pas été étudiés au préalable.

- ∞ **Les interférences courantes sont de deux types : perturbation de la réaction ou de la mesure du signal.**
- ∞ **Certaines interférences sont fréquemment évaluées (hémolyse, ictère, lipémie...) et dans ce cas, le laboratoire est tenu de mettre en place les mesures adaptées pour y remédier.**
- ∞ **Pour les autres interférences, le biologiste doit évaluer au cas par cas la conduite à tenir et tracer les démarches réalisées.**

1.3 Interférences provoquées par les médicaments

La plupart des observations faites à propos de l'influence des médicaments sur des dosages biochimiques ne concerne pas des interférences « vraies » mais plutôt des variations induites par ces molécules sur les paramètres biologiques.

Les médicaments, selon leur mécanisme d'action, peuvent être à l'origine d'une augmentation ou diminution d'une activité enzymatique, de la sécrétion/maturation d'une hormone, de la concentration d'un substrat ou d'une protéine, d'une modification de l'affinité des protéines transporteuses...

Par exemple, l'iode et les produits iodés vont stimuler la synthèse de TSH, les opiacés celle de *thyroid binding globulin* (TBG), et l'acide acétylsalicylique (aspirine) modifie l'affinité des hormones thyroïdiennes pour la TBG (9).

Lors de la détermination des valeurs de référence, les personnes éligibles sont celles qui ne prennent aucune médication (10). En pratique, les médicaments peuvent donc être source de modifications biologiques importantes mais ne peuvent pas être considérés comme des interférences puisque la mesure effectuée est « juste » et correspond à l'effet « physiologique » du médicament. En aucun cas, il ne faut les considérer comme des interférences de dosages, le résultat doit être rendu tel qu'il est trouvé mais accompagné d'un commentaire explicatif.

Certains médicaments sont plus couramment responsables de ces modifications et le biologiste doit les connaître pour interpréter les résultats (cf. tableau 1).

| Médicament | Augmentation | Diminution |
|---------------------|---|---|
| Contraceptifs oraux | ALAT, ASAT, GGT, triglycérides | acide folique, albumine, calcium, LDH, orosomucoïde, PAL, phosphates, protéines totales, transferrine |
| Antihypertenseurs | phosphates | GGT |
| Hypolipémiant | | bilirubine, GGT, PAL |
| Antiépileptiques | ALAT, ASAT, cholestérol total, GGT, LDH | calcium, créatinine, glucose, protéines total, urée |
| Diurétiques | albumine, bilirubine, acide urique | sodium |
| Aspirine | LDH | bilirubine, acide urique |
| Anti-inflammatoires | | créatinine, acide urique |
| Barbituriques | ASAT | acide folique, bilirubine |

Tableau 1 : Résumé des principales variations biochimiques induites par la prise de médicaments

Les interférences induites par les médicaments lors de dosages biochimiques sont parfois étudiées par les industriels avant la mise sur le marché de leur dispositif. Leurs essais consistent à surcharger les échantillons avec des molécules (médicaments et métabolites) pour mettre en évidence une éventuelle interférence analytique. Pour ce faire, des recommandations ont été éditées afin de déterminer les principaux médicaments à tester ainsi que leurs concentrations (11). La mise en évidence des autres interférences est le fruit d'un retour d'expérience des utilisateurs, *via* la publication d'articles ou de déclarations de réactovigilance.

I.3.1 Interférences directes

Les interférences médicamenteuses sont particulièrement documentées dans le domaine de l'immunoanalyse. De multiples sources de perturbations sont possibles concernant les dosages fondés sur une réaction biologique de type antigène-anticorps. L'exemple le plus classique est celui des **réactions croisées**. Dans ce cas, le ou les anticorps (Ac) utilisés lors du dosage présentent un défaut de spécificité et vont pouvoir se fixer sur l'analyte à doser et/ou sur une substance interférente présentant des épitopes communs avec l'analyte à doser.

Dans le cas des dosages par compétition (figure 1A), il est nécessaire que les deux molécules possèdent un épitope commun pour qu'il y ait une interférence. En ce qui concerne les techniques de type sandwich (figure 1B), deux épitopes communs sont alors nécessaires ce qui explique que ces interférences soient moins fréquentes.

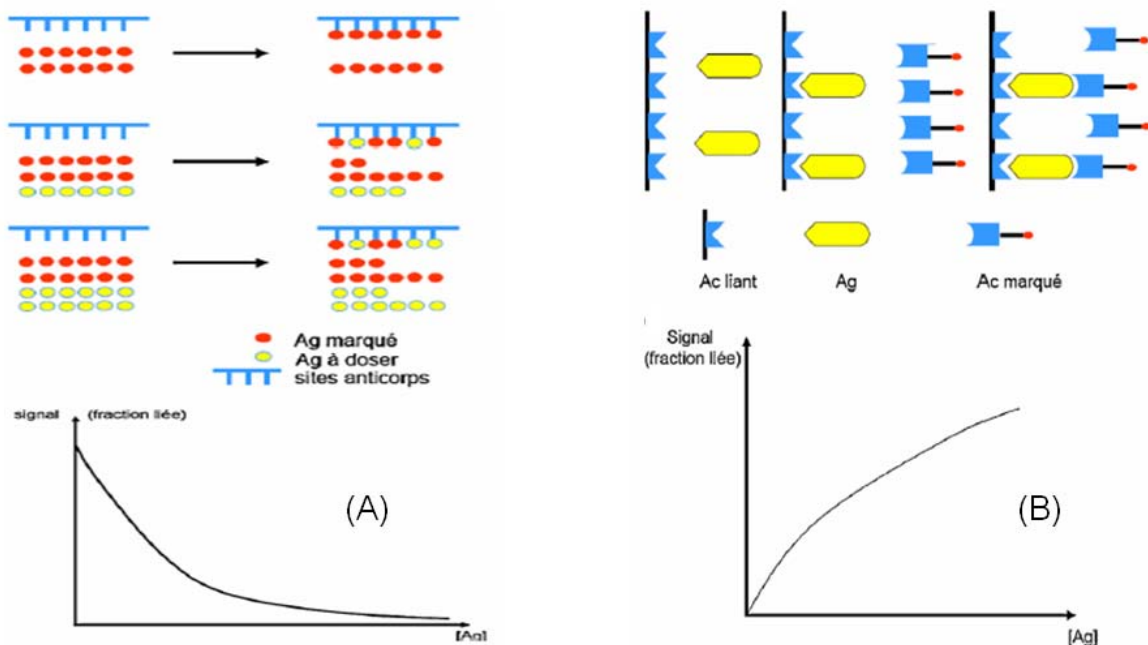


Figure 1 : Principe de dosage en immunoanalyse par une méthode compétitive (A) et non compétitive immunométrique (B).

On peut citer les interférences observées lors de la prise d'un corticoïde de synthèse (prednisolone) lors du dosage du cortisol ou encore le traitement par diclofénac qui perturbe le dosage de la triiodothyronine. Dans les deux cas, ces dosages utilisent une méthode par compétition (6,12). Ces défauts de spécificité peuvent être suspectés lorsque les molécules présentent une structure chimique similaire. Ce n'est pas nécessairement le cas, comme dans l'exemple de l'interaction entre diclofénac et la triiodothyronine qui sont relativement éloignées chimiquement (cf. figure 2). Dans cette situation, il est moins aisé de prédire cette réaction croisée. En revanche, ce défaut de spécificité peut être exploité pour rechercher des molécules qui présentent la même structure chimique. Ceci est appliqué en pharmacologie-toxicologie lors de la recherche de médicaments ou de toxiques tels que les benzodiazépines, les amphétamines...

L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet, en général, de minimiser les réactions croisées. Dans tous les cas, les industriels ne fournissent qu'exceptionnellement la nature des épitopes reconnus par les anticorps contenus dans les trousseaux réactifs.

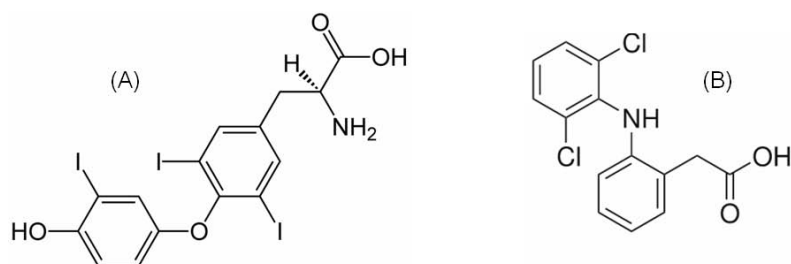


Figure 2 : Formules chimiques de la triiodothyronine (A) et du diclofénac (B).

Lors d'un dosage par compétition d'une forme libre, il y a un équilibre dynamique entre les molécules libres et celles qui sont liées aux protéines, il en est de même pour l'antigène (Ag) marqué. Il arrive que certains médicaments (salicylates, furosémide, fenclofénac) aient un effet inhibiteur de cette liaison entraînant une augmentation d'Ag libre marqué disponible et donc une sous-estimation du résultat.

Des interférences induites directement par les médicaments ont également été décrites en dehors des tests d'immunoanalyse. Par exemple, les antibiotiques de la famille des céphalosporines peuvent former des **complexes colorés** avec les picrates lors de la réaction de Jaffé, ce qui induit des erreurs lors de la mesure de la créatinine (1).

I.3.2 Interférences indirectes

Les médicaments peuvent aussi être à l'origine de la synthèse de molécules qui peuvent secondairement perturber les dosages.

Chez certains patients, l'administration de médicament peut provoquer l'apparition d'anticorps anti-xénobiotique. Lorsque le médicament incriminé présente une structure proche de molécules endogènes telles que l'insuline, ces auto-anticorps ont la capacité de se fixer sur le médicament ou sur ces molécules endogènes. Des auto-anticorps « anti-analyte à doser » peuvent également être rencontrés chez des patients soumis à un traitement modulant l'immunité. C'est le cas notamment des auto-anticorps thyroïdiens mis en évidence chez les patients traités par interféron (IFN) (13).

Les conséquences sont une interprétation erronée des résultats, c'est pourquoi selon les analytes les conduites à tenir vont être diverses.

On peut essayer dans certaines circonstances d'éliminer l'interférence, comme c'est le cas en présence d'anticorps anti-insuline où l'insulinémie libre est appréciée après une précipitation des immunoglobulines par le polyéthylène glycol.

Les anticorps anti-analyte peuvent interférer sur les dosages par compétition en diminuant la quantité d'antigène marqué, ce qui surestime le résultat rendu. En ce qui concerne les dosages non compétitifs immunométriques, le complexe Ag-Ac anti-analyte est en partie reconnu, ce qui induit une sur-estimation lorsque la forme libre est dosée et une sous-estimation lors de l'évaluation de la forme totale (12).

Ces exemples illustrent la nécessité d'être vigilant lors de la validation biologique quel que soit le type de dosage. Les médicaments peuvent être la cause de diverses interférences et seul un dialogue clinico-biologique bien conduit peut permettre de suspecter une possible interférence. La mise en évidence des interférences n'est pas toujours évidente, certaines ont été découvertes après la publication des données scientifiques (12).

Certains ouvrages regroupent les interférences induites par les médicaments qui peuvent être utiles lors de la pratique quotidienne (10,14). Néanmoins, la prudence reste de mise car l'industrie pharmaceutique développe de nouvelles molécules et notamment des anticorps qui sont des sources potentielles d'interférences. L'évaluation des risques d'interférences sur des dosages biologiques est exceptionnellement réalisée.

∞ **Les médicaments peuvent être responsables d'une variation d'un paramètre biologique mais il ne s'agit donc pas d'une interférence. Néanmoins, le biologiste doit connaître ces variations pour interpréter le bilan.**

∞ **Les médicaments peuvent perturber directement les dosages ou induire la synthèse de substances qui sont à l'origine d'interférences analytiques.**

∞ **Face à une suspicion d'une interférence, ne pas négliger l'hypothèse d'une prise médicamenteuse.**

1.4 Les interférences en enzymologie

En enzymologie clinique, le résultat exact attendu correspond à l'activité enzymatique de l'enzyme native.

Les dosages enzymatiques sont particuliers et présentent des interférences analytiques spécifiques. Le principe de ces dosages est de réaliser une réaction enzymatique *in vitro*. La vitesse de formation du produit (ou de transformation des coenzymes) est conditionnée par un facteur limitant qui est le paramètre à doser. Les autres composants de la réaction sont ajoutés en excès pour annuler leurs influences. En pratique courante, la cinétique de la réaction est corrélée à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon considéré et sa mesure permet de déterminer la concentration ou l'activité de l'enzyme.

Deux types de dosages utilisant des réactions enzymatiques sont utilisés en biologie clinique :

- les mesures d'une activité enzymatique (ex : LDH, ASAT, CK) ;
- les mesures de la concentration d'un analyte en utilisant une (ou des) enzyme(s) (ex : créatinine, glucose, acide lactique).

1.4.1 Erreurs courantes de dosage

Les **techniques enzymatiques** sont en passe d'être totalement **standardisées** en ce qui concerne leurs conditions de réalisation : mise en place de matériaux et de procédures de référence, notamment les températures et pH de réalisation des réactions (6).

Néanmoins, la mesure d'une activité enzymatique est fonction de la cinétique de la réaction considérée multipliée par un facteur de conversion F. Ce facteur prend en compte les volumes d'échantillons prélevés, les volumes réactionnels et les paramètres spectrophotométriques (absorptivité molaire et longueur du trajet optique). Ce facteur, réputé constant dans des conditions définies, est spécifié dans les fiches techniques fournies par les industriels. Toutefois, **des fluctuations** dans le temps en fonction de la **qualité optique des appareils, de l'exactitude du pipetage** et de la **qualité de la thermostatisation restent possibles**. En pratique courante et dans les conditions usuelles de dosage, ces variations sont minimales et les erreurs observées seront plutôt des erreurs systématiques que des erreurs aléatoires.

Les réactions enzymatiques *in vitro* se déroulent en 3 phases (cf. figure 3) :

- En début de réaction, il y a un temps de latence nécessaire pour atteindre les conditions optimales. Cette phase dite « de délai » est caractérisée par une vitesse de réaction qui n'est pas linéaire mais croît constamment.
- La phase linéaire de la réaction est caractérisée par une vitesse de formation des produits constante. La cinétique d'une réaction enzymatique est estimée lors de cette phase.
- Puis en fin de réaction, la déplétion de substrat conduit à une rupture de la linéarité de la réaction.

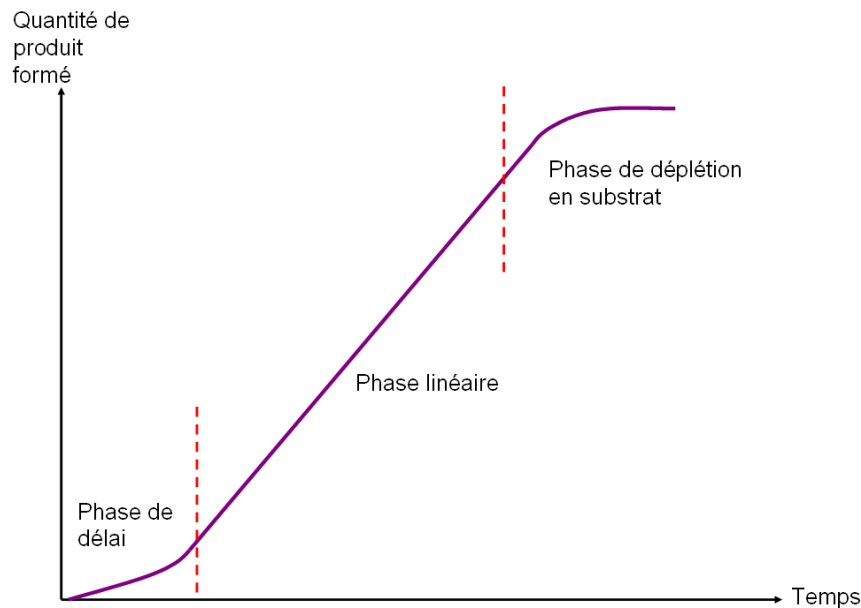


Figure 3 : Cinétique d'une réaction enzymatique

Les automates sont programmés pour mesurer les activités enzymatiques au bout d'un certain délai de manière à effectuer les mesures durant la phase linéaire. Si une **enzyme** est présente **en concentration importante**, le risque majeur est d'être confronté à **un épuisement précoce du substrat**. La mesure sera alors, effectuée lors de la phase de déplétion de substrat, avec pour conséquence une sous-estimation de l'activité enzymatique. Pour contourner ce problème, la plupart des automates effectuent des mesures de contrôle avant le dosage proprement dit pour s'assurer que le substrat n'a pas été transformé de manière anormale en comparant, par exemple, deux mesures d'absorbance durant la phase de délai. De plus, les cinétiques utilisent plusieurs points de mesure et l'analyseur détecte toute rupture de linéarité (6).

Pour résoudre ce problème il peut être nécessaire soit de pré-diluer l'échantillon soit de diminuer la prise d'essai. Le **choix de la matrice de dilution**, le cas échéant, est primordial car des perturbations de la stabilité de l'enzyme ou d'inhibition de la réaction sont possibles. Le pH du milieu réactionnel, ainsi que la force ionique, la concentration protéique totale, la présence d'inhibiteurs, etc sont des facteurs non négligeables à prendre en compte lors de cette opération.

I.4.2 Défaut de spécificité de la réaction enzymatique

Les réactifs utilisés doivent être les plus spécifiques possibles pour éviter les interférences avec des substances analogues pouvant posséder les mêmes propriétés biologiques. Lors de la mesure d'une activité enzymatique, le substrat sera choisi de manière à être complémentaire de l'enzyme. Il est nécessaire d'avoir le minimum de compétition avec un substrat présent physiologiquement ou une substance potentiellement présente dans le plasma (médicaments, toxiques...).

Cette compétition entre deux substrats S_1 et S_2 peut être schématisée de la manière suivante :

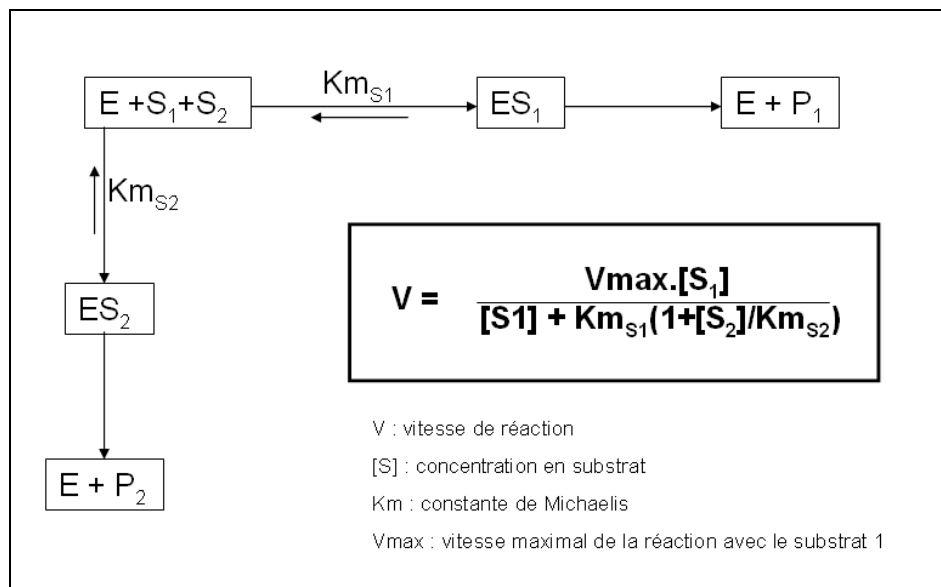


Figure 4 : Schéma de compétition entre deux substrats pour une même enzyme et équation de Michaelis-Menten

Pour diminuer cette compétition, plusieurs variables d'ajustement peuvent être utilisées :

- ✓ augmenter la concentration en substrat de manière à rendre négligeable la concentration du second substrat lors de la mesure d'une activité enzymatique.
- ✓ utiliser des substrats particulièrement spécifiques de l'enzyme, ou inversement choisir une enzyme très spécifique du substrat d'intérêt lorsque l'on souhaite doser ce dernier. Cette spécificité du couple enzyme-substrat est déterminée par la constante de Michaelis-Menten (K_m) (plus sa valeur est faible, plus la spécificité est élevée) et la vitesse initiale maximum (V_{max}). Le substrat choisi devra présenter dans l'idéal une constante de Michaelis inférieure au(x) substrat(s) naturel(s) et une V_{max} supérieure.

Certaines interférences sont dues à ce défaut de spécificité. C'est par exemple le cas de la sur-estimation des concentrations en acide lactique due à la présence de métabolites de l'éthylène glycol (acide glyoxylique et glycolate). Plus précisément, c'est la technique utilisant l'oxydase lactique qui surestime le dosage et non celle utilisant la lactate déshydrogénase (15).

Les mesures d'activité enzymatique utilisent fréquemment la transformation de coenzymes, notamment les couples $NAD(P)^+/NAD(P)H, H^+$. Dans le premier cas, on peut suivre directement la transformation de ces coenzymes grâce à leurs propriétés spectrales ; pour le second exemple, une (ou plusieurs) réaction(s) enzymatique(s) utilisant le coenzyme formée est (sont) couplée(s) à la première. Les coenzymes étant communes à plusieurs

réactions enzymatiques, **la présence d'un système enzymatique complet** (substrat et enzyme) **est susceptible d'interférer sur la production du signal dans l'échantillon.**

Ce défaut de spécificité a été évoqué, lors de la mise en place du dosage de l'alcool par une technique utilisant l'alcool déshydrogénase en raison de la libération de quantités importantes de lactate et de lactate déshydrogénase, ces deux réactions enzymatiques utilisant le couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$. Ceci explique, en partie, que les dosages enzymatiques des alcools et des glycols ne soient pas recommandés lors d'analyses médico-légales, néanmoins les performances de ces tests et leurs praticabilités sont suffisantes pour effectuer cette analyse en toxicologie hospitalière (16,17).

De même, les réactions enzymatiques étant souvent fondées sur des réactions d'oxydoréductions, les molécules qui possèdent des propriétés soit réductrices soit oxydantes peuvent interférer. Par exemple, l'acide ascorbique, qui est un composé réducteur, interfère lors du dosage de la créatinine par la méthode enzymatique.

I.4.3 Interférences provoquées par les macroenzymes

Un autre type d'interférence, parfois méconnue concerne la présence de macroenzymes. Il s'agit d'enzymes fixées à des anticorps, des lipoprotéines ou encore d'auto-agrégats (cf. chapitre II). Pour comprendre qu'elles sont sources d'interférence, il est nécessaire de revenir à l'objectif des dosages enzymatiques lors d'une exploration biologique.

La concentration d'enzyme présente dans le sang circulant correspond, à l'état physiologique, à la résultante entre la synthèse/libération et la clairance de la molécule.

Dans certaines situations pathologiques, cet équilibre est perturbé et l'activité enzymatique peut être le témoin soit :

- d'une libération plasmatique de l'enzyme secondaire à une lyse cellulaire ;
- d'une augmentation de la prolifération cellulaire (augmentation du nombre et/ou du métabolisme des cellules) ;
- d'une induction de l'activité enzymatique. Certains facteurs (endogène ou exogène) sont pourvoyeurs d'une induction de certaines fonctions cellulaires provoquant ainsi une augmentation des activités enzymatiques. On peut citer, par exemple, la prise d'oestrogénostatif induisant une augmentation de l'activité gamma-glutamyltransférase (10).

La plupart des activités enzymatiques mesurées sont évaluées lors de suspicion de pathologies induisant une libération excessive de ces enzymes (cytolyse, cholestase, prolifération tumorale...).

L'activité enzymatique n'est qu'un marqueur indirect et un moyen d'évaluer la quantité/concentration de l'enzyme libérée. C'est pourquoi, **il est important de faire la part entre l'activité enzymatique reflétant la fonction organique explorée et celle issue des autres iso-formes de l'enzyme ou des macroenzymes.** Cette raison explique que **les macroenzymes doivent être considérées comme des agents interférents car leurs activités ne reflètent pas l'atteinte organique explorée.**

La différence entre la mesure directe d'une fonction biologique et l'évaluation d'une fonction organique par l'intermédiaire d'une mesure biologique est importante à prendre en compte pour déterminer si une interférence analytique est présente.

L'activité enzymatique peut être significativement **augmentée** dans le sang lors de la présence de macroenzymes car **la demi-vie** de ces complexes moléculaires **est allongée.** Schifferli *et al.* ont démontré sur un modèle animal que la demi-vie de la macrophosphatase

acide est supérieure à celle de la forme libre de l'enzyme (18). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'allongement de la demi-vie.

La clairance rénale des macroenzymes est diminuée en raison de leur masse moléculaire relative (MMr) plus importante que celles des enzymes « libres ». Cette différence de MMr a pour conséquence une diminution de la filtration et de l'excrétion rénale. Les macroamylases, non éliminées par voie rénale, ont servi de modèles dans l'élaboration de cette théorie (19–21).

La formation des macroenzymes semble aussi freiner le catabolisme effectué par le système réticulo-endothélial (22–24).

Dans certains cas, une séparation des différentes iso-formes est nécessaire pour déterminer précisément l'origine de l'activité enzymatique. Notons que lors de cette analyse plus fine, effectuée en général par des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie ; les macroenzymes sont généralement bien individualisées et n'interfèrent donc pas avec les dosages. Il faut néanmoins souligner que ces méthodes sont de plus en plus souvent remplacées par des méthodes immunochimiques ou d'immuno-inhibition pour déterminer la proportion des différentes iso-formes, lesquelles ne sont pas exemptes d'un risque d'interférence.

Les médicaments sont potentiellement pourvoyeurs de macroenzymes mais peu de cas sont rapportés. Lors de l'exploration d'une macroenzyme, en plus de prendre en compte les circonstances pathologiques, il est essentiel d'observer les données thérapeutiques. **La plupart du temps l'implication des médicaments ne peut être que suspectée** dans la formation de la macroenzyme.

Certaines **macroamylases** sont formées par liaison de l'amylase avec des hydroxyéthylamidons (25,26). En 1988, Ihara *et al.* ont évoqué la possibilité de formation d'une **macrocréatine kinase** (macroCK) induite par l'administration d'une nutrition parentérale (27). Plus récemment, Triester et Douglas ont envisagé le développement d'une **macroaspartate aminotransférase** (macroASAT) au décours d'une immunothérapie de désensibilisation allergique (28).

Parfait *et al.* ont décrit un cas possible de macroASAT après la prise de minocycline (29). Et Loh *et al.* ont observé la présence d'une macroCK de type 1 et d'une macroCK de type 2 chez une patiente traitée par statine (30). Dans ces deux derniers cas, aucune preuve ne vient établir avec certitude l'implication du médicament. En effet, l'anamnèse n'est pas assez détaillée pour affirmer que la chronologie d'apparition de la macroenzyme est concomitante à l'administration du médicament. De plus, la sémiologie est difficilement exploitable car aucun signe clinique n'accompagne la formation des macroenzymes et la bibliographie est peu contributive devant la rareté des cas décrits.

Les différentes interférences ou erreurs observées lors des dosages enzymatiques sont de 3 types :

- ∞ **communes aux autres systèmes analytiques tels que les perturbations lors de la mesure du signal, les problèmes d'incertitude de l'automate, les limites de quantification et les effets matrices ;**
- ∞ **spécifiques au dosage enzymatique et dues à un défaut de spécificité de la réaction enzymatique ou à la production/consommation par un autre système enzymatique d'un coenzyme servant à la mesure du signal ;**
- ∞ **et enfin, les macroenzymes peuvent être à l'origine d'une activité enzymatique artéfactuelle.**

Pikkety *et al.* ont ainsi résumé la problématique des interférences analytiques (7) :

« Aucun laboratoire n'est à l'abri d'un piège analytique. Le meilleur dosage est celui que le clinicien discute avec le biologiste, c'est la meilleure garantie pour éviter des explorations complémentaires inutiles, éventuellement lourdes et coûteuses. »

II Généralités sur les macroenzymes

Le **premier cas de macroenzyme** rapporté dans la littérature a été **décrit en 1964 par Wilding et al.** et concernait les macroamylases (31,32). Les auteurs, confrontés à une augmentation chronique de l'amylasémie sans amylosurie chez un patient insuffisant rénal chronique ont suspecté la présence d'une enzyme de taille plus importante qu'attendue. Les explorations effectuées faisaient appel à des techniques de chromatographie par gel filtration et/ou ultracentrifugation et permettaient de mettre en évidence l'existence d'une **enzyme de masse moléculaire importante**, d'où le nom de macroenzyme (33). En 1967, Lundh et Ganrot rapportent des cas de macrolactate déshydrogénases (macroLDH) (34,35). Huit ans plus tard, un cas de macrophosphatase alcaline (macroPAL) est décrit par Nagamine et Okuma (36). Ces différentes descriptions soulignent le fait que toutes les enzymes peuvent être potentiellement concernées par l'apparition de ces macromolécules.

Le terme de « macroenzyme » désigne un complexe de haut poids moléculaire **formé par une auto-polymérisation** des molécules enzymatiques entre elles ou, plus fréquemment, **par une liaison de l'enzyme à un autre composé sérique** (d'origine endogène ou exogène) (37).

Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que les propriétés physico-chimiques, les significations clinico-pathologiques et les méthodes de détection de ces macroenzymes font l'objet de revues de synthèse dans la littérature (37–39). Ces études permettent alors de classer les macroenzymes en deux grandes familles :

- le terme « macroenzymes de type 1 » désigne des complexes formés par des enzymes qui sont fixées à des immunoglobulines (Ig) ;
- le terme « macroenzymes de type 2 » est réservé aux macroenzymes de nature physico-chimique hétérogène.

Ce classement, à l'origine arbitraire, se révèle judicieux pour les macroenzymes de type 1. Celles-ci ont en commun d'être rencontrées dans des circonstances pathologiques similaires et d'avoir des impacts cliniques comparables. Cette typologie est cependant moins judicieuse pour les macroenzymes de type 2. Ces dernières doivent être considérées comme des entités individuelles lors de l'étude de leurs circonstances d'apparition.

En règle générale, la présence d'une macroenzyme est évoquée face à une **augmentation chronique et stable d'une activité enzymatique en l'absence de toute symptomatologie clinique évocatrice**. Ces résultats anormalement élevés d'activité enzymatique peuvent conduire le prescripteur à rechercher certaines pathologies (graves ou bénignes) chez le patient concerné. Le fait d'**évoquer rapidement et de savoir détecter ces macroenzymes permet d'éviter les errances diagnostiques** ainsi que le recours à des explorations complémentaires à la fois coûteuses et invasives pour le patient.

L'élévation de l'activité enzymatique est généralement due à une augmentation de la demi-vie de ces macroenzymes dans la circulation sanguine. En effet, une des hypothèses avancées est que ces macroenzymes ont une clairance rénale diminuée en raison de leur taille importante. Il est à noter que la prévalence des macroenzymes reste vraisemblablement sous-estimée. En effet, si les augmentations d'activités enzymatiques sont explorées, il n'est pas exclu que dans certains cas la formation de macroenzymes se traduise par une inhibition de l'activité et puisse alors passer inaperçue.

II.1 Propriétés biochimiques

II.1.1 Macroenzymes de type 1

En 1968, Levitt et Cooperband mettent en évidence une macroamylase composée d'une immunoglobuline A liée à l'amylase en utilisant une technique de précipitation sélective avec un antisérum (sérum anti-IgA) (40).

II.1.1.1 Une liaison enzyme-anticorps anti-enzyme spécifique

Ce type de liaison sera rapporté par d'autres auteurs dans le début des années 1970 (41,42).

Cette liaison existant entre l'enzyme et l'anticorps anti-enzyme semble être spécifique pour plusieurs raisons :

- ✓ la plupart des études font état de liaison « enzyme-Ac anti-enzyme » spécifique (19,37,43–45) ;
- ✓ la dissociation des complexes enzyme-Ac anti-enzyme peut avoir lieu dans des conditions acides, ce qui est également le cas pour d'autres complexes spécifiques antigène-anticorps (19,20,32) ;
- ✓ les ratios mis en évidence entre l'enzyme et l'immunoglobuline sont de 1:2, 1:1 ou 2:1, ces ratios sont compatibles avec une interaction spécifique (18,46–48) ;
- ✓ le traitement par la papaïne ne modifie pas la stabilité du complexe ce qui plaide en faveur d'une liaison spécifique au niveau du fragment variable Fab de l'immunoglobuline (49–52). Cette liaison « enzyme-fragment Fab de l'Ig » permet de stabiliser l'enzyme vis-à-vis des températures élevées et modifie les paramètres pharmacocinétiques en allongeant sa demi-vie (53).
- ✓ les constantes d'affinité des anticorps impliqués dans la formation des macroenzymes sont comprises dans des ordres de grandeurs retrouvés dans d'autres liaisons spécifiques (10^{-9} à 10^{-11} L.mol⁻¹) (54–56).

II.1.1.2 Des anticorps anti-enzyme de nature et de spécificités variables

La plupart du temps, les immunoglobulines impliquées sont des **immunoglobulines G** (IgG) ou des **immunoglobulines A** (IgA) (37). Il a été rapporté de rares cas de macroenzymes constituées d'immunoglobulines M (IgM) ou de chaîne légère libre. La présence de ces dernières dans la formation de macroenzymes conduit à rechercher l'existence d'une gammopathie monoclonale (19,44,57,58). Exceptionnellement, plusieurs immunoglobulines peuvent être impliquées simultanément.

Les paratopes de ces anticorps peuvent être spécifiques d'une iso-forme enzymatique et non complémentaire d'un épitope commun à l'ensemble des isoenzymes. Par exemple, les iso-formes des phosphatases alcalines (PAL) peuvent être séparées en deux groupes antigéniques : les PAL placentaires et intestinales d'une part et les PAL osseuses et hépatiques d'autre part. Les anticorps formés vis-à-vis d'une isoenzyme interagissent avec les deux isoformes de ce groupe mais pas envers celles de l'autre groupe (37).

Le tableau ci-dessous résume pour chaque enzyme les liaisons décrites avec les différentes immunoglobulines.

| Macroenzymes | Isotype(s) des Ig (par ordre d'importance) | Spécificité des immunoglobulines |
|-----------------------------------|---|---|
| Aspartate aminotransférase (ASAT) | IgG (+IgA dans un cas) | Partiellement spécifique de l'iso-forme (mitochondriale, cytosolique ou les deux) |
| Alanine aminotransférase (ALAT) | IgG | Absence de données |
| Amylase | IgA > IgG | Rarement spécifique d'une iso-forme (salivaire ou pancréatique) |
| Lipase | IgG | Absence de données |
| Créatine kinase (CK) | IgG > IgA > IgG + IgA > IgM (un cas décrit) | Spécifique de l'iso-forme BB |
| Lactate déshydrogénase (LDH) | IgA(kappa > lambda) > IgG(kappa > lambda ; prédominance IgG ₃) (un cas IgM + IgG et un cas IgA + IgG) | Spécifique d'une sous-unité (H, M ou des deux) |
| Gamma-glutamyl transférase (GGT) | IgA | Absence de données |
| Phosphatase alcaline (PAL) | IgG Lambda > IgG Kappa > IgA | Spécifique de l'iso-forme (osseuse, hépatique ou intestinale) |
| Phosphatase acide | IgG, IgA | Absence de données |

Tableau 2 : Principales macroenzymes de type 1 et les isotypes impliqués (39,59,60)

La quantité d'enzyme liée ou libre est dépendante de la constante d'affinité de l'immunoglobuline. Cette dernière présente une variabilité interindividuelle mais pas intraindividuelle. La quantité de macroenzymes détectées peut donc être considérée comme étant le reflet indirect de la quantité d'anticorps présents. Certains auteurs ont proposé de suivre cette cinétique dans le cadre d'un monitoring de la pathologie à l'origine de ces anticorps (31,35,46,57,61-63).

II.1.1.3 Deux théories avancées pour expliquer les mécanismes de formations de ces anticorps (37)

« Antigen-driven theory » où l'enzyme (ou Ag) est à l'origine de la formation de l'anticorps

L'**immunisation** peut survenir lors d'un contact avec une enzyme d'origine exogène (animale, végétale...) et une réaction croisée avec l'enzyme humaine explique la survenue de complexes enzyme humaine-Ac anti-enzyme. Cette théorie est particulièrement évoquée dans la formation des macroamylases où il a été observé que les anticorps anti-amylase avaient une affinité supérieure pour l'amylase animale (porcs, moutons) que pour sa forme humaine. L'exposition de l'homme à ces antigènes d'origine animale est probablement liée à la consommation de viande ou de produits laitiers (54,64). Dans ce cas précis, l'anticorps en jeu est souvent une IgA, préférentiellement présente et synthétisée au niveau des muqueuses, lieux privilégiés de contact avec les molécules exogènes (64).

L'autre explication évoquée par certains est une **modification de l'enzyme** humaine conduisant à la formation d'anticorps. Ainsi, lors d'un infarctus du myocarde la libération de protéases peut conduire à la modification des enzymes cardiaques libérées (créatines kinases [CK] ou lactates déshydrogénases [LDH]) (65–67). Ces enzymes modifiées présenteraient de **nouveaux épitopes** non tolérés et induisant la formation d'anticorps. Une rémanence vis-à-vis des enzymes physiologiques reste possible, y compris à la disparition des enzymes altérées dans la circulation sanguine. Dans quelques cas, une disparition des anticorps, donc des macroenzymes, à distance de l'événement est décrite (65,68).

Enfin, plus rarement, l'apparition d'anticorps anti-enzyme peut être due à la **libération de l'enzyme dans des compartiments inhabituels**. L'illustration en est la formation d'anticorps anti CK-B (sous-unité B de la créatine kinase) chez l'enfant secondaire à une altération du système nerveux central avec libération des CK-BB dans le compartiment sanguin (69).

Théorie de la dérégulation de la tolérance immunitaire

L'autre explication évoquée face à la formation de tels complexes repose sur le **lien existant entre une pathologie auto-immune ou inflammatoire** et la formation des anticorps anti-enzyme. De nombreux cas de macroenzymes sont observés dans des pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, les maladies inflammatoires de l'intestin.

Dans la plupart des cas rapportés, les macroenzymes de type 1 sont alors associées à des signes évocateurs d'une altération du système immunitaire. Ces derniers peuvent concerner une augmentation du ratio Lymphocytes T Helpers / Lymphocytes T suppresseurs (Ratio lymphocytes CD4/CD8), une augmentation de la concentration en immunoglobulines ou encore la présence d'anticorps anti-nucléaires (19,61).

- ∞ **Les macroenzymes de type 1 sont des complexes « enzyme-immunoglobuline ».**
- ∞ **Les immunoglobulines les plus fréquemment en cause sont les IgG et IgA.**
- ∞ **Les anticorps sont spécifiques de l'enzyme.**

II.1.2 Macroenzymes de type 2

Cette deuxième catégorie est hétérogène par définition. En effet, toutes les macroenzymes qui ne sont pas liées à une immunoglobuline sont considérées comme étant des macroenzymes de type 2. Les mécanismes de formation sont résumés dans le tableau 3. La composition de ces macroenzymes dépend de l'enzyme considérée, des circonstances physiopathologiques ou thérapeutiques.

II.1.2.1 Macro créatine kinase

Les macrocréatines kinases de type 2 (macroCK2) sont formées par **auto-polymérisation de CK mitochondriales**.

Les mobilités électrophorétiques et chromatographiques des macroCK2 sont identiques à celles des CK mitochondriales (MtCK) après un traitement par l'urée et le 2-mercaptoéthanol, molécules ayant la propriété de dissocier les complexes macromoléculaires. Ces macromolécules présentent une énergie d'activation élevée (> 75 kJ/mol) et une thermostabilité qui sont comparables aux MtCK mais très supérieures à celles des autres isoenzymes des CK. Leurs propriétés immunologiques sont identiques à celle des MtCK

présentes dans les tissus sains. L'ensemble de ces propriétés physicochimiques, enzymatiques et immunologiques suggère que les macroCK2 sont des agrégats de MtCK (70).

Les CK mitochondriales sont situées au niveau des crêtes et de l'espace intermembranaire des mitochondries. Elles sont présentes sous forme de complexes, le plus souvent octamériques. Leur libération dans la circulation sanguine se fait sous cette forme qui est rapidement dégradée en dimères puis éliminée par voie rénale (71,72). Ces macroenzymes particulières semblent être libérées par des cellules malignes, nécrotiques ou encore lors de cytolysé hépatique, le foie étant l'un des organes les plus riches en MtCK (70,73).

II.1.2.2 Macro enzymes du système hépatobiliaire

Les enzymes hépatobiliaires telles que les Phosphatases Alcalines (PAL), Gamma-Glutamyltransférases (GGT) et Leucines Aminopeptidases sont situées au niveau membranaire. Lors de la lyse de la cellule, elles peuvent se **fixer avec les composants de la membrane cellulaire** ou se **fixer à des lipoprotéines** et être solubilisées dans le plasma sous ces formes.

Deux mécanismes de formation sont avancés :

- la bile pourrait, *via* ses propriétés détergentes, solubiliser une partie de la membrane plasmique et ainsi libérer les enzymes qui seraient liées soit à des fragments membranaires, soit à des lipoprotéines (74,75) ;
- une rupture de la membrane durant une obstruction hépatobiliaire libérerait des fragments comprenant les enzymes membranaires (74,76).

Deux types d'associations « enzymes-lipoprotéines » sont décrits :

- ✓ Les complexes de haut poids moléculaires (> 1 000 000 Da) correspondant aux associations avec les VLDL, LDL, lipoprotéines X ou fragments membranaires ;
- ✓ Les complexes de masses moléculaires intermédiaires (entre 250 000 et 500 000 Da) sont constitués d'HDL (60).

Les fragments de membranes présentant une activité enzymatique ne sont en général pas spécifiques d'une seule enzyme, c'est pourquoi De Broe a introduit le terme de « **koinozymes** » (du grec κοινός = koivos = commun) pour les décrire (76).

II.1.2.3 Macroamylase

Une enzyme peut former une macroenzyme en se liant à une molécule exogène ou endogène. Par exemple, il a été décrit la formation de macroamylase après liaison de l'amylase à l'hydroxyéthylamidon lors du traitement par ce succédané des protéines plasmatiques qui présente une structure similaire au substrat naturel (ajout d'un groupement hydroxyéthyl en position 2 ou 6) de l'enzyme (25,26).

| Macroenzymes | Mécanismes de formation |
|---------------------------------|---|
| Amylase | Liaison avec un médicament |
| Phosphatase alcaline (PAL) | Liaison avec une lipoprotéine ou un fragment de membranes plasmiques hépatiques |
| Gamma-glutamyltransférase (GGT) | Liaison avec une lipoprotéine ou un fragment de membranes plasmiques hépatiques |
| Leucine aminopeptidase | Liaison avec une lipoprotéine ou un fragment de membranes plasmiques hépatiques |
| 5' nucléotidase | Liaison avec une lipoprotéine ou un fragment de membranes plasmiques hépatiques |
| Créatine kinase (CK) | Auto polymérisation |

Tableau 3 : Principales macroenzymes de type 2 et leurs mécanismes de formation (39,59)

∞ **Les macroenzymes de type 2 sont hétérogènes : liaison de l'enzyme à une lipoprotéine, à un fragment de membrane, à un médicament ou encore suite à une auto-polymérisation de l'enzyme.**

II.2 Méthodes de détection et d'analyse des macroenzymes

De multiples modes de détection ont été décrits, l'objectif de ce chapitre est de faire le point sur ces différentes techniques.

Historiquement, la **première technique** utilisée pour dépister la présence d'une macroenzyme (la macroamylase) fut le **calcul du ratio de la clairance rénale de l'amylase par rapport à celle de la créatinine** (31,33). La présence d'une macroamylase est évoquée lorsque cette clairance est réduite et que le rapport est inférieur à 1% (valeurs de référence : 0,8-4,5%) (19,77). Ce calcul est surtout indiqué pour exclure la présence d'une macroamylase.

Depuis, le développement des méthodes physiques a permis de séparer les molécules pour mettre en évidence plus spécifiquement ces complexes enzymatiques de haut poids moléculaire.

Les procédés mis en œuvre sont de deux types :

- Certains procédés sont **simples** et **accessibles à la plupart des laboratoires** de biologie médicale (LBM) et permettent de **porter le diagnostic de macroenzyme sans** toutefois en **déterminer le type**. C'est le cas des techniques d'ultrafiltration et de précipitation par le polyéthylène glycol (PEG).
- D'autres techniques d'analyse plus **complexes** ont l'avantage de permettre un examen plus complet. Leur **mise en place est plus délicate** et ces procédés analytiques restent **réservés à certains centres spécialisés**. Ces méthodes regroupent les électrophorèses des isoenzymes et la chromatographie d'exclusion stérique.

II.2.1 Ultrafiltration (UF)

Cette méthode est dérivée des méthodes industrielles utilisées pour la séparation des molécules ou la stérilisation à froid. Ses applications sont diverses : traitement des eaux, industries agro-alimentaires, industries pharmaceutiques ou encore pétrochimie.

Le principe de l'UF repose sur **une filtration à travers une membrane** pour éliminer les molécules de taille importante. Le terme ultrafiltration fait référence au seuil de coupure qui représente la masse molaire critique pour laquelle les solutés sont entièrement retenus par la membrane. L'UF permet de retenir les grosses molécules telles que les polymères, les protéines de taille relativement importante, les colloïdes...

Les membranes sont donc caractérisées par :

- ✓ leur seuil de coupure (ou cut off) ;
- ✓ leur sélectivité : la capacité à ne laisser passer que certaines substances (sous l'influence de la conformation tridimensionnelle des molécules et de l'adsorption des molécules à la membrane) ;
- ✓ leur perméabilité : c'est le débit d'ultrafiltrat fourni par m² de membrane. L'unité est le l/m²/h ;
- ✓ leur nature : matériaux minéraux ou organiques, membranes symétriques ou pas, etc.

En biologie médicale, **les principales caractéristiques** à prendre en compte dans le choix des filtres sont **le seuil de coupure et la sélectivité** de la membrane. La perméabilité n'est pas un paramètre essentiel en dehors des applications à visée industrielle. La nature des membranes présente un intérêt pour la sélectivité. Ce critère définit aussi, en partie, la durée de vie de la membrane, paramètre peu important en biologie médicale dans la mesure où ces filtres sont à usage unique.

En biochimie, l'ultrafiltration est utilisée pour détecter la présence de macroprolactine (macroPRL) ou pour séparer les hormones libres des hormones liées à leurs protéines transporteuses (78–80).

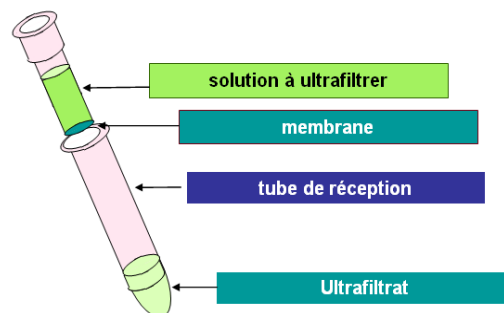


Figure 5 : Schéma d'un tube à ultrafiltration

Certains auteurs ont récemment évalué cette méthode pour mettre en évidence les macroenzymes. Dans cette indication, le seuil de coupure de la membrane est d'environ 100 kDa (81). Cette technique est moins utilisée en routine que la précipitation par le polyéthylène glycol dans cette indication. Pourtant, les quelques études réalisées semblent conclure à des performances équivalentes entre ces méthodes (82,83).

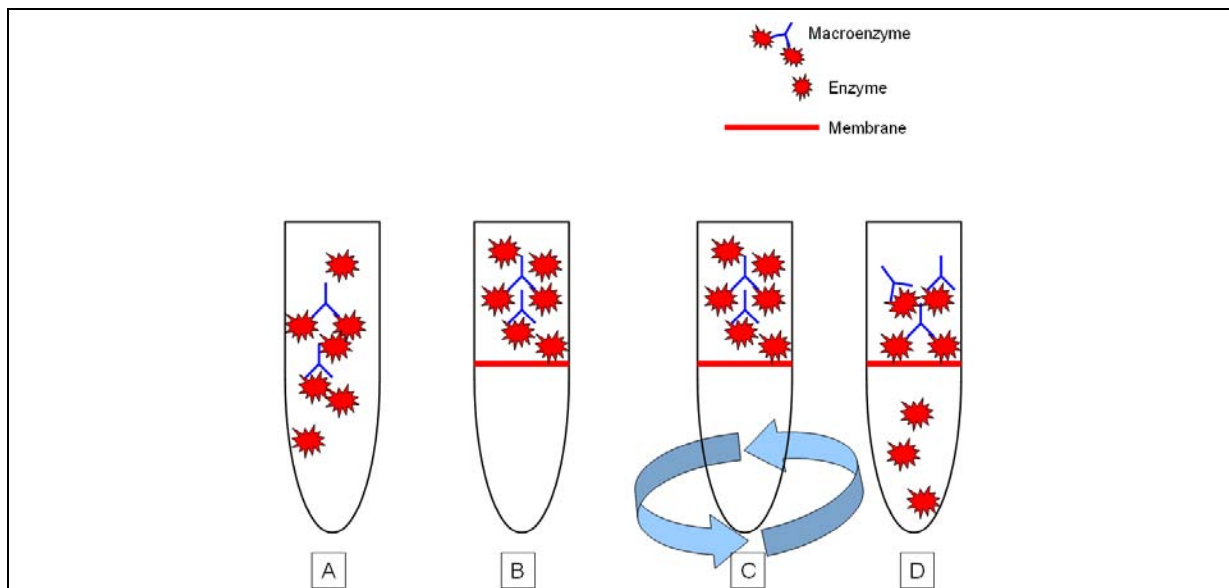


Figure 6 : Principe de l'ultrafiltration dans le cas de la mise en évidence de macroenzymes

A : L'activité totale enzymatique est mesurée (activité propre).

B : Le sérum est filtré sur une membrane dont le seuil de coupure est adapté à la séparation des molécules d'intérêt (les macroenzymes et enzymes libres).

C : Une centrifugation est réalisée pour accélérer le passage de la membrane par les molécules de masse moléculaire inférieure au cut-off (les enzymes passent la membrane contrairement aux macroenzymes).

D : Mesure de l'activité de l'ultrafiltrat (culot) qui correspond à l'activité enzymatique des enzymes sous forme libre.

Le rapport entre l'activité totale et l'activité de l'ultrafiltrat permet de déterminer un **pourcentage de recouvrement d'activité** :

$$\text{Pourcentage de recouvrement d'activité} = 100 \times \frac{\text{Activité}_{\text{ultrafiltrat}}}{\text{Activité}_{\text{propre}}}$$

Il est nécessaire d'établir des valeurs de référence pour utiliser ces valeurs de recouvrement d'activité. Si le pourcentage d'activité est inférieur à ces valeurs, une partie de l'activité propre est sûrement composée d'enzymes de tailles importantes.

Actuellement, en l'**absence de valeurs de référence déterminées et de protocoles bien définis**, chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de références correspondant à son mode opératoire et à sa population. D'après les quelques études publiées, ces valeurs de référence varient en fonction des enzymes (81,84).

L'ultrafiltration :

- ☺ **Technique universelle.**
- ☺ **Matériel limité et peu coûteux (filtres, centrifugeuse).**
- ☺ **Temps technicien restreint.**
- ☺ **Aucune compétence technique particulière n'est requise.**
- **Une centrifugeuse peut être mobilisée pendant plusieurs heures.**
- **Nécessité d'établir ses propres valeurs de référence et ceci pour chaque enzyme explorée (ou utiliser un protocole défini dans la littérature en réalisant la technique avec des témoins pour vérifier la validité de la méthode).**

Tous les laboratoires disposent donc potentiellement des moyens techniques et matériels pour réaliser cette technique sans formation ou investissement préalable.

II.2.2 Précipitation par le Polyéthylène Glycol (PEG)

Contrairement à d'autres procédés comme la chromatographie d'exclusion stérique ou l'électrophorèse, **la précipitation par le polyéthylène glycol (PEG) est une technique simple** à mettre en œuvre qui consiste à prétraiter un échantillon par une solution de PEG.

Le seul réactif « particulier » est le PEG, ce qui en fait une méthode **utilisable en routine par tous les laboratoires de biologie médicale** (85). Mifflin *et al.* affirment même que la précipitation par le PEG est la technique la plus simple à mettre en place dans un LBM non spécialisé pour détecter les macroenzymes (38). Le polyéthylène glycol est un polymère composé de monomères d'éthylène glycol linéaire. Sa masse moléculaire (MM) est variable mais toujours inférieure à 20000 g.mol⁻¹. Cette molécule peut se présenter sous forme branchée en liant deux chaînes linéaires par une lysine. Les variations des masses moléculaires et de conformation tridimensionnelle permettent de modifier les propriétés physiques de la molécule.

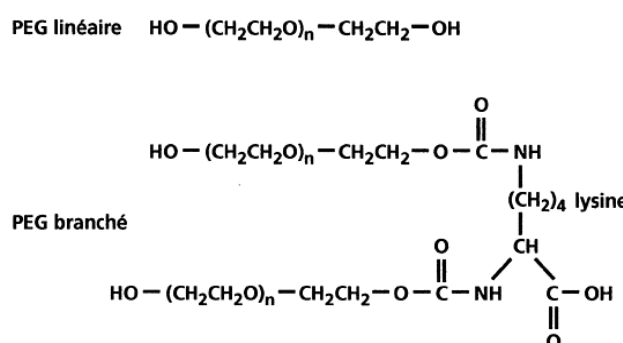
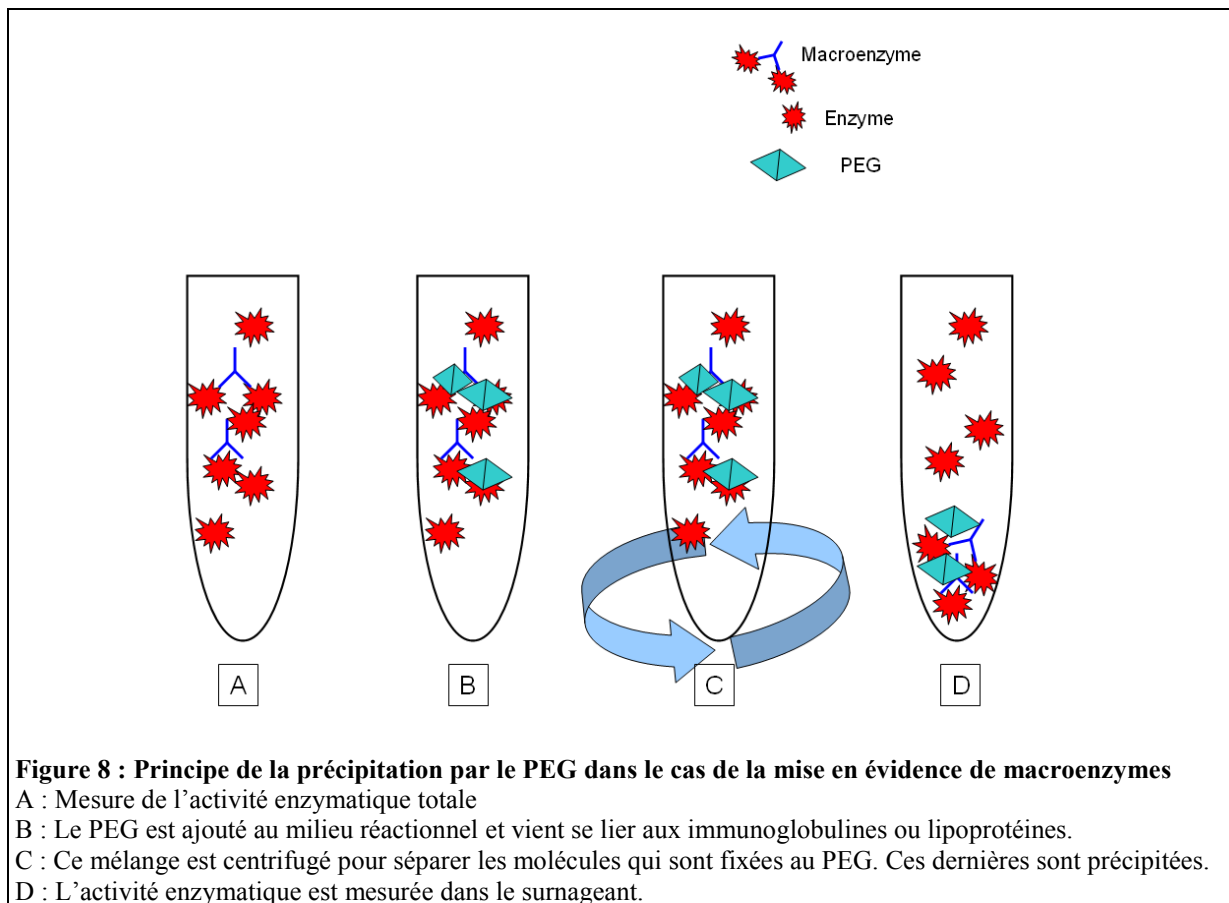


Figure 7 : Formule chimique du polyéthylène glycol

En médecine, le PEG est indiqué comme laxatif sous la dénomination « macrogol » ou encore comme conservateur d'organe. En galénique, son utilisation comme excipient lors de la préparation de pommades, comprimés, suppositoires est courante (86). Ses propriétés peuvent aussi être exploitées comme prodrogue pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques de certaines molécules notamment les protéines. Cette molécule est notamment associée aux interférons alpha-2a (Pegasys®) ou alpha-2b (ViraféronPeg®) dans le traitement de l'hépatite C, à la L-asparaginase dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique, à l'adénosine désaminase dans le traitement de déficits immunitaires. Le PEG permet d'augmenter la demi-vie de résorption et d'élimination des molécules entraînant des schémas posologiques plus simples. De plus, dans certains cas, elle diminue les risques d'hypersensibilité vis-à-vis de la molécule native (87). Cette molécule a l'avantage d'être non toxique, non immunogène, très hydrosoluble, et rapidement éliminée de l'organisme (88).

En biologie, cette molécule peut **faire précipiter certaines molécules**, notamment **les lipides et les protéines**. Pour ce faire, la MM du PEG doit être suffisamment importante, cette molécule restant miscible dans l'eau pour des MM inférieures à 600 g.mol⁻¹.

En plus de sa simplicité, la précipitation par le PEG **permet de dépister un grand nombre de macroenzymes**, tout en étant **économiquement rentable** (89). Cette technique, indiquée dans le cadre des dépistage des big-big prolactines, est déjà utilisée dans de nombreux LBM (90). Cette précipitation est même conseillée pour éliminer les interférences provoquées par des anticorps lors des dosages immunoanalytiques (12).



Aucune standardisation des protocoles n'est réalisée pour le moment dans le cadre du dépistage des macroenzymes. Les sources de variation sont la nature du PEG (6000 ou 8000 en général), la concentration du PEG, les volumes de plasma et de solution de PEG, le temps et la température d'incubation ainsi que les différents paramètres de centrifugation (vitesse, temps, température).

Pour harmoniser les pratiques, Davidson et Watson ont proposé de comparer les activités enzymatiques en calculant l'activité précipitable par le PEG (PEG-precipitable activity : %PPA) selon la formule suivante (85) :

$$\%PPA = 100 \times \frac{\text{activity}_{\text{saline}} - \text{activity}_{\text{PEG}}}{\text{activity}_{\text{saline}}}$$

Il est nécessaire pour appliquer cette formule d'utiliser un témoin de précipitation composé d'une solution saline, pouvant induire des paramètres de variation supplémentaires : nature et concentration de la solution saline.

Davidson et Watson ont étudié les propriétés de précipitation du PEG 6000 sur différents protéines et lipides (cf. tableau 4). D'après cette étude, le PEG a la capacité de faire précipiter de nombreuses molécules impliquées dans la formation des macroenzymes (immunoglobulines, lipoprotéines) (85).

| | Avant précipitation | Après la précipitation | Taux de précipitation |
|-------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Protéines totales (g/l) | 86 | 44 | 49 % |
| Albumine (g/l) | 38 | 34 | 10.5 % |
| Cholestérol (mmol/l) | 5.4 | 0.8 | 85 % |
| Triglycérides (mmol/l) | 1.94 | 0.4 | 79 % |
| IgG (g/l) | 15.86 | <0.33 | > 98 % |
| IgA (g/l) | 11.6 | 1.9 | 84 % |
| IgM (g/l) | 2.46 | <0.04 | >98 % |

Tableau 4 : Effet de la précipitation par la PEG 6000 sur différentes molécules d'après Davidson et Watson (85)

Les macroenzymes de type 1 comprenant des immunoglobulines seront précipitées du fait de la formation du complexe PEG - Ig. Les lipoprotéines sont largement impliquées dans la formation des macroenzymes de type 2 notamment celles des enzymes du système hépatobiliaire (PAL, GGT). Pour les enzymes qui sont liées aux lipoprotéines, le PEG semble aussi efficace (91). Les macro CK de type 2 composées par auto-polymérisation sont elles aussi précipitées (85). Ces différentes données suggèrent que le PEG pourrait faire précipiter la plupart des macroenzymes.

Néanmoins, il est nécessaire de s'assurer que les enzymes sous forme libre ne sont pas précipitées et que leurs activités ne sont pas inhibées par le PEG. **L'établissement de valeurs de référence est obligatoire** pour apprécier le comportement des enzymes « physiologiques » en présence de PEG. Différents auteurs ont effectué ce travail mais ces études ne sont pas comparables car les MMr de PEG (6000 ou 8000), leurs concentrations, les modes opératoires ne sont pas standardisés. Par ailleurs, les caractéristiques des populations de témoins différents d'une étude à l'autre.

En revanche, la conclusion est identique : le PEG a la propriété de faire diminuer l'activité enzymatique mais de manière très variable entre les enzymes. Ceci nécessite donc d'établir des valeurs de référence pour chaque enzyme et de comparer la précipitation des échantillons suspects à ses valeurs de références.

La précipitation par le PEG :

- ☺ **Technique universelle.**
- ☺ **Matériel limité et peu coûteux (solution de PEG, centrifugeuse). L'incubation est en générale réalisée à température ambiante, donc nécessitant aucun matériel supplémentaire.**
- ☺ **Temps technicien limité.**
- ☺ **Aucune compétence particulière n'est requise.**
- **La préparation de la solution de PEG nécessite de disposer du matériel indispensable (balance, pipettes, fioles jaugées...).**
- **Nécessité d'établir ses propres valeurs de référence pour chaque enzyme explorée (ou utiliser un protocole défini dans la littérature en réalisant la technique avec des témoins pour vérifier la validité de la méthode).**

Tous les laboratoires ont donc potentiellement les moyens techniques et matériels pour réaliser cette technique sans formation ou investissement préalable.

II.2.3 L'électrophorèse séparative

L'électrophorèse permet de séparer les molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique.

La mobilité électrophorétique ($M_{E\phi}$) d'une substance est dépendante de paramètres qui lui sont propres tels que sa charge, sa surface ou son rayon ainsi que de paramètres dépendants du milieu : la viscosité du milieu, le pH et la constante diélectrique du solvant.

L'interaction entre ces différents facteurs peut être modélisée par l'équation suivante :

$$M_{E\phi} = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

Q : la charge globale qui est dépendante de la charge propre de la molécule, de sa surface, du pH et de la constante diélectrique du solvant ;

$6\pi\eta r$: correspond au coefficient de friction avec :

- η : viscosité du milieu ;

- r : rayon de la particule augmenté des couches d'hydratation et d'ionisation aussi appelées couche de Stern.

Cette équation permet de comprendre que **les molécules sont séparées en fonction de leur charge, leur taille et leur structure tridimensionnelle** (5).

Un courant dit électro-osmotique, correspondant à la migration des ions du tampon, peut produire un mouvement de liquide dans le sens opposé à la migration.

C'est la résultante de ces deux mouvements qui va définir la vitesse de migration.

L'électrophorèse des isoenzymes se déroule suivant une **électrophorèse de zone**. Les molécules se séparent selon leur différence de mobilité et sont visualisées dans un second temps. Les supports de cette séparation doivent être inertes chimiquement, homogènes et présenter une résistance mécanique suffisante pour être manipulés. Le gel d'agarose permet de répondre à ces contraintes et est fréquemment utilisé lors de la séparation des isoenzymes.

D'après Remaley et Wilding, l'électrophorèse est le test de référence pour mettre en évidence les macroenzymes non liées aux immunoglobulines, notamment pour les enzymes du système hépatobiliaire (37).

Cette technique a été développée en enzymologie clinique pour séparer et quantifier les différentes iso-formes d'une même enzyme. Ces dernières sont généralement spécifiques de certains organes permettant de déterminer l'origine d'une perturbation de l'activité enzymatique totale. Cette méthode est surtout appliquée aux **CK, LDH, PAL**. L'électrophorèse est également **une technique de référence pour le dépistage** et la caractérisation **des macroenzymes de ces trois enzymes** (37,81). Les paramètres opératoires sont bien décrits et standardisés (type et concentration du gel, composition du tampon, paramètres du champ électrique, temps de migration...) lors de la séparation des CK, LDH et PAL, les techniques utilisées sont en général marquées CE (conformité européenne). Pour les autres, cette technique étant réalisée de manière exceptionnelle, nous ne pouvons affirmer qu'il s'agisse de la méthode de référence.

En pratique, le sérum est déposé sur le gel, puis sous l'impulsion d'un courant électrique, les molécules sont séparées. Une étape de révélation utilisant une réaction enzymatique permet de visualiser les molécules d'intérêt et de discerner d'éventuelles bandes anormales. Le choix du mode de révélation peut être un paramètre important pour gagner en spécificité. Ces techniques peuvent être couplées à un système d'intégration (densitomètre et

logiciel adapté) pour quantifier les différentes iso-formes et, le cas échéant, la macroenzyme (92).

La majorité des macroenzymes peut être mise en évidence par ce principe. En effet, la présence d'une macroenzyme peut être à l'origine :

- de l'apparition d'une bande anormale ;
- de la diminution de l'intensité d'une bande ;
- de l'élargissement d'une bande sur le profil électrophorétique (37).

Dans les cas où ces bandes ont déjà été étudiées, la migration étant spécifique, **la nature de la macroenzyme** (type 1 ou 2) **pourra être déterminée sans plus d'explorations**. Néanmoins, dans certains cas, plusieurs formes de macroenzymes peuvent migrer au même niveau notamment les macroenzymes de type 1 dont la migration identique ne permet pas de préciser la nature de l'immunoglobuline en jeu. En revanche si aucune description n'a été effectuée, il sera nécessaire de poursuivre les investigations pour identifier la macroenzyme observée.

L'électrophorèse séparative :

- ☉ **Technique permettant de définir le type de macroenzyme.**
- ☉ **Protocoles bien définis (il n'est pas utile d'établir ses propres valeurs de référence ou d'utiliser des témoins).**
- ☉ **Quantification possible de la macroenzyme.**
- **Matériel et réactifs spécifiques.**
- **Coût relativement important.**
- **Compétence technique nécessaire et temps technicien important (réduit si l'analyse est réalisée au sein d'une série).**
- **Technique limitée à certaines enzymes (CK, LDH, PAL ou d'autres en fonction de la compétence du laboratoire).**

Les laboratoires qui utilisent couramment ces techniques peuvent y recourir pour dépister les macroenzymes.

II.2.4 Immunoprécipitation

Il peut être utile de préciser la nature exacte des molécules engagées dans la formation de la macroenzyme.

Pour cela, il est possible d'**utiliser des antisérums spécifiques** qui permettent ainsi de mettre en évidence l'immunoglobuline fixée à l'enzyme dans le cas des macroenzymes de type 1. De même, des anticorps spécifiquement dirigés contre les lipoprotéines peuvent permettre l'identification de macroenzymes hépatobiliaires de type 2.

Ces antisérums peuvent être utilisés comme agent précipitant ou comme agent de révélation lors des électrophorèses. **La composition de la macroenzyme peut être déterminée** grâce à l'utilisation de ces réactifs. Par exemple, Lagabrielle *et al.* ont utilisé, lors de l'isolement d'une macroASAT, deux anti-sérums : un dirigé contre les ASAT d'origine cytosolique et l'autre contre celles d'origine mitochondriale. Ceci a permis de mettre en évidence que la macroASAT en cause était exclusivement composée d'une ASAT d'origine cytosolique (93).

L'avantage essentiel est de permettre une identification spécifique de la molécule associée à l'enzyme mais ceci nécessite de savoir ce que l'on recherche. L'utilisation de l'immunoprécipitation en tant que technique de dépistage n'est donc pas pertinente.

L'immunoprécipitation :

- ☺ Caractérisation possible de la macroenzyme.
- Réactifs spécifiques.
- Coût important.
- Compétence technique nécessaire et temps technicien important.
- Technique limitée aux domaines de la recherche.
- Obligation de savoir ce que l'on recherche (anti-sérums spécifiques).

Cette méthode ne peut pas être utilisée en dépistage, il s'agit d'une méthode de recherche qui permet de caractériser avec précision la composition d'une macroenzyme.

II.2.5 Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (encore appelée chromatographie par gel filtration ou chromatographie sur gel perméable) est une technique qui repose sur la **séparation des molécules en fonction de leur volume**.

Pour séparer des macromolécules biologiques par chromatographie, il est nécessaire de travailler à basse ou moyenne pression (pression inférieure à 20 bars).

Cette méthode utilise une phase stationnaire constituée d'un polymère donnant un gel poreux dont le degré de réticulation va conditionner la taille des pores. Les molécules de taille inférieure à celle des pores peuvent pénétrer dans le gel tandis que les plus grosses en sont exclues. Ces dernières migrent donc plus rapidement.

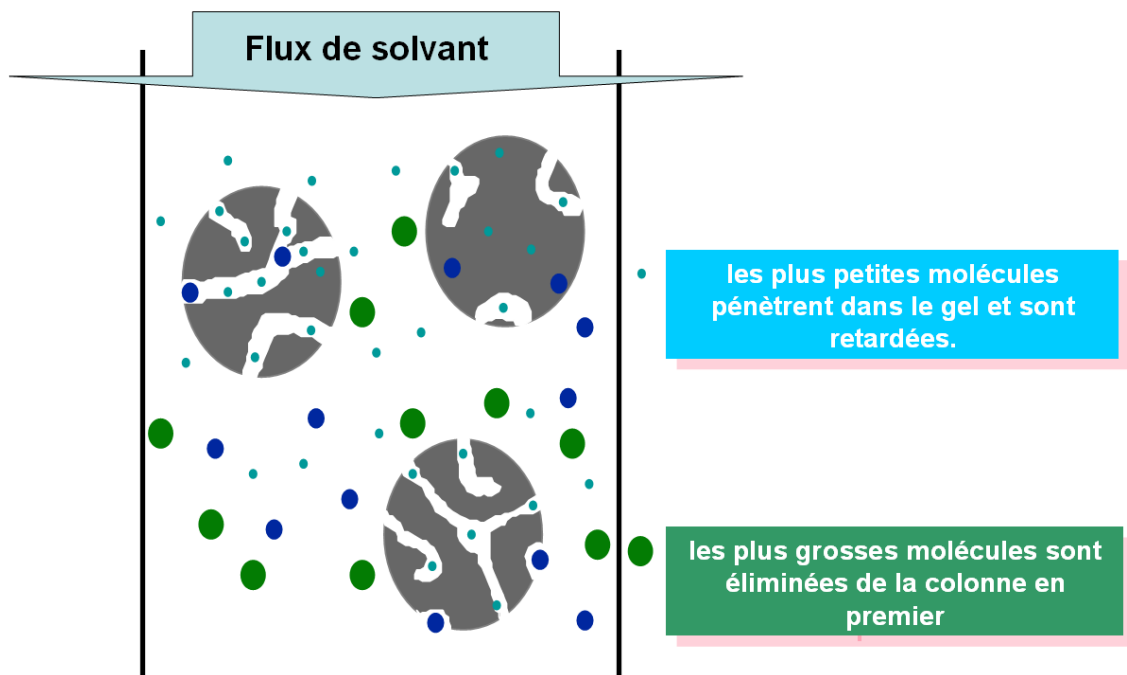


Figure 9 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique

Les gels qui constituent la phase stationnaire sont hydrophiles et très homogènes sur le plan de la granulométrie. Ils peuvent être composés de dextran, polyacrylamide, polymère vinylique, agarose ou encore d'une combinaison de ces derniers. Le choix de la colonne peut avoir une influence importante sur la séparation. Par exemple, le dextran n'est pas

recommandé pour détecter les macroamylases car ces dernières interagissent avec lui. En revanche, les colonnes composées de polyacrylamides sont parfaitement adaptées (19).

La phase mobile est généralement aqueuse avec un pH proche de la neutralité. Une force ionique suffisante est primordiale pour éviter la constitution d'agrégats de macromolécules. Si l'élution est réalisée par une phase mobile constituée d'un tampon non dénaturant, cette méthode peut être utilisée comme protocole d'isolement et de purification (5).

Le volume d'élution est fonction :

- ✓ de l'affinité de la molécule pour la colonne (dans l'idéal, cette variable est négligeable) ;
- ✓ et du partage de la molécule entre le volume de solvant compris dans les pores et dans les espaces interstitielles.

Cette dernière variable constitue le coefficient de diffusion et peut être modélisée par cette équation :

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K : Coefficient de diffusion.

V_e : Volume d'élution de la substance d'intérêt.

V_0 : Volume mort : volume d'exclusion des molécules qui sont de taille trop importante pour rentrer dans les pores.

V_t : Volume total : volume d'exclusion des très petites molécules qui diffusent librement à l'intérieur du gel.

Les macromolécules occupent un volume qui est fonction du rayon de Stokes (R_s) qui correspond au rayon d'une particule sphérique qui aurait le même comportement hydrodynamique que la molécule considérée.

Dans la partie du domaine de fractionnement de la colonne, un lien logarithmique existe entre le rayon de Stokes et le coefficient de diffusion selon la formule :

$$\text{Log } R_s = a.K + b$$

Pour des molécules globulaires telles que les protéines, le R_s est fonction du nombre de résidus d'acides aminés donc de la masse moléculaire (MMr). L'équation peut donc s'écrire :

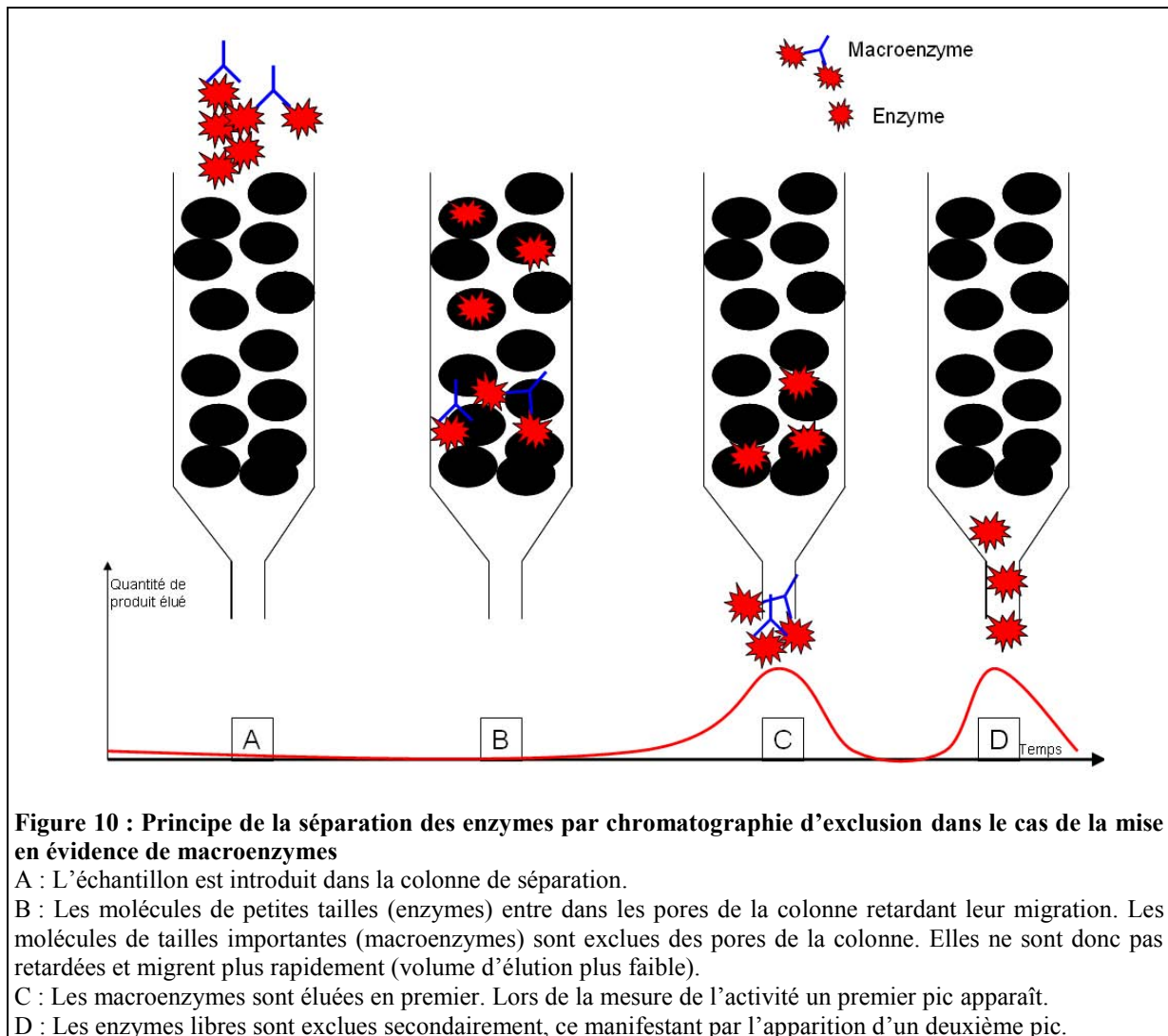
$$\text{Log MMr} = a'.K + b'$$

L'étalonnage de la colonne par une gamme de protéines globulaires de R_s et/ou MMr connus est donc réalisable (5).

Ceci est décrit pour des molécules globulaires, mais le **coefficient de diffusion est dépendant de la taille des molécules** ainsi que de la **conformation tridimensionnelle**. Cette dernière variable induit que deux macromolécules de même poids moléculaire n'auront pas nécessairement le même volume d'élution donc un coefficient de diffusion différent. Le volume d'élution est inversement proportionnel au volume de la molécule (encombrement stérique de la molécule). En d'autres termes, les molécules de haut poids moléculaire et de volumes importants sont éluées en premier.

Il faut cependant veiller à ne pas dénaturer les protéines pour maintenir les propriétés biologiques qui pourront ainsi être évaluées. Les macroenzymes présentant un encombrement stérique plus important que les enzymes libres sont donc éluées plus rapidement. Cette

méthode lorsqu'elle n'est pas destructive, permet d'utiliser les molécules séparées pour des analyses ultérieures telles qu'une mesure de l'activité enzymatique.



Cette technique reste, d'après Patteet *et al.*, **la technique de référence pour mettre en évidence les macroenzymes** (94). En effet, elle permet de mettre en évidence toutes les macroenzymes. En revanche, ce process n'est pas disponible dans tous les laboratoires. De plus, il est impossible de déterminer la composition de la macroenzyme avec cette technique. C'est **une méthode de séparation** et non de caractérisation biochimique de l'enzyme.

La chromatographie d'exclusion stérique :

- ☺ La technique de référence pour mettre en évidence les macroenzymes.
- ☺ Technique universelle.
- ☺ Permet de séparer les macroenzymes des autres formes enzymatiques pour les étudier.
- ☺ Quantification possible de la macroenzyme.
- ☺ Pas besoin d'établir ses propres valeurs de référence
- Nécessité de disposer du matériel et des réactifs.
- Coût relativement important.
- Compétence technique nécessaire et temps technicien important (notamment pour la mise au point de la technique).
- Caractérisation impossible de la macroenzyme.

Les laboratoires qui disposent de cette technique peuvent l'utiliser pour dépister et quantifier une macroenzyme.

II.2.6 Autres méthodes

Diverses méthodes ont été utilisées pour mettre en évidence les macroenzymes. Ces méthodes sont moins populaires que les précédentes car elles sont soit moins performantes, soit de mises en place trop contraignantes.

Certaines de ces **méthodes sont basées sur la modification des propriétés biochimiques** des enzymes, conséquence de la formation de la macroenzyme. Les mesures de la thermostabilité, de l'énergie d'activation ou encore de la solubilité dans une solution de sulfate d'ammonium font parties de ces techniques (37).

Récemment George *et al.* ont utilisé un **prétraitement par la trypsine** pour améliorer la spécificité de l'électrophorèse vis-à-vis des macroCK de type 1. En effet, la trypsine dégrade cette macroenzyme et la bande correspondant à la macroCK1 disparaît après une prédigestion par cette enzyme. Cinq échantillons étaient concernés par cette étude, dont trois comprenant une macroCK1. Les deux autres échantillons présentaient pour l'un une bande au même endroit que la macroCK1 qui n'a pas disparue. Néanmoins aucune macroCK n'a été mise en évidence par la chromatographie d'exclusion stérique. Le second présentait une migration atypique, malheureusement aucune exploration supplémentaire n'a été effectuée. L'utilisation de la trypsine a déjà été décrite pour confirmer que des PAL étaient liées à des immunoglobulines (92). Des études complémentaires sont à envisager pour savoir si ce protocole apporte réellement un plus dans la caractérisation des macroenzymes par électrophorèse (92,95).

La précipitation des macroenzymes par la **protéine A Sépharose** a été décrite. La protéine A possède la propriété de se fixer aux fragments Fc des immunoglobulines G (96). Au vu du nombre restreint de cas décrits dans la littérature, cette technique ne semble pas être une alternative à des méthodes telles que la précipitation par le PEG ou l'ultrafiltration. Plus récemment, Hocchi *et al.* ont développé un test ELISA pour mettre en évidence les complexes PAL-IgG (97). Ce test permet de déterminer rapidement la présence de ce complexe mais devant la rareté de ce dernier, il semble peu probable que son utilisation devienne routinière.

II.3 Impact clinique de la présence de macroenzyme

Depuis leur découverte, certains auteurs ont souligné l'existence d'association possible entre macroenzymes et pathologies.

Il est important de distinguer les deux types de macroenzymes :

- ✓ les macroenzymes de type 1, formées par l'association d'une immunoglobuline et d'une enzyme ;
- ✓ les macroenzymes de type 2 plus hétérogènes sur le plan de leur structure.

II.3.1 Impact clinique des interférences analytiques dues aux macroenzymes

Comme précédemment décrit, la plupart des interférences analytiques attribuées aux macroenzymes dans la littérature se traduit par l'apparition d'une augmentation de l'activité enzymatique concernée. Les nombreux travaux publiés soulignent alors les examens complémentaires mis en place pour tenter d'expliquer cette particularité biologique. Dans les différentes descriptions rapportées, les patients ont été soumis à de nombreuses investigations plus ou moins invasives (29,37,39,58,81,85,94-95,97-103).

L'existence de résultats « normaux » voire diminués a également déjà été rapportée, la présence de ces macroenzymes passe alors régulièrement inaperçue (73,104,105).

Les impacts de ces interférences analytiques sont donc multiples :

- ✓ explorations complémentaires parfois invasives pour les patients (ou, à l'inverse, absence d'exploration) ;
- ✓ risque d'erreurs diagnostiques et thérapeutiques ;
- ✓ perte de temps pour les médecins ;
- ✓ source d'inquiétude pour le patient ;
- ✓ coût pour la société.

La plupart du temps, la conclusion des auteurs qui rapportent ces cas est identique : **la présence de la macroenzyme peut être la cause d'une erreur diagnostique et d'une exploration injustifiée**, source d'inquiétude pour le patient, l'équipe médicale et d'un surcoût pour la société (29,93,101).

Il est important de souligner que ces **interférences analytiques** ne sont **observées qu'à la condition que l'activité enzymatique soit maintenue sous forme de macroenzyme**. **Pour certaines macroenzymes, l'activité enzymatique peut être réduite**. Ceci peut donc conduire à une sous-estimation de l'activité enzymatique (106). Ceci a été notamment rapporté lors de la formation de macroLDH (62,104,105). Ces cas sont beaucoup moins fréquemment décrits dans la littérature. Pour les mettre en évidence, il est souvent nécessaire de faire des études prospectives.

La **quantité de macroenzymes présentes** dans le sang du patient **est également à prendre en considération**. Leurs présences en faible quantité limitent l'impact sur la mesure et ces macroenzymes passeront de ce fait inaperçues. Lang *et al.* ont observé que moins de 0,5% des patients qui présentent des macrocréatine kinases ont une augmentation pathologique de l'activité créatine kinase (73). Lee *et al.* ont observé lors d'une étude prospective, que 19% des patients qui présentent une macrocréatine kinase de type 1 et 79% avec une macrocréatine kinase de type 2, présentent des activités CK totales comprises dans

les valeurs de référence (107). Stein *et al.* rapportent que 75 patients sur 85 qui présentent une macroCK2 ont une activité CK totale comprise dans les valeurs de référence (108).

Ces conditions sont nécessaires pour avoir un impact clinico-biologique. Quelques enzymes sont plus fréquemment retrouvées dans ce type d'interférence :

L'activité des **créatines kinases** est augmentée dans trois situations principales : une atteinte des muscles squelettiques et cardiaque ou lors d'un traumatisme crânien. Depuis la mise en place de la quantification des troponines, l'**indication** du dosage des CK est essentiellement **la suspicion d'une atteinte du muscle squelettique**. La présence d'une macrocréatine kinase peut être la cause d'une erreur d'orientation diagnostique lors d'une surveillance biologique. Néanmoins, les CK-MB, plus cardiospécifiques, sont parfois encore prescrites lors d'une suspicion d'atteinte du muscle cardiaque ou réalisées systématiquement par l'automate au dessus d'un certain seuil de CK totales. Dans ce cas, la présence d'une macroCK peut être à l'origine d'une discordance entre la valeur des troponines et des CK-MB et être à l'origine d'explorations inutiles.

Concernant les interférences analytiques provoquées par les macroCK2, une équipe Japonaise a développé un réactif de dosage de l'activité des CK-MB qui est moins sensible aux effets de ces molécules. En effet, des anticorps anti CK mitochondriales inhibent l'activité induite par ces formes de l'enzyme (109). Watanabe *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'activité CK-MB mesurée par immunoinhibition et l'activité CK mitochondriales, prouvant ainsi que l'interférence observée est due à ces sous-unités qui sont à l'origine des macroCK2 (110).

Les **transaminases** peuvent également être concernées. Néanmoins, les transaminases [aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT)] étant en général dosées conjointement : **le risque d'erreur diagnostique semble moindre**. En effet, lors d'une augmentation très importante d'une seule transaminase, le biologiste doit être alerté d'un risque d'interférence analytique. Les macroaspartate aminotransférases (**macroASAT**) étant **plus fréquentes que** les macroalanines aminotransférases (**macroALAT**), une élévation isolée des ASAT peut être observée lors de la présence d'une macroASAT mais également dans de nombreuses circonstances pathologiques (lyse des cellules cardiaques, musculaires...) ou encore lors d'hémolyse (*in vitro* ou *in vivo*). Il faut donc systématiquement envisager toutes ces hypothèses cliniques avant d'évoquer la présence d'une macroASAT. Une augmentation des ALAT est plus spécifique d'une lyse hépatique et est combinée à la libération des ASAT.

Les **lactates déshydrogénases** sont des marqueurs de cytolysse dépourvus de spécificité cellulaire. De fait, une augmentation de l'activité de cette enzyme nécessitera une exploration complémentaire pour en déterminer l'origine. La présence de **macroLDH** pourra être **à l'origine de ces explorations**. Les LDH peuvent être utilisées dans le suivi des pathologies tumorales. Dans cette indication, le problème d'interférence est moins critique puisque seule la variation de l'activité est évaluée. Si une macroLDH est présente, cette dernière sera prise en compte dans ce suivi. En effet, la proportion entre l'enzyme et la macroenzyme reste identique puisque l'affinité de l'anticorps ne varie pas.

Les **enzymes hépatobiliaires (PAL, GGT)** sont parfois présentés sous la forme de macroenzymes. Dans ce cas précis, **la confusion diagnostique est peu probable**. En effet, la présence de ce type de macroenzymes est généralement **observée lors de tableaux de cholestase**. Or, l'indication de ces dosages est spécifiquement la mise en évidence de ces

troubles. De plus, la présence concomitante des deux macroenzymes est fréquemment observée, conduisant à un bilan biologique cohérent (augmentation de l'activité des GGT et des PAL) n'alertant ni le biologiste ni le clinicien sur la présence éventuelle de macroenzymes (59).

Depuis 2009, le dosage de l'**amylasémie** n'est officiellement plus recommandé par la Haute Autorité de Santé dans la prise en charge des pathologies pancréatiques (111). Néanmoins le dosage de l'amylasémie est encore utilisé dans l'exploration des pathologies des glandes salivaires (oreillons, parotidites...) et, dans ces cas, la présence d'une macroamylase peut être à l'origine d'une errance diagnostique (112). Des augmentations isolées de l'amylasémie ont été également décrites au cours de certains processus néoplasiques (ovaires, prostates, bronches). Une macroamylase peut être donc être à l'origine d'explorations inutiles visant à rechercher ces pathologies (113). Dans de rares cas, une association de macrolipase et macroamylase a été rapportée chez des patients souffrant de maladie cœliaque (114).

∞ **La mise en évidence des macroenzymes permet d'éviter d'effectuer des examens complémentaires inutiles voire des erreurs diagnostiques.**
∞ **Pour avoir un impact clinique, il est nécessaire que les macroenzymes soient en quantité suffisante et expriment une activité enzymatique.**
∞ **Les macroCK, les macrotransaminases, les macroLDH sont les macroenzymes les plus fréquemment impliquées dans la survenue d'erreurs diagnostiques.**

II.3.2 Macroenzymes de type 1

Il n'est toujours pas établi si la présence de macroenzyme de type 1 est la cause ou la conséquence des pathologies auxquelles elles sont classiquement associées.

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que les anticorps engagés dans ces complexes pouvaient être la cause des troubles observés. En effet, une fluctuation de la concentration de ces anticorps en fonction de la gravité de la pathologie sous-jacente a été rapportée dans de nombreuses études (31,35,46,57,61,63).

D'après Remaley et Wilding, les anticorps anti-enzymes peuvent être à l'origine d'une pathologie selon 3 mécanismes (37) :

- par dépôt de complexes immuns ;
- en interférant avec les fonctions de l'antigène (l'enzyme) ;
- par un effet cytotoxique direct dirigé contre la cellule qui exprime l'antigène.

Il a été notamment observé un lien particulier entre macroenzymes et **pathologies du système immunitaire**, telles que polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, lupus érythémateux disséminé, cryoglobulinémies, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ...(37,115–117) Crofton *et al.* ont remarqué que 74% des patients présentant des macroPAL souffrent d'une pathologie auto-immune (118).

De plus, dans de nombreux cas, des signes biologiques d'altération de l'immunité tels qu'une augmentation de la concentration des gammaglobulines, une augmentation du ratio lymphocytes T helpers / lymphocytes T suppresseurs ou encore la présence d'anticorps anti-nucléaires ont été observés (19,37,61).

Bien que différents articles soulignent le lien existant entre perturbations du système immunitaire et apparition des macroenzymes, aucune revue de la littérature n'a pu mettre en évidence de corrélation incontestable entre ces deux variables (53,59). Cependant, certains

auteurs avancent que bien que fréquemment bénins, ces phénomènes sont étroitement liés à des états auto-immuns (119).

Par ailleurs, il a été constaté que la **prévalence d'un certain nombre de macroenzymes croît avec l'âge des patients**, notamment pour les macroCK, macroamylases et macroLDH. Ces macroenzymes sont surtout observées chez des personnes qui ont plus de 60 ans (59). En revanche, les macroASAT sont décrites préférentiellement chez des individus plus jeunes. Cette particularité n'est actuellement pas expliquée (120). Il est bien démontré que le vieillissement est associé à une dérégulation du système immunitaire, appelée immunosénescence (121). Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas déterminé si l'apparition des macroenzymes est une conséquence de l'immunosénescence ou une simple coïncidence.

Deux types de macroenzymes ont été particulièrement étudiées : les macroamylases et les macroCK.

Les macroamylases ont été isolées les premières et leur prévalence semble être relativement importante. De plus, la mise en évidence des macroamylases est relativement aisée (calcul de la clairance rénale de l'amylase). Elles ne semblent pas être particulièrement associées à une pathologie.

En ce qui concerne la macroCK, les circonstances de leur apparition ont incité à les étudier de manière plus approfondie. Il y a encore peu de temps, les CK et le dosage des CK-MB, très sensible aux interférences provoquées par ces macroenzymes, étaient les examens biologiques de référence pour mettre en évidence un syndrome coronarien aigu. De plus, les macroCK2 semblent être associées à des troubles sévères poussant les différents auteurs à les étudier plus particulièrement (53,59).

Logiquement les pathologies rencontrées peuvent concorder avec celles correspondant à l'indication des prescriptions. Par exemple, d'après Lee *et al.* plus de 50% des patients présentant une macroCK de type 1 souffrent de myosites d'origine auto-immunes, tumorales ou iatrogènes. Une part non négligeable de patients souffrant d'atteintes cardiaques est aussi décrite (107). Les macroCK1 ont été décrites lors d'infections respiratoires, d'infections digestives chroniques, de pathologies cardiovasculaires ou encore lors de désordres immunologiques (100). Au cours d'une étude portant sur des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la présence d'une macroCK1 semblait être plus en faveur d'une rectocolite ulcérohémorragique que d'une maladie de Crohn (122).

Galasso *et al.* ont recensé les différentes pathologies retrouvées lors de la découverte d'une macroenzyme (cf. tableau 5). Celles-ci sont très variées et aucun lien physiopathologique n'a pu être clairement établi entre ces différents tableaux cliniques.

| Type de pathologies | Tableaux cliniques associés à la présence de macroenzyme |
|---------------------|--|
| Auto-immunes | thyroïdites, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjörger |
| Cardiovasculaires | infarctus du myocarde, hypertension, arrêt cardiaque, insuffisance cardiaque congestive, fibrillation atriale, maladie vasculaire périphérique |
| Endocrines | diabète de type 1, hypothyroïdie, thyroïdites, goitre multinodulaire |
| Gastro-intestinales | pancréatite chronique, hépatite, occlusion intestinale, maladie de Crohn, carcinome pancréatique |
| Hématologiques | anémie, lymphome |
| Infectieuses | pyélonéphrite, pneumonie, mastite, bactériémie |
| Tumorales | carcinome hépatique, tumeurs pancréatiques, gynécologiques, pulmonaires prostatiques, vésicales |
| Pulmonaires | broncho-pneumopathie chronique obstructive, pneumonie, emphysème |
| Rénales | insuffisances rénales chroniques et aiguës, pyélonéphrite |
| Rhumatologiques | goutte, pseudogoutte, ostéoarthrites, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjörger |

Tableau 5 : Les pathologies observées lors de la découverte d'une macroenzyme, d'après Galasso *et al.* (120)

La diversité des pathologies peut, en partie, s'expliquer par le recrutement de certaines études. En effet, la plupart d'entre elles s'effectuent en milieu hospitalier ce qui biaise le recrutement. **Dans un certain nombre de cas**, les sujets ne présentent **pas de pathologie en lien avec la macroenzyme retrouvée**. Caropreso *et al.* ont effectué un suivi au long court d'enfants asymptomatiques présentant des macroASAT, il n'a pas été mis en évidence de pathologies spécifiques (123).

Certains auteurs ont tenté d'évaluer la prévalence des macroenzymes. Les chiffres avancés sont à prendre avec précaution. En effet, la plupart des études dites de prévalence sont réalisées sur des populations de patients hospitalisés. Même lorsqu'elles sont réalisées chez des patients « tout venant », les populations retenues sont des individus pour lesquels un dosage de l'enzyme a été demandé au préalable, induisant donc un **biais de sélection**. Aucune étude de prévalence n'a été menée sur une population de patients sans sélection préalable. La plupart des études sont des études descriptives et non de réelles études épidémiologiques. De plus, dans de nombreux cas, un biais supplémentaire est observé. En effet, la recherche de macroenzyme n'a été effectuée que chez des patients présentant une augmentation de l'activité enzymatique. Par exemple, Weijers *et al.* ont estimé la prévalence de macroLDH dans une population importante (plus de 20000 sérums) mais la recherche de macroLDH n'a été effectuée que chez les patients présentant une activité LDH au-delà des valeurs de référence (124).

La prévalence des macroenzymes est probablement :

- sous-estimée lorsque la recherche de la macroenzyme n'est effectuée que lors d'une augmentation de l'activité enzymatique ;
- sur-estimée lorsque la population a été sélectionnée par la prescription d'un dosage enzymatique.

Le tableau ci-dessous donne un aperçu des « prévalences » des macroenzymes.

| Macroenzyme | Données cliniques | Prévalence ¹ | Descriptif de la population |
|---------------------|---|--|--|
| Amylase | Contexte pathologique variable (alcoolisme, pancréatites, cancer, diabète, cholestase, maladies auto-immunes) | 1-4,6% chez des patients présentant une amylasémie normale 2,5-9,6% chez des patients présentant une amylasémie augmentée | n = 2447 (19) n = 313 (19) |
| lipase ² | Maladie de Hodgkin, maladie cœliaque, cirrhose hépatique cryptogénique | Absence de données | |
| CPK | Contexte pathologique variable (troubles GI, cardio-vasculaires, tumeurs, pulmonaire) voire absence de pathologies | 0,4 à 3 % | 6 études portant sur 300 à 5000 patients (69,126–130) |
| ASAT | Contexte pathologique variable (troubles hépatiques, tumeurs, douleurs abdominales...) voire absence de pathologies | 38% des enfants sains présentant une augmentation de l'activité des ASAT, Absence de données chez les adultes | n = 44 patients (123) |
| ALAT | Hépatopathies chroniques | 0.03% | n = 500 patients avec des hépatopathies chroniques(49) |
| PAL | Contexte pathologique variable (troubles hépatiques, maladies auto-immunes) | 0,1% chez sujets tout venant 0.3-0.4% lorsque des demandes de recherche des isoenzymes | n = 25000 (117) n = 2500 (131) |
| GGT | Pathologies hépatobiliaires | Absence de données | |
| LDH | Contexte pathologique variable (maladies auto-immunes, troubles cardiaques, hépatiques, diabètes, fatigue ...) voire absence de pathologies | 0,03% | n = 21800 uniquement chez des patients qui présentent une activité LDH augmentée (124) |
| Phosphatase acide | Contexte pathologique variable (pathologies auto-immunes, tumorales) | Absence de données | |

Tableau 6 : Macroenzymes de type 1 : lien avec les pathologies et prévalence (53,59,107,123,132–134).

¹ En l'absence de précision, les prévalences sont établies sur la population générale.

² Le premier cas décrit de macrolipase concerne un patient atteint de la maladie de Hogkin (46). Depuis quelques cas ont été décrits mais sans réellement préciser le type de pathologies si ce n'est une maladie cœliaque ou une cirrhose hépatique cryptogénique (114,125).

En pratique, Remaley et Wilding conseillent **lors de la découverte d'une macroenzyme de type 1** de rappeler aux prescripteurs la **possibilité d'être en présence d'une pathologie auto-immune** (37). En effet, il n'est pas exclu que l'existence d'une macroenzyme soit un facteur de risque envers ces pathologies. C'est pourquoi, bien que considérée comme un phénomène *a priori* bénin, la présence d'une macroenzyme doit nécessiter une surveillance. *A minima*, **l'existence d'une macroenzyme doit être précisée dans le dossier médical** de manière à éviter toute investigation ultérieure inutile. Cette dernière peut perdurer dans le sang du patient pendant des années, voire des dizaines d'années (89).

Les macroenzymes de type 1 :

∞ **Aucun lien formel avec une pathologie n'a été mis en évidence.**

∞ **Suspicion de l'implication d'une perturbation du système immunitaire (maladie auto-immunes, immunosénescence).**

∞ **Le biologiste doit alerter le clinicien sur le lien éventuel avec une pathologie du système immunitaire.**

II.3.3 Macroenzyme de type 2

II.3.3.1 Macrocréatine Kinase

Les macrocréatines kinases de type 2 sont associées à la libération de CK mitochondriale, consécutive à un stress mitochondrial. Ces dernières sont rapidement dégradées en dimère puis éliminées par le rein. Il est nécessaire d'avoir une lyse importante des cellules ou d'avoir une circonstance qui favorise leur stabilité dans la circulation pour pouvoir détecter leur présence (71,72). Leur libération semble donc associée à une lyse des cellules ayant une activité métabolique importante.

La prévalence des macroCK2 est comprise entre 0,4 et 3,7%, les taux les plus importants sont retrouvés lors d'études effectuées chez des patients hospitalisées (135).

Différentes études soulignent l'association des macroCK2 à des pathologies sévères : **pathologies hépatiques sévères** ou **tumeurs malignes métastasées** (sein, côlon, poumon, estomac et prostate). Leur présence est aussi décrite lors d'infarctus du myocarde étendus (37,107).

La découverte d'une macroCK2 chez un patient affecté d'une néoplasie suggère l'existence d'une tumeur primitive mal contrôlée ou d'une dissémination métastatique (136,137). Stein *et al.* ont mis en évidence que 41% des patients présentant une macroCK2 ont une pathologie tumorale et que chez 24% des patients souffrant d'une tumeur, une macroCK2 est isolée (108). C'est la raison qui explique que certains auteurs ont envisagé d'utiliser les macroCK2 comme marqueurs tumoraux (138). Wright and Liggett recommandent d'effectuer des explorations non invasives (dosage de l'antigène spécifique de la prostate, du CA-125, de l'antigène carcinoembryonnaire, mammographie, radiographie pulmonaire...) à la recherche d'une tumeur maligne lors d'une élévation des CK et/ou CK-MB chez un patient qui ne présente pas de pathologies cardiaques ou musculaires (139).

Chez l'enfant, en revanche, les macroCK2 semblent être associées à des pathologies du muscle cardiaque (69).

L'activité créatine kinase est peu élevée lors de la présence d'une macroCK2 (en général < 100 UI/L) par rapport à ce qui est observé avec les macroCK1 (généralement > 500 UI/L) (107).

II.3.3.2 Macroenzymes du système hépatobiliaire (GGT, PAL et leucine aminopeptidase)

Les macroenzymes du système hépatobiliaire concernent principalement 3 enzymes : **la gammaglutamyl transférase (GGT)**, **la leucine aminopeptidase** (aussi dénommée alanine aminopeptidase) et **la phosphatase alcaline (PAL)**.

Leurs circonstances d'apparition et leurs modes de formation sont identiques. Ce sont des enzymes à prédominance membranaire et présentes à des concentrations élevées au niveau hépatique.

L'association de l'enzyme avec une lipoprotéine est dépendante de la nature physicochimique de l'enzyme. Les formes hydrophiles présentes dans la circulation sanguine, chez les sujets sains, ne se lient pas aux lipoprotéines. En revanche, les formes amphiphiles **s'agrègent avec les lipoprotéines** et sont retrouvées prioritairement **lors d'atteintes hépatiques**. Dans le cas des PAL, ces formes ont été décrites uniquement chez des sujets atteints de troubles hépatiques cholestatiques (60).

Certains travaux ont essayé de déterminer si la présence de ces complexes avait un intérêt en biologie clinique notamment lors de l'exploration de troubles hépatiques (cholestases, cirrhoses, tumeurs hépatiques). A l'heure actuelle, la détermination de la composition de ces complexes ne semble pas apporter une valeur ajoutée à l'exploration dans la pratique quotidienne au vu des autres moyens diagnostiques (60,140–142).

II.3.3.3 Macroamylases

Take *et al.* ont été les premiers à décrire la possibilité de formation d'une macroamylase due à l'interaction de cette enzyme avec des polysaccharides (143). Par la suite, la démonstration a été faite que des perfusions d'hydroxyéthyle amidon avaient la propriété de former des macroamylases, isolées encore 4 jours après l'arrêt de la perfusion. Il n'est pas retrouvé dans ces expériences de variation des activités de la lipase, ASAT, LDH, PAL ou GGT (25,26). Les héparines, dextran, gélatines ou le saccharose ne semblent pas être responsables de la formation de macroamylase (19).

Aucune donnée de prévalence n'est disponible dans la littérature. Il faut garder à l'esprit que son **origine est iatrogène** ; par conséquent, l'histoire du patient doit orienter la démarche diagnostique dans ce cas.

Les macroenzymes de type 2 semblent corrélées à la présence de certaines pathologies :

- ∞ **Les macroCK2 sont souvent associées à des pathologies sévères : pathologies hépatiques sévères ou tumeurs malignes métastasées.**
- ∞ **Les macroamylases de type 2 sont parfois d'origine iatrogène.**
- ∞ **Les macroenzymes du système hépatobiliaire sont associées à des atteintes hépatiques (notamment des troubles cholestatiques).**

III Mise en évidence d'une macroenzyme liée aux médicaments

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme du CHRU de Nancy dirigé par le Pr Guéant. Elle a été menée durant mon stage d'interne dans ce service qui a été effectué de novembre 2009 à mai 2010.

III.1 Objectif de l'étude

Au sein du service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme du CHU de Nancy, toute activité CK supérieure aux valeurs de référence (145 UI/L) déclenche systématiquement un dosage de l'activité des iso-formes CK-MB. Ce dosage, effectué par une technique d'immunoinhibition, permet d'évaluer l'activité CK cardiospécifique. **Un rapport CK-MB/CK totale supérieur à 5% ou une activité CK-MB \geq 24 UI/L** sont considérés comme des marqueurs de nécrose cardiaque. De façon récurrente, il a été noté l'existence de CK totales élevées avec CK-MB augmentées chez des patients suivis au service de maladies infectieuses. Les dosages de la **troponine Ic**, marqueur cardiospécifique, prescrits chez ces patients étaient régulièrement **inférieurs au 99^{ème} percentile** (0,04 μ g/l) et permettaient d'exclure une nécrose cardiaque. Ces observations nous ont conduits à initier une étude pour déterminer l'origine de ces discordances biologiques.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1 Description de la population

Ces patients, suivis en consultation au service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHRU de Nancy, étaient tous **infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**.

L'activité des CK est surveillée chez ces patients pour dépister d'éventuels problèmes musculaires. En effet, pour limiter les troubles dyslipidémiques induits par les antirétroviraux, des médicaments de la classe des statines (inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase) ou des fibrates sont nécessairement ajoutés à l'arsenal thérapeutique. Ces hypolipémiants sont particulièrement décrits pour provoquer des myopathies qui peuvent aller jusqu'à la rhabdomyolyse (144,145). De plus, l'infection par le VIH par elle-même et les thérapeutiques antirétrovirales peuvent être à l'origine de troubles musculaires. L'introduction des traitements a considérablement transformé l'histoire naturelle de l'infection grâce au contrôle de la réplication virale. Cependant, l'allongement de la survie des individus infectés est associé à une prévalence croissante des effets indésirables iatrogènes (146). Si les augmentations importantes de l'activité des CK (supérieures à deux fois les valeurs de référence) sont classiquement associées à des symptômes musculaires, les élévations modérées n'ont, en général, pas d'impact sur la prise en charge des patients (147,148).

Seize dossiers de patients présentant ces anomalies (CK > 145 UI/l et CK-MB > 24 UI/L et ratio CK-MB/CK totales \geq 5%) ont été sélectionnés de novembre 2009 à février 2010, par les biologistes sensibilisés à ces discordances, lors de la validation biologique. Les échantillons de plasma résiduel ont systématiquement été conservés à -20°C dans le but d'explorer ces discordances.

Cette population est composée de 7 femmes et 9 hommes. La médiane d'âge est de 46 ans [compris entre 24 et 87 ans].

La médiane de l'activité des CK totales et des CK-MB est respectivement de 181 UI/L [147-716 UI/L] et de 39 UI/L [24-80 UI/L]. Les ratios CK-MB/CK totales sont compris entre 5 et 54%.

Aucun patient ne présentait de coronaropathie. Les dosages de troponine Ic réalisés chez ces patients étaient négatifs. Cette apparente discordance entre les résultats des dosages des CK-MB et de la troponine permettait de suspecter l'existence d'une interférence analytique.

La médiane de délai depuis le diagnostic de l'infection par le VIH est de 13 ans, avec des extrêmes très variable allant de 4,7 ans à 21 ans. Quatorze patients sur seize étaient traités efficacement (charge virale < 40 copies/ml de plasma). Les traitements antirétroviraux utilisés chez ses patients faisaient appel à des molécules très variables (ténofovir, emtricitabine, ritonavir, atazanavir, efavirenz...).

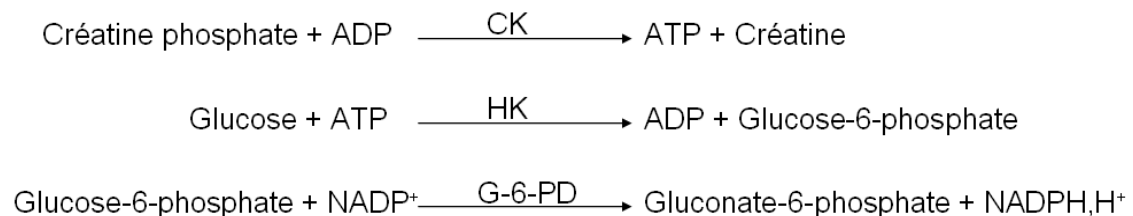
III.2.2 Techniques biochimiques utilisées

III.2.2.1 Dosage des CK totales

La créatine kinase (CK, EC 2.7.3.2) catalyse la phosphorylation réversible de la créatine par l'adénosine triphosphate (ATP). Cette enzyme est présente en quantité variable dans les tissus. Les quantités les plus importantes sont retrouvées au niveau du muscle squelettique puis dans les tissus cérébraux et cardiaques.

Dans le plasma de sujets sains, l'activité CK totales varie en fonction de la masse musculaire et augmente lors d'exercice musculaire. Des élévations pathologiques peuvent être retrouvées lors d'atteintes du muscle squelettique ou du muscle cardiaque.

Depuis 2002, l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) a émis des recommandations pour effectuer le dosage de l'activité CK. Le dosage doit s'effectuer à 37°C et le principe réactionnel est le suivant (149):



CK : Créatine kinase

HK : Hexokinase

G-6-PD : Glucose-6-phosphate deshydrogénase

Figure 11 : Principe de la mesure de l'activité CK.

L'activité CK est mesurée à pH 6,50 par le suivi de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, conséquence de la réduction du NADP⁺ en NADPH, H⁺.

Au laboratoire le dosage est réalisé sur des automates Olympus AU 2700 (Olympus Diagnostic Systems Beckman-Coulter® France, Villepinte, France).

III.2.2.2 Dosage des CK-MB

Les isoenzymes CK sont composées de deux sous-unités M (« muscle ») et B (« brain », cerveau) qui sont associées en dimère. Ces sous-unités sont codées par des gènes

différents. L'association de sous-unité B et M conduit à l'existence de 3 isoenzymes, la CK-BB, la CK-MB et la CK-MM qui diffèrent par leurs répartitions tissulaires.

La CK-BB prédomine dans le cerveau, la prostate, le tractus digestif, la vessie, l'utérus, la thyroïde et le placenta. Sa concentration dans la circulation sanguine est négligeable. La CK-MM prédomine dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque. La CK-MB représente environ 20% de l'activité CK totale du muscle cardiaque et est présente en faible proportion dans les autres tissus, ceci en fait une enzyme particulièrement cardiospécifique. Une atteinte d'origine cardiaque s'accompagne d'une augmentation des activités CK-MB au delà de 5% de l'activité CK totale.

Au laboratoire, son dosage est réalisé sur des automates Olympus AU 2700 (Olympus Diagnostic Systems Beckman-Coulter® France, Villepinte, France) par une technique d'immunoinhibition. Le principe repose sur une mesure de l'activité CK après neutralisation de l'activité issue des sous-unités M. L'utilisation d'anticorps anti-sous-unité M inhibe cette activité pour ne mesurer que celle issue des sous-unités B qui est multipliée par deux pour refléter l'activité des isoenzymes CK-MB. Cette technique est basée sur le principe que seules les isoenzymes CK-MM et CK-MB sont présentes dans le plasma. Les autres formes de CK sont théoriquement présentes en quantité négligeable. Si l'activité CK-MB est supérieure à 25% de l'activité CK totale, il faut envisager une erreur analytique provoquée par la présence de ces formes moléculaires ou par la présence de macroCK.

III.2.2.3 Dosage des troponines Ic

Les troponines sont actuellement considérées comme les marqueurs de référence de la nécrose myocardique sur la base de leur excellente sensibilité et de leur cardiospécificité (6).

Les troponines sont des protéines qui interviennent dans la régulation de la contraction musculaire en formant un complexe avec la tropomyosine qui se fixe au filament d'actine. La troponine de ce complexe est formé d'un hétérotrimère formé de trois molécules différentes : la troponine C (TnC), la troponine I (TnI) et la troponine T (TnT). Des iso-formes des troponines T et I, qui sont codées par des gènes différents, sont spécifiques du muscle cardiaque (cTnI et cTnT). Lors d'une nécrose cardiaque l'ensemble des formes de troponine sont relarguées dans la circulation mais les iso-formes cardiaques sont spécifiques de l'origine de la nécrose. Elles circulent sous forme libre ou sous forme de complexes de plusieurs molécules de troponines d'iso-formes variables. De plus, une fois dans la circulation, ces différents complexes moléculaires vont subir une protéolyse variable en fonction de leur composition. Ces différents paramètres compliquent la mise au point d'anticorps spécifiques d'une iso-forme (6).

Les dosages actuels de troponine ne sont pas standardisés en raison de la diversité des anticorps disponibles dans les différentes trousse de dosage.

Les recommandations des sociétés savantes de cardiologie américaines et européennes établissent la troponine comme marqueur de choix dans le diagnostic des syndromes coronariens aigus. Le seuil diagnostique proposé est la valeur du 99^e percentile d'une population de référence. A ce seuil l'imprécision totale doit rester inférieure à 10% (6,150). Cette valeur très faible fait qu'en pratique les seuils retenus correspondent à la valeur la plus basse présentant une imprécision de 10%. Néanmoins, certains industriels commencent à proposer des trousse de dosage qui répondent à ces recommandations (TnT hs Roche®, TnIc us Siemens®) (6). En plus de la précision du dosage, le temps écoulé entre le prélèvement et le rendu du résultat au clinicien (TAT : Turnaround time) doit être inférieur à une heure (151).

Dans notre étude, les dosages de troponines Ic ont été réalisés par une technique immunométrique sur l'automate Access AccuTnI utilisant une révélation par chimiluminescence (Beckman-Coulter® France, Villepinte, France).

III.2.2.4 Electrophorèse des isoenzymes des CK

L'électrophorèse des isoenzymes des CK a été réalisée par séparation des iso-formes sur gel d'agarose en milieu alcalin (pH = 8,4) suivant les indications du fournisseur (Sebia[®], Évry, France). Sur le plan analytique, les isoenzymes des CK (CK-MM, CK-MB et CK-BB) diffèrent par leur mobilité électrophorétique.

Le dépôt de l'échantillon s'effectue au niveau cathodique. Les bandes, une fois séparées, sont révélées par une réaction colorimétrique. La première étape de la cascade de réaction de révélation est limitante et repose sur les propriétés créatines kinases. La dernière étape consiste en une réduction du nitrobleu de tétrazolium entraînant ainsi la formation d'un précipité de formazan qui est proportionnel à l'activité CK. La lecture est effectuée par un scanner et est quantifiée grâce au logiciel Phoresis (Sebia[®], Évry, France). Le logiciel détermine le pourcentage correspondant à chaque sous-unité et calcul la valeur absolue d'activité à partir du résultat de l'activité des CK totales.

La CK-BB est la fraction la plus anodique, CK-MM la plus cathodique et la fraction CK-MB présente une mobilité intermédiaire.

L'interprétation tient compte à la fois de la proportion des différentes iso-formes (CK-MM, CK-MB et CK-BB) ainsi que de la présence éventuelle d'une bande anormale constituée par les macroCK.

Les macroCK1 ont une migration intermédiaire comprise entre les CK-MM et les CK-BB. Les macroCK2 présentent la particularité d'avoir une migration cathodique leur conférant une migration « inversée » par rapport aux autres sous-unités.

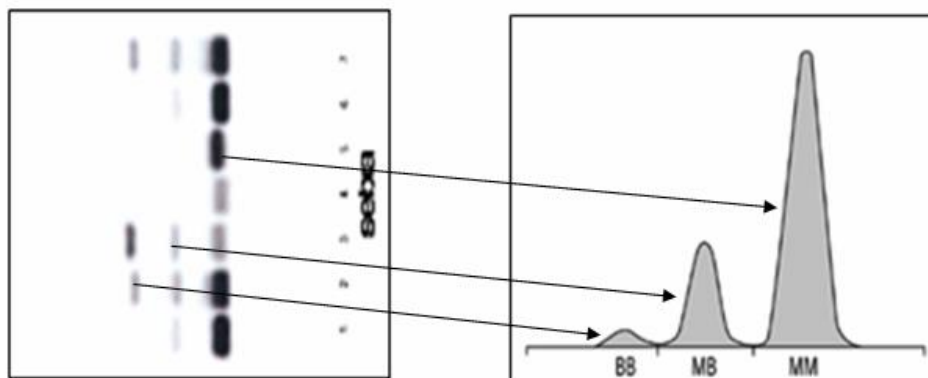


Figure 12 : Profil de migration des isoenzymes des CK

III.3 Résultats

III.3.1 Résultats biochimiques

Les 16 patients présentent une bande anormale, correspondant à **la présence d'une macroCK de type 2**. Les macroCK2 représentent une proportion comprise entre 1,2 et 21,4% de l'activité des CK totales.

Chez deux patients, la présence de CK-MB est également observée représentant une activité de 1,9% et 9,8%.

L'activité totale des CK est modérément élevée chez nos 16 patients (médiane 181 UI/L [147-716 UI/L]). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Lee *et al.* qui ont mis en évidence que la présence de macroCK2 augmente l'activité des CK totales de manière modérée, à l'inverse des macroCK1 qui semblent avoir un impact plus important sur l'augmentation de l'activité des CK totales (107).

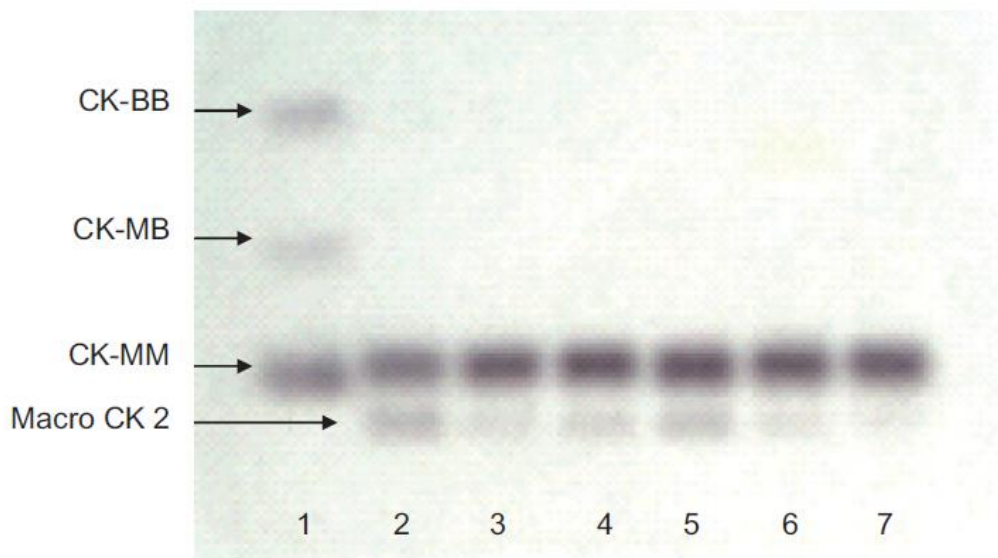


Figure 13 : Electrophorèse des iso-CK chez les patients étudiés.

Electrophorèse réalisée en fonction des données du fournisseur (Hydragel 7 iso-CK, Sebia®, Évry, France). La ligne 1 correspond au contrôle et présente les trois bandes correspondant aux isoformes CK-MM, CK-MB et CK-BB. Les lignes 2 à 7 correspondent aux patients, une bande atypique est présente qui correspond à une macroCK2.

| | | Dosages réalisés sur AU 2700 | | | Electrophorèse des isoenzymes (Hydragel 7 iso-CK, Sebia®, Évry, France) | | | Access AccuTnI |
|------|-------|--|-----------------------------|--------------|--|-----------------|--------------|------------------------|
| | | Activité CK (UI/L) | Activité CK-MB (UI/L) | CK-MB (%) | MacroCK1 (%) | MacroCK2 (%) | CK-MB (%) | Troponine Ic (µg/l) |
| Sexe | VR | Femmes < 145 UI/L hommes < 171 UI/L | < 24 UI/L | < 4% | Indétectable | Indétectable | < 4% | < 0,04 µg/l |
| | | | | | | | | |
| | Femme | 147 | 80 | 54 | | 21,4 | | < 0,04 |
| | Homme | 151 | 38 | 25 | | 3,9 | | < 0,04 |
| | Femme | 154 | 34 | 22 | | 6,9 | | < 0,04 |
| | Femme | 155 | 40 | 26 | | 9,1 | | < 0,04 |
| | Femme | 167 | 55 | 33 | | 12,7 | | < 0,04 |
| | Homme | 168 | 37 | 22 | | 5,3 | | < 0,04 |
| | Femme | 173 | 31 | 18 | | 3,4 | | < 0,04 |
| | Homme | 176 | 61 | 35 | | 6,1 | | < 0,04 |
| | Homme | 186 | 32 | 17 | | 3,7 | | < 0,04 |
| | Homme | 186 | 37 | 20 | | 6,4 | | < 0,04 |
| | Femme | 213 | 24 | 11 | | 1,2 | | < 0,04 |
| | Femme | 243 | 60 | 25 | | 4,5 | 9,8 | < 0,04 |
| | Homme | 268 | 42 | 16 | | 2,3 | 1,9 | < 0,04 |
| | Homme | 321 | 76 | 24 | | 5,2 | | < 0,04 |
| | Homme | 438 | 46 | 11 | | 2,1 | | < 0,04 |
| | Homme | 716 | 36 | 5 | | 2,6 | | < 0,04 |

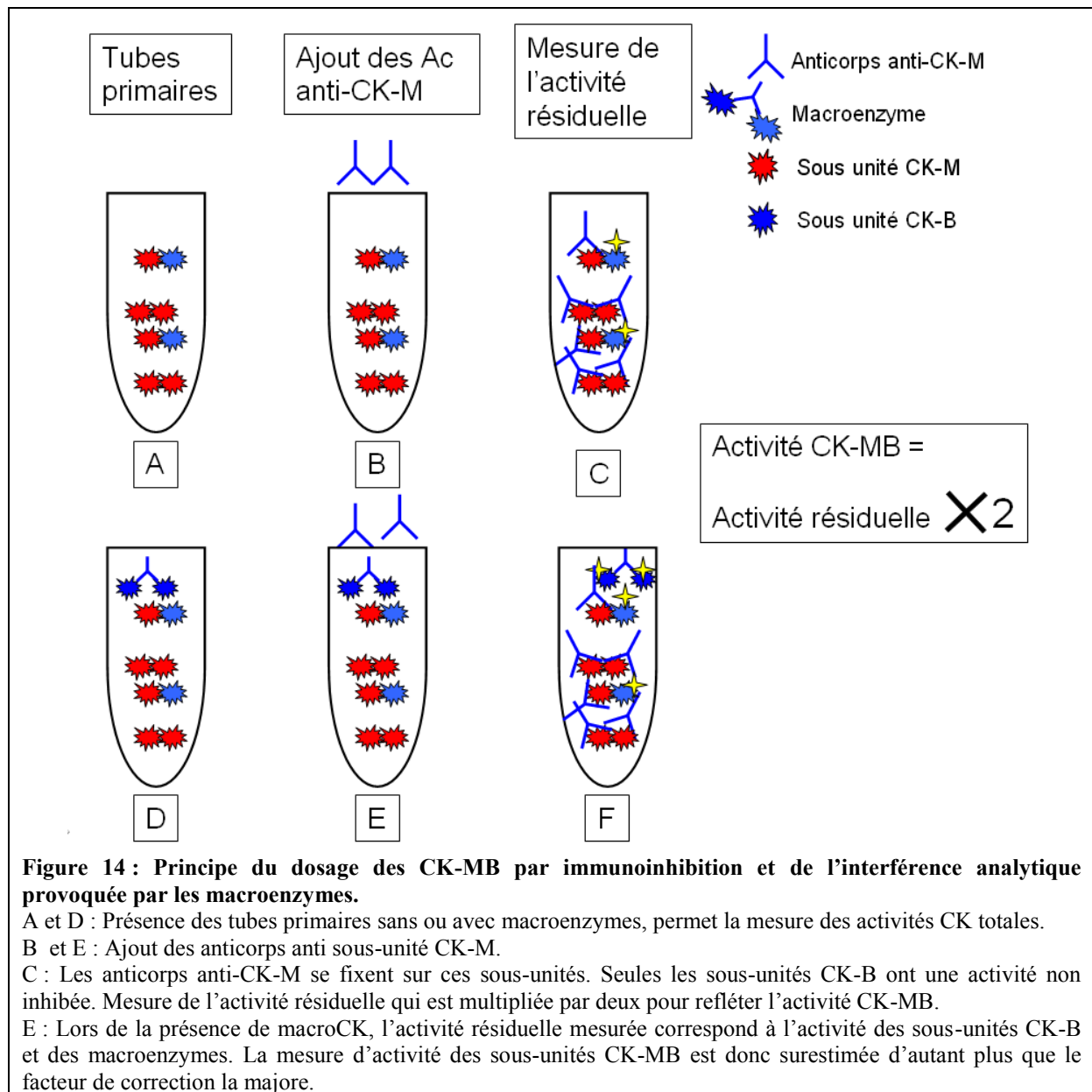
Tableau 7 : Synthèse des différents dosages et quantification des macroCK2 par électrophorèse.

Dosages des CK, CK-MB, troponine Ic et résultat de l'électrophorèse des iso-CK réalisés chez les 16 patients étudiées.

III.3.2 Conclusion biologique

Cette discordance biologique entre une augmentation des CK-MB et des troponines indétectables en dehors de tout contexte évocateur d'une pathologie coronarienne ou d'une nécrose cardiaque fait évoquer une interférence analytique. Les résultats obtenus sont en faveur d'une interférence provoquée par les macroCK2 lors du dosage des CK-MB.

Les dosages des CK-MB effectués par immunoinhibition sont pris en défaut lors de la présence de CK mitochondriales (MtCK) ou de CK-BB (152). C'est pourquoi la présence d'une macroCK, quel que soit son type, perturbe le dosage des CK-MB. En effet les macroCK de type 1 sont fréquemment composées de sous-unités CK-B et celles de type 2 sont formées par auto-polymérisations de CK mitochondriales. La mesure de l'activité est donc inexacte dans ces deux cas de figure.



La discordance observée entre les dosages des CK-MB et des troponines est expliquée par l'interférence observée en présence de macroCK.

Une interférence lors de la mesure de l'activité totale des CK peut également être observée en présence de macroCK2 mais cette augmentation reste généralement modeste (107). Lors du dosage des CK-MB par immunoinhibition, l'utilisation d'un facteur correctif augmente artificiellement l'importance de l'interférence, ce qui rend ce dosage beaucoup plus sensible à la présence de ces macrocomplexes.

La présence de macroCK2 chez ces patients doit faire évoquer les pathologies qui sont fréquemment associées à la présence de cette macroenzyme.

Ces pathologies sont essentiellement de deux types :

- ✓ les hépatopathies sévères ;
- ✓ les tumeurs métastasées.

III.3.3 Exploitations des données cliniques et thérapeutiques

Il a été convenu en accord avec les Professeurs May et Rabaud de consulter *a posteriori* les dossiers cliniques des patients inclus. Cette exploitation des données a été réalisée dans l'objectif de rechercher la présence d'une éventuelle étiologie expliquant l'apparition de cette macroenzyme. Tous les patients concernés font partie de la cohorte NADIS, cohorte déclarée auprès de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). Cette cohorte permet le suivi des patients séropositifs au VIH. Après une information orale, chaque patient signe un consentement autorisant l'utilisation des données médicales à des fins d'études cliniques.

Aucun de ces patients ne présente de troubles cardiovasculaires.

Une recherche d'éventuels troubles hépatiques a été effectuée. Le rapport ASAT/ALAT est compris entre 0,63 et 1,63 (la médiane est de 1,13). Aucun patient ne présente de cirrhose. Néanmoins, quatre patients sont co-infectés par des virus hépatotropes : deux sont infectés par le virus de l'hépatite C (charge virale détectable) et deux autres présentent des anticorps HBc isolés avec une charge virale négative. La présence des macroCK2 ne semble pas être d'origine hépatique.

Quatre patients souffrent de pathologies tumorales, composées d'une tumeur mammaire, d'un adénocarcinome de la prostate avec des métastases osseuses, d'un carcinome cutané et d'un sarcome de Kaposi.

Les étiologies traditionnelles de macroCK2 ne semblent pas expliquer (en tout cas pour l'ensemble des patients) **la présence de cette macromolécule.**

Nous avons également pris en compte la fonction rénale de ces patients. En effet, une insuffisance rénale pourrait expliquer une accumulation des macroenzymes consécutive à une diminution de la clairance rénale. Seuls deux patients ont un débit de filtration glomérulaire légèrement diminué (calcul du MDRD¹ : 49 et 42 ml/min/1,73m²) et deux autres présentent une protéinurie. Il est à noter que la protéinurie n'a pas été recherchée chez l'ensemble des patients. Les protéines urinaires ont été dépistées grâce à des bandelettes sans dosage quantitatif. Néanmoins, ces résultats ne sont pas en faveur d'une accumulation de la macroenzyme secondaire à un défaut d'élimination.

Devant l'**absence de lien clinique évident**, une recherche de corrélation avec les thérapeutiques a été réalisée. L'ensemble des patients reçoivent du ténofovir en association à d'autres molécules : emtricitabine (n=13), ritonavir (n=6), atazanavir (n=6), efavirenz (n=5), nevirapine (n=1), abacavir (n=1), saquinavir (n=1), lopinavir (n=1) et didanoside (n=1).

Les détails de ces traitements sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

| | nombre | âge | Délai écoulé depuis le diagnostic de l'infection (années) | charge virale non détectable | traitements | | | | | |
|--------|--------|------------|---|------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------|------|-----------|------------|
| | | | | | TDF | durée du traitement de TDF (mois) | FTC | EFV | Ritonavir | Atazanavir |
| femmes | 7 | 39 (33-67) | 12 (4,66-13) | 6/7 | 7/7 | 12 (1-37) | 6/7 | 4/7 | 5/9 | 1/7 |
| hommes | 9 | 45 (27-61) | 14,75 (5-21) | 8/9 | 9/9 | 15 (1-81) | 7/9 | 1/9 | 1/7 | 5/9 |
| Total | 16 | 45 (27-67) | 13 (5-21) | 14/16 | 16/16 | 14 (2-48) | 13/16 | 5/16 | 6/16 | 6/16 |

Tableau 8 : Résumé des caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients présentant une macroCK2

TDF : ténofovir FTC : emtricitabine ; EFV : efavirenz

¹ Modified of Diet in Renal Disease (153)

Ces résultats nous ont incités à émettre l'hypothèse d'un **lien probable entre le traitement par ténofovir et l'apparition d'une macroCK2** dans le sang des patients. Pour compléter ces données, nous avons souhaité mettre en place une étude rétrospective portant sur l'ensemble des dossiers clinico-biologiques des patients infectés par le VIH et suivis pendant la même période que les 16 patients précédemment inclus (novembre 2009 à février 2010).

III.3.4 Analyse de 557 dossiers clinico-biologiques des patients infectés par le VIH et estimation de la prévalence des macroCK2 dans cette population.

Les 580 dossiers des patients porteurs du virus HIV suivis en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales entre le 1 novembre 2009 et le 28 février 2010 et chez lesquels un dosage des CK a été réalisé, ont été sélectionnés.

L'extraction des données clinico-biologiques a été effectuée via le logiciel du laboratoire (Glims[®], société MIPS, Gent, Belgique) en croisant les données concernant le dosage des CK totales, le service d'accueil (UF 1051 et 1054) ainsi que la recherche de charge virale VIH.

Les traitements antirétroviraux ont été relevés grâce aux données de la cohorte Nadis. Les patients n'ayant pas accepté d'entrer dans cette cohorte étaient exclus de l'étude (n=23).

L'analyse des résultats portait au total sur 557 dossiers et permettait de distinguer deux populations :

- 304 patients traités par le ténofovir ;
- 253 patients ne recevaient pas de ténofovir.

L'objectif était de tenter d'estimer le pourcentage de patients susceptibles de présenter une macroCK au vu des résultats des activités CK et CK-MB. Cette étude étant rétrospective, il nous était impossible de compléter les données recueillies par la réalisation d'une électrophorèse des isoenzymes des CK (absence de sérothèque).

Comme décrit précédemment, les macroCK2 interfèrent avec les dosages de CK-MB. Une augmentation de l'activité de CK-MB nous permet de suspecter la présence d'une macroCK. Il est à noter que ce dosage est automatiquement réalisé lorsque l'activité CK est supérieure à 145 UI/L. Le seuil pathologique pour les CK-MB est défini par une activité supérieure à 24 UI/L. C'est pourquoi nous avons divisé notre population en 3 groupes :

- Patient présentant une activité CK totale > 145 UI/L et activité CK-MB \geq 24 UI/L → présence probable de macroCK ;
- Patient présentant une activité CK totale > 145 UI/L et activité CK-MB < 24 UI/L → macroCK peu probable ;
- Patient présentant une activité CK \leq 145 UI/L et mesure de l'activité CK-MB non réalisée → absence de macroCK.

La répartition des patients dans les différents sous groupes est présentée dans le tableau ci-dessous :

| | | Patients traités par ténofovir | | Patients ne recevant pas ténofovir | | Total | |
|---------------|-----------------|--------------------------------|-----|------------------------------------|-----|-------|-----|
| CK > 145 UI/L | CK-MB ≥ 24 UI/L | 74 | 105 | 4 | 73 | 78 | 178 |
| | CK-MB < 24 UI/L | 231 | 200 | 248 | 179 | 479 | 379 |
| Total | | 305 | | 252 | | 557 | |

Tableau 9 : Répartition des patients en fonction de la prise de ténofovir et des activités CK totale et CK-MB.

Cette étude rétrospective permet de conclure que **74 des 78 patients qui présentent une activité CK-MB ≥ 24 UI/L étaient traités par ténofovir** (soit 95% de ces patients).

Afin d'aller au-delà d'une analyse descriptive, nous avons souhaité comparer le risque de survenue d'une macroCK chez les patients infectés par le VIH traités ou non par le ténofovir au moyen de tests statistiques. L'objectif était d'analyser la dépendance entre deux critères, en l'occurrence les activités CK totale et CK-MB et la prise ou non de ténofovir. Le test utilisé était le test du Chi 2 (χ^2) (Logiciel Excel, Microsoft, Redmond, USA). Il convient de rappeler brièvement le principe inhérent de ce test avant de le mettre en œuvre sur les données observées. Le test du Chi 2 postule l'hypothèse nulle (H_0) suivante :

Les deux critères sont indépendants. Dans ce cas précis, cela signifie que les activités CK totales et CK-MB observées ne sont pas liées à la prise de ténofovir.

A l'inverse l'hypothèse alternative (H_1) implique une dépendance entre la prise de ténofovir et les activités CK totales et CK-MB observées.

Le test du Chi 2 implique la comparaison d'une statistique calculée à partir des données avec une statistique théorique tirée d'une table du Chi 2. La statistique calculée est la suivante :

$$\chi^2_{\text{calculé}} = \sum \frac{(\text{valeur observée} - \text{valeur théorique})^2}{\text{valeur théorique}}$$

La valeur théorique étant calculée comme la situation hypothétique selon laquelle il y aurait une indépendance parfaite entre les deux critères.

Cette valeur calculée est comparée à un seuil théorique issu d'une table du Chi 2 à $(m-1)(n-1)$ degrés de liberté (m et n étant le nombre de classes pour chacun des deux critères). Cette comparaison peut donner lieu à deux cas de figures :

1) Acceptation de l'hypothèse nulle si $\chi^2_{\text{calculé}} < \chi^2_{\text{théorique}}$ (dans ce cas, il est impossible de rejeter l'hypothèse d'indépendance entre les deux critères) ;

2) Rejet de l'hypothèse nulle si $\chi^2_{\text{calculé}} > \chi^2_{\text{théorique}}$ (donc rejet de l'hypothèse d'indépendance entre les deux critères).

Dans notre cas, nous avons effectué deux tests du Chi 2 :

- Dans un premier temps, il est testé l'indépendance entre la prise de ténofovir et l'activité CK totale observée (inférieure ou supérieure à 145)¹.
- Ensuite, il est testé l'hypothèse selon laquelle la prise de ténofovir est non liée à l'activité de CK-MB. Pour ce faire, nous avons divisé la population entre les individus ayant un niveau de CK-MB supérieurs ou égale à 24 UI/L et le reste de la population².

Les résultats des deux tests sont présentés ci-dessous :

| Division de la population (seuil) | Valeur calculée | Valeur théorique (degrés de libertés) ³ | Rejet de H0 ? |
|-----------------------------------|-----------------|--|---------------|
| CK > 145 UI/L | 1.89 | 3.841 (1) | NON |
| CK-MB ≥ 24 UI/L | 58.91 | 3.841 (1) | OUI |

Tableau 10 : Résultats des tests de χ^2 : valeurs calculés et théoriques pour chaque test effectué

En divisant la population en fonction du niveau de CK totale (inférieur et supérieur à 145 UI/L), il n'existe pas de différence statistique entre les deux sous-groupes. En effet, l'hypothèse nulle d'indépendance entre le niveau des CK totales et la prise de traitement ne peut être rejetée au seuil de 5% (cf. première ligne du tableau 10). **Le ténofovir ne semble avoir aucun effet sur l'activité des CK totales.**

Contrairement au résultat précédent, l'activité de CK-MB est statistiquement liée à la prise de ténofovir. Au seuil de 5%, il est possible de rejeter l'hypothèse d'indépendance entre une activité de CK-MB ≥ 24 UI/L et la prise de ténofovir (cf. deuxième ligne du tableau 10). Il existe une différence significative entre les deux sous-groupes, respectivement CK-MB ≥ 24 U/L et < 24 UI/L, en fonction de la prise de traitement : **24,3% des patients traités par ténofovir présentent une activité CK-MB supérieure ou égale à 24 UI/L contre seulement 1,6% des patients non traités.**

En conclusion, nous observons qu'un pourcentage significatif de patients traités par le ténofovir présentent une activité CK-MB augmentée (24,3 % de la population). Notre hypothèse est que l'augmentation de cette activité pourrait être due à la présence d'une macroCK2. Nous avons pu valider cette hypothèse sur 16 des 74 patients. Dans la mesure où nous n'avons pas pu réaliser d'électrophorèse des isoenzymes des CK chez l'ensemble des patients, il nous paraît difficile d'estimer la prévalence réelle des macroCK dans cette population. Néanmoins, **le ténofovir semble être à l'origine d'une interférence analytique probablement induite par la présence d'une macroCK2.**

Cette étude a fait l'objet d'une lettre à l'éditeur parue récemment dans la revue Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (cf. Annexe 1).

¹ Chiffres en bleu dans le tableau 9.

² Chiffres en rouge dans le tableau 9.

³ Seuil théorique pour un risque d'erreur de première espèce à 5%, ce qui signifie qu'il y a 5% de risque d'accepter H₀ alors que cette hypothèse est fausse.

III.4 Discussion

Pour confirmer notre hypothèse de l'implication du ténofovir dans l'apparition de macroCK2, une revue de la littérature a été effectuée.

Le ténofovir est un inhibiteur nucléotidique acyclique de la transcriptase inverse du VIH et un inhibiteur de la polymérase du virus de l'hépatite B (VHB). Tsai *et al.* ont été les premiers à décrire sa supériorité par rapport à la zidovudine vis-à-vis de la prévention de l'infection par le virus d'immunodéficience simienne chez le macaque (154). Cette molécule a obtenu l'AMM pour le traitement de l'infection par le VIH-1 en 2002 avec une extension en 2008 pour les infections chroniques au VHB (155). Il s'agit du traitement de choix pour traiter les co-infections. Actuellement, le ténofovir représente l'inhibiteur nucléotidique le plus prescrit aux Etats Unis d'Amérique (156).

Pour être active, cette molécule doit être soumise à une phosphorylation réalisée par les kinases cellulaires. La forme diphosphate (qui en réalité contient trois phosphates) se fixe sur le site actif des enzymes virales par compétition avec le désoxyadénosine-5'-triphosphate et bloque ainsi l'élongation de la chaîne d'acide nucléique (157).

Lors des différentes études cliniques, le ténofovir a fait preuve de son efficacité sur la diminution de la charge virale du VIH au long court notamment chez des patients résistants à d'autres molécules (157).

La biodisponibilité du ténofovir étant médiocre, le médicament est administré sous la forme d'un pro-médicament : le disoproxil fumarate de ténofovir.

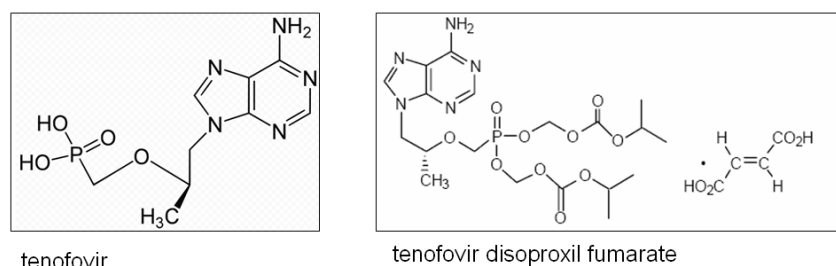


Figure 15 : Formule chimique du ténofovir et du tenofovir disoproxil fumarate (forme orale du ténofovir).

Certaines études combinant des données concernant plus de 450000 patients-années affirment qu'il s'agit d'un traitement bien toléré (158).

Un des effets indésirables le plus important est l'apparition possible d'une tubulopathie proximale aiguë (syndrome de Fanconi) qui peut se compliquer d'une insuffisance rénale aiguë. L'incidence de ces troubles semble être de quelques pourcents (de 0,5 à 10% selon les études). Les tubulopathies induites par le ténofovir sont probablement sous-estimées dans les études cliniques. En effet, des anomalies tubulaires peuvent survenir sans augmentation de la créatinémie, et les marqueurs spécifiques de l'atteinte tubulaire ne sont pas toujours rapportés dans les essais cliniques. Ces effets indésirables semblent être plus fréquents chez des patients présentant une maladie de système ou rénale sous-jacente, ainsi que lors d'association avec d'autres molécules néphrotoxiques (156). L'imputabilité du ténofovir dans l'apparition d'une insuffisance rénale chronique (IRC) est plus discutée. En effet, les conclusions sont différentes entre les essais cliniques et les études rétrospectives. Les traitements reçus précédemment et concomitamment pourraient avoir une influence sur l'apparition de l'IRC (156). La néphrotoxicité du ténofovir paraît moins importante que pour d'autres analogues nucléotidiques acycliques (cidofovir et adéfovir) (157).

L'hypophosphorémie, conséquence fréquente de cette tubulopathie, est le plus souvent transitoire et ne semble pas nécessiter l'arrêt du traitement (145,159,160). L'équipe de Becker

rapporte que plus de 15% des patients ont présenté une hypophosphorémie après 48 semaines de traitement. Parmi eux, plus de 3% ont une hypophosphorémie importante (phosphorémie < 1,5 mg/dL). Ce trouble est résolutif entre 4 et 8 semaines sans arrêt de traitement (161).

Un taux résiduel élevé de ténofovir semble être un facteur de risque d'apparition de troubles rénaux (dysfonctionnement tubulaire et dégradation chronique du DFG) (156). Actuellement, le dosage du ténofovir est recommandé dans trois circonstances : déterminer l'imputabilité d'un échec virologique à une résistance au ténofovir, contrôler l'observance thérapeutique et adapter la posologie lors d'insuffisance rénale ou hépatocellulaire (162).

Schmid *et al.* ont été les premiers à décrire l'association entre la prise de ténofovir et apparition de macroCK2 (135). Lors de leur étude menée en 2006 et qui a porté sur 408 patients traités par antirétroviraux, la prévalence des macroCK2 était de 7,8%. D'après les auteurs, le seul point commun entre ces patients semblait être la prise de ténofovir. Tous sauf un (31/32 patients) avaient un traitement comprenant cette molécule. En revanche, ce dernier souffrait d'un sarcome de Kaposi et d'une maladie de Castelman multicentrique.

Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'apparition des macroCK2 était induite par l'administration de ténofovir. Ils ont alors mis en place un suivi prospectif des patients chez lesquels un traitement par ténofovir était instauré. Ils ont ainsi mis en évidence l'apparition d'une macroCK2 chez 20 des 41 patients suivis (135).

Schmid *et al.* évoquent une macroCK2 formé par auto-polymérisation des CK mitochondriales (MtCK). Il existe deux types de CK mitochondriales :

- les CK mitochondriales ubiquitaires (uMtCK) retrouvées principalement dans le rein et le cerveau ;
- les CK mitochondriales sarcomériques (sMtCK) isolées dans les cellules musculaires (135).

Les macroCK2 isolées dans la cohorte de Schmid *et al.* sont composées d'agglomérats d'uMtCK. L'origine rénale de ces MtCK est évoquée en raison de la cytotoxicité connue du ténofovir vis-à-vis des tubules rénaux. Pour cette raison, Schmid *et al.* ont pris en compte l'évolution du débit de filtration glomérulaire et la concentration de β 2-microglobuline (molécule permettant de différencier les atteintes tubulaires des atteintes glomérulaires). Chez les patients séropositifs au VIH, l'augmentation de la concentration de la β 2-microglobuline semble également être un marqueur prédictif de la progression de l'infection (163).

Schmid *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la concentration sérique de β 2-microglobuline chez les patients qui présentent une macroCK2. En dehors de tout contexte d'infection évolutive chez ces derniers, Schmid a attribué cette augmentation à une tubulotoxicité du ténofovir (135).

En 2012, Watanabe *et al.* ont confirmé l'existence d'un lien entre ténofovir et augmentation de l'activité des CK mitochondriales. Ces auteurs ont cherché directement l'activité MtCK en utilisant une immunoinhibition de l'activité des MtCK grâce à des anticorps anti-MtCK. Cette augmentation des MtCK concerne 75% des patients qui reçoivent du ténofovir et semble être spécifique à cette molécule. S'il a été préalablement démontré que l'activité CK mitochondriale pouvait augmenter chez les patients atteints d'infections opportunistes ou non traités, ceci ne concerne pas les patients de l'étude de Watanabe *et al.*, ces derniers ayant presque tous (93%) une charge virale indétectable (110). Watanabe *et al.* ont également étudié la cinétique de l'activité CK mitochondriale. Cette activité semble atteindre un plateau après un mois de traitement puis décroît à l'arrêt du traitement. Ces

résultats sont à prendre avec précaution, ils ont été établis sur des effectifs très restreints, respectivement 5 et 6 patients (110).

En 2013, Schmid *et al.* ont publié les données obtenues sur le groupe des 41 patients présentant ou non une macroCK2 dans les suites de la mise en place d'un traitement par ténofovir. Après 5 ans de recul, ils soulignent la disparition de cette macroCK2 dans deux tiers des cas (n=8/12) lorsque le traitement par ténofovir était maintenu et dans 100% des cas à l'arrêt du traitement (n=4) (164).

Schmid *et al.* ne rapportent aucun lien entre la présence de la macroCK2 et une éventuelle complication. Néanmoins, les patients présentant une macroCK2 persistante semblent être plus sujets à l'hypophosphatémie modérée. Les auteurs en concluent que la macroCK2 pourrait être le signe d'un dysfonctionnement tubulaire subclinique (164).

La toxicité tubulaire du TDF semble être d'origine mitochondriale. Lorsque la concentration plasmatique en ténofovir s'accroît, une augmentation de la concentration intracellulaire tubulaire est alors observée. Le ténofovir a la propriété d'inhiber partiellement l'ADN polymérase γ mitochondriale, provoquant ainsi une déplétion en ADN mitochondrial, des anomalies de structures des mitochondries ainsi qu'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire oxydative des cellules épithéliales tubulaires proximales. La production d'ATP est réduite conduisant à une incapacité des cellules tubulaires à remplir pleinement leurs fonctions notamment la réabsorption des électrolytes. Il semble que ces anomalies mitochondriales soient également à l'origine d'une apoptose des cellules tubulaires (156).

De plus, le ténofovir stabilise les macroCK2 *in vitro* sans affecter leurs propriétés enzymatiques (164).

Schmid *et al.* font l'hypothèse que le ténofovir serait responsable d'un stress à bas niveau des tubules proximaux, provoquant un relargage des CK mitochondriales dans la circulation sanguine. Ce même ténofovir stabiliserait ces CK sous forme octamérique, induisant ainsi une diminution de leur clairance rénale et leur accumulation dans le sérum (164). Il est aussi avancé que le ténofovir pourrait augmenter l'expression des MtCK en réponse aux dommages mitochondriaux qu'il induit. Il serait sans doute intéressant de mettre en place un suivi à long terme des patients chez lesquels les macroCK2 persistent de façon à clarifier la relation existant entre le ténofovir, les troubles rénaux et l'augmentation de l'activité MtCK (110).

**IV Enquête sur les
connaissances concernant
les macroenzymes**

Cette étude et les nombreux cas rapportés, nous ont permis de constater que les macroenzymes, anomalies biologiques généralement mal connues, étaient souvent sous-évaluées. D'après les cas décrits dans la littérature, la présence d'une macroenzyme conduit fréquemment à la mise en place d'explorations complémentaires inutiles.

En pratique, ce sont les biologistes qui doivent être prioritairement alertés face à ce type d'interférence. Il nous a paru intéressant de compléter notre approche expérimentale par la mise en place d'une évaluation des pratiques professionnelles des biologistes médicaux face à ce risque d'interférence. Pour ce faire, nous avons construit un cas clinico-biologique dont l'objectif était la mise en situation de nos collègues face à une suspicion de macroenzyme.

La mise en place d'évaluation des pratiques professionnelles (EPP) s'inscrit actuellement dans le cadre du développement professionnel continu (DPC), démarche devenue obligatoire pour tous les professionnels de santé. Cette démarche individuelle s'inscrit dans une démarche collective permanente (165). Cette enquête répond à l'orientation numéro 1 telle que définie par l'Arrêté du 26 février 2013 fixant la liste des orientations nationales du développement professionnel continu des professionnels de santé pour l'année 2013 : améliorer la prise en charge des patients (166).

La première partie de ce cas clinique porte sur la prestation de conseil. Dans les nouvelles missions issues de l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010, le biologiste est de plus en plus amené à s'impliquer dans la prise en charge des patients en proposant des conseils aux prescripteurs. L'article L. 6211-2 du code de la santé public (CSP) définit de manière complète l'acte de biologie médicale, en insistant sur la nécessaire « interprétation contextuelle des résultats ». L'article L. 6211-7 du CSP précise que le biologiste médical est responsable de ces actes donc, par extension, de leur interprétation. La notion de prestation de conseil est précisée dans l'article L. 6211-8. « Lorsqu'il l'estime approprié, le biologiste médical réalise, [...] des examens de biologie médicale autres que ceux figurant sur la prescription, [...] Ces modifications sont proposées au prescripteur, sauf en cas d'urgence ou d'indisponibilité » (167).

La notion de prestation de conseils fait également l'objet d'un chapitre de la norme NF EN ISO 15189 portant sur l'accréditation des LBM (point 4.7) (168).

Nous allons décrire les différentes phases qui se sont succédées lors de la réalisation de ce travail. L'évaluation des pratiques professionnelles s'est faite au moyen du questionnaire qui a été diffusé à l'ensemble des adhérents de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC). Les réponses des participants ont été comparées aux données publiées dans la littérature, dans la mesure où aucun référentiel n'est actuellement disponible.

IV.1 Construction du questionnaire

IV.1.1 Définition des objectifs

Les objectifs de cette enquête étaient de :

- Mettre les biologistes face à une situation pratique les conduisant à évoquer une suspicion d'interférence par une macroenzyme ;
- recenser les conduites pratiques adoptées par les biologistes dans cette situation ;
- restituer les résultats sous la forme d'un document pédagogique proposant une conduite à tenir simple et rationnelle, susceptible d'être utilisée par tous.

IV.1.2 Les biologistes participants : données descriptives

Cette enquête a été proposée aux 980 adhérents de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), elle était menée sur la base du volontariat et de l'anonymat, 119 biologistes ont analysé le cas clinico-biologique et envoyé leurs réponses.

Les données suivantes ont systématiquement prises en compte : âge, sexe, année d'obtention du diplôme ainsi que le temps travaillé des participants.

Les items « lieu d'exercice » et « spécialité » permettent d'évaluer le caractère spécialisé (CHRU) ou polyvalent du mode d'exercice des biologistes. L'intérêt de ces différentes données permet d'évaluer le niveau d'expertise des participants à l'enquête.

Les codes « automatés » et « techniques » ont systématiquement pris en compte, la nature des interférences pouvant varier en fonction de ces deux paramètres.

IV.1.3 Modalités d'envoi du questionnaire et du recueil des données

La première difficulté rencontrée fut la nécessité de rédiger un questionnaire d'utilisation facile et rapide, dans lequel les éléments d'orientation apparaissaient au fur et à mesure. En effet, le risque majeur était d'obtenir des réponses aux questions biaisées de la part des biologistes qui poseraient un diagnostic *a posteriori*. Dans le but d'éviter cet écueil, nous avons évoqué la possibilité d'un envoi en deux temps ou du recours à un outil informatique empêchant toute modification des réponses déjà données.

L'envoi du questionnaire en deux temps, s'est révélé difficile à mettre en place en raison de la difficulté à tracer deux fichiers indépendants en respectant l'anonymat des participants. De plus, un questionnaire en deux temps nous faisait courir le risque d'augmenter le nombre de perdus de vue entre les deux envois.

A notre connaissance, il n'existe pas de logiciel gratuit de libre accès empêchant la modification des réponses *a posteriori*. Le recours à ce type d'outil nous paraît néanmoins très intéressant pour des enquêtes de ce type.

Pour faire face à ces deux limites, nous avons choisi de mettre en place une enquête en un temps et d'utiliser un logiciel gratuit d'accès libre permettant une saisie des réponses simple et rapide, même si malheureusement nous ne disposions pas de l'option « absence de modification des réponses *a posteriori* » (Google Docs Spreadsheet[®], Mountain View, US). Cet outil permet de créer des questions à choix multiples, des listes préétablies de réponses sous forme de « menu déroulant » ou encore des fenêtres permettant aux participants de répondre librement. Les participants recevaient un lien par mail leur donnant accès au questionnaire en ligne. Nous avons estimé le temps nécessaire à la participation à environ 15 minutes. Les résultats donnés par les biologistes étaient transposés automatiquement dans une feuille de calcul Excel[®] (Logiciel Excel, Microsoft, Redmond, USA), permettant une exploitation plus aisée, et évitant le risque non négligeable d'erreur de transcription des données.

En pratique, le questionnaire a été construit puis testé par plusieurs personnes pour s'assurer que l'envoi et surtout le recueil des données s'effectuaient sans anomalies. Une fois ces tests préliminaires réalisés nous avons envoyé le lien au secrétariat de la SFBC accompagné d'un courriel explicatif (Annexe 2). Ce questionnaire a été envoyé aux adhérents de la Société Française de Biologie le 1 mars 2013 avec une relance un mois après (le 5 avril 2013). Le recueil des données a été arrêté le 14 juin 2013.

IV.1.4 Choix du sujet du cas clinique

La deuxième difficulté a été de construire un cas clinique proche de la réalité qui fasse appel à une situation pratique. Il nous paraissait important que ce cas clinique soit construit de façon pédagogique et permette aux biologistes de revoir leurs connaissances sur les paramètres abordés, tout en les orientant vers une suspicion d'une macroenzyme.

Pour cela, il était nécessaire d'avoir recours à une **macroenzyme** relativement **fréquente**, qui puisse être **détectée facilement lors d'un bilan de routine**.

Plusieurs enzymes pouvaient faire l'objet de ce cas clinico-biologique (cf. tableaux 2 et 3) :

Si les **macroamylases** sont les **macroenzymes les plus fréquentes**, il nous a paru pertinent de construire un cas clinique portant sur ce type de macromolécule. En effet, dans ses recommandations publiées en juin 2009, la Haute Autorité de Santé (HAS) précise que seul le dosage de la lipase est indiqué dans le diagnostic de pancréatite aiguë (111). De plus, les macroamylases ont la particularité de pouvoir être dépistées simplement en effectuant le calcul de la clairance rénale de l'amylase. Cette méthode de détection est spécifique à cette enzyme et rendait une ouverture sur des questions d'ordre plus générale moins évidente.

Les **macroCK** auraient pu être candidates pour cette enquête. En effet, le **dosage des CK** est utilisé pour mettre en évidence des troubles musculaires (muscles squelettiques ou muscle cardiaque). Actuellement, ce dosage reste essentiellement **indiqué dans le diagnostic des troubles des muscles squelettiques**. D'autres biomarqueurs de nécrose myocardique, tels que les troponines, sont actuellement recommandés en raison de leur plus grande spécificité (150,169). Morrow *et al.* déconseillent l'utilisation des dosages de CK, ASAT et LDH dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde (170). Nous avons jugé préférable de ne pas utiliser ce type de macroenzyme dans la mesure où ces interférences par les macroCK devraient devenir exceptionnelles, compte tenu des dernières recommandations.

Les **macroenzymes du système hépatobiliaires** sont **rarement décrites**. L'importance de leur dépistage nous paraît donc moins primordiale.

Nous avons donc choisi d'exploiter un cas portant sur les macrotransaminases et plus particulièrement les **macroASAT**.

Le dosage des transaminases est fréquemment prescrit : 7^{ième} acte au niveau des dépenses de biologie, il représente 27 millions de dosages (soit 196 millions de B) en 2011 (171). Une augmentation des transaminases, traduit l'existence de lésions cellulaires en général rapportée à l'existence d'une cytolyse hépatique. Nous avons profité de ce cas clinique pour introduire des **rappels sur la conduite à tenir face à une hypertransaminémie modérée**.

La plupart du temps le dosage des transaminases repose sur l'évaluation conjointe des activités ASAT et ALAT. L'augmentation isolée d'une seule enzyme doit donc orienter le biologiste vers une hypothétique interférence analytique de type macrotransaminases. Cette discordance est, en général, le point d'appel de la plupart des cas cliniques décrits dans la littérature (89,94,100,103).

Pour construire cette enquête, nous nous sommes inspirés de quelques cas cliniques décrits dans la littérature (29,89,94,100,102,103,172).

Dans ces différents articles, les augmentations d'ASAT sont généralement supérieures à 10 fois la normale. Ces augmentations sont isolées c'est-à-dire sans augmentation des ALAT ou des autres enzymes hépatiques et/ou musculaires et en l'absence de toute hémolyse. Ces hypertransaminémies ont été mises en évidence, dans la plupart des cas, lors de la réalisation

d'un bilan systématique. L'examen clinique ne retrouve aucun symptôme tant général que spécifique (fatigue, douleurs abdominales...). Ces tableaux clinico-biologiques sont en général incomplets et engendrent fréquemment la prescription non hiérarchisée d'examens complémentaires biologiques spécialisés, avant même que les principales étiologies d'hypertransaminémie aient été envisagées.

Ces raisons nous ont incité à rédiger un cas clinique où le patient ne présente aucun symptôme et aucune co-morbidité afin d'éviter d'orienter les biologistes vers un diagnostic particulier si ce n'est une augmentation sub-normale de l'activité des GGT.

IV.2 Compte rendu de l'enquête

La restitution des résultats est actuellement en cours. Le bureau de la SFBC a validé le 18 septembre 2013 le compte rendu de cette enquête (cf. annexe 3). L'ensemble des adhérents de la SFBC (participants à l'enquête ou non) seront informés par courriel de la mise en ligne du document sur le site de la société savante.

IV.2.1 Données démographique

Cent dix neuf réponses sont exploitables (52 femmes et 67 hommes) sur les 135 reçues, les retours exclus concernent les réponses incomplètes. Le taux de réponses est donc de 12%, ce qui légèrement inférieur aux taux de réponse usuels dans ce type d'enquête. En effet, les retours sont compris entre 20 et 30% des envois, rarement au-delà (173–175). La spécificité du questionnaire peut, en partie, expliquer ce faible retour.

L'âge et l'année d'obtention du diplôme sont corrélés donc nous pouvons interpréter les données en fonction de l'un ou l'autre de ces paramètres. Une majorité des participants a un âge compris entre 40 et 65 ans. Peu de participants ont obtenu leurs diplômes après les années 2000 (22 participants) et uniquement 9 personnes sur les 119 ne travaillent pas à temps complet.

| < 30 ans | 30 à < 40ans | 40 à < 50 ans | 50 à < 60ans | > 60 ans | Non communiqué |
|----------|--------------|---------------|--------------|----------|----------------|
| 6 | 14 | 26 | 50 | 22 | 1 |

Tableau 11 : Répartition des participants en fonction des classes d'âge

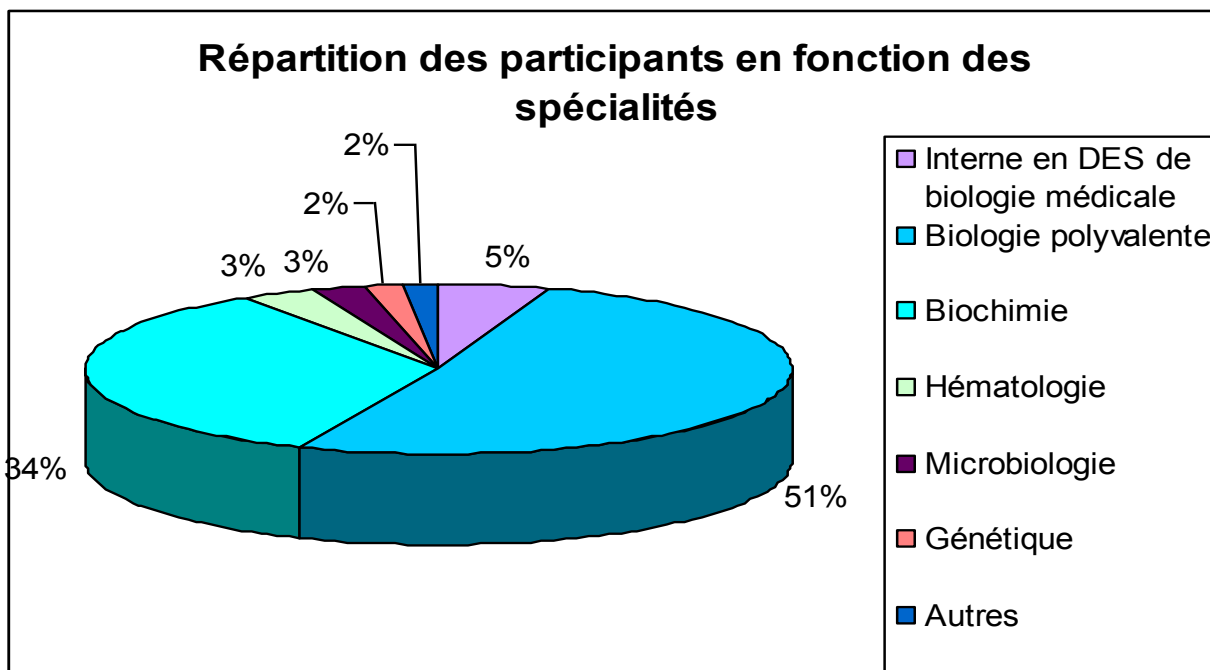


Figure 16 : Répartition des participants par spécialités

Les **biologistes polyvalents** et les **biochimistes** représentent respectivement **51%** et **34%** des participants. Ceci s'explique sûrement par le fait que ce sont ces deux spécialités qui sont confrontées à ce type de bilan.

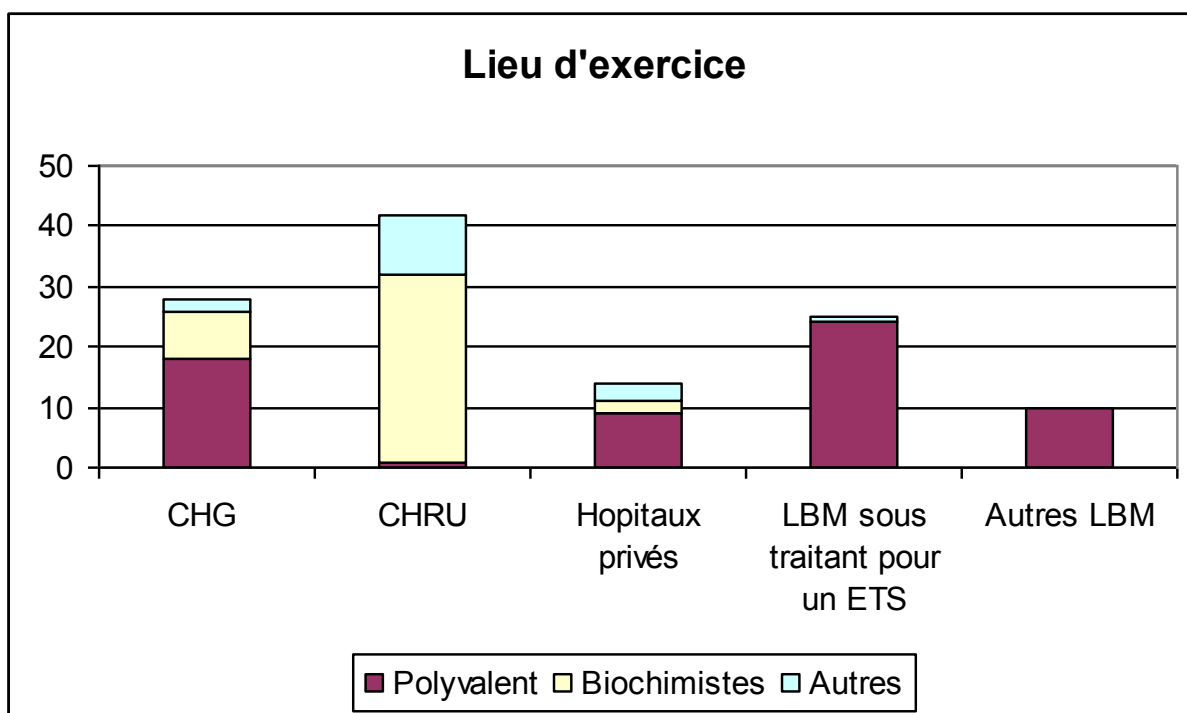


Figure 17 : Répartition des participants à l'enquête en fonction de leur lieu d'exercice

Une grande **majorité des participants sont des biologistes hospitaliers** (84/119 soit 75%). Actuellement la répartition des biologistes médicaux est d'environ 60% de biologistes exerçants en secteur libéral et de 40% exerçants en secteur hospitalier¹. Certaines hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce taux de réponse inégal entre les biologistes des deux secteurs :

- ✓ moins de lien « direct » avec les prescripteurs donc moins de prestation de conseils pour les biologistes libéraux ;
- ✓ moins de biologistes concernés par l'expertise « technique » suite aux regroupements en plateaux techniques au sein des structures de biologie privée.

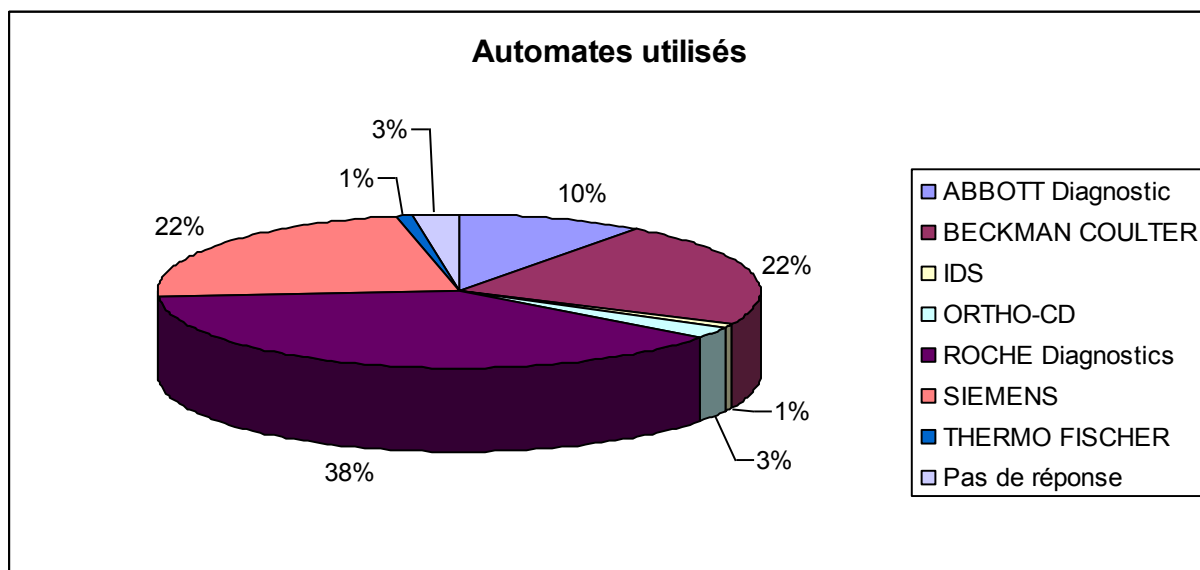


Figure 18 : Répartition des automates utilisés par les participants

Ce sont surtout les automates de Beckmann Coulter[®], Siemens[®] et Roche[®] qui sont utilisés. Cinquante % des participants utilisent des techniques avec phosphate de pyridoxal, 24% sans phosphate de pyridoxal et 26% n'ont pas précisé la technique utilisée au sein de leur laboratoire. L'activation par le phosphate de pyridoxal évite une activité faussement basse dans les échantillons de patients ayant un taux de phosphate de pyridoxal endogène insuffisant (carence en vitamine B6). Pour éviter ces cas, l'IFCC a émis des recommandations conseillant l'ajout de cette molécule pour mesurer l'activité des transaminases (176,177).

¹ Chiffres au 1^{er} janvier 2011 des Conseils Nationaux de l'Ordre des Médecins et de l'Ordre des Pharmaciens

IV.2.2 Cas clinico-biologique : dossier clinique

Le cas clinique envoyé était le suivant :

Cas clinico-biologique

Monsieur L., 54 ans, consulte son médecin généraliste.

L'examen clinique de Monsieur L. est sans particularité : il pèse 72 kgs pour une taille de 176 cm (IMC = 23,5 kg/m²) et sa TA est égale à 13/7.

Monsieur L. ne prend ni médicaments, ni phytothérapies et n'est pas exposé à des toxiques particuliers lors de son activité professionnelle. Il ne consomme pas de drogues et estime que sa consommation d'alcool n'est pas excessive.

NFS : sans particularité

Biochimie (Les valeurs de référence du laboratoire sont indiquées entre parenthèses)

Glycémie à jeun 5.3 mmol/L (3.9-5.5 mmol/L)
Triglycérides 1.2 mmol/L (0.4-1.7 mmol/L)
Cholestérol total 4.9 mmol/L (4.10-5.20 mmol/L)
LDL cholestérol 3.7 mmol/L (< 4.10 mmol/L)
HDL cholestérol 0.7 mmol/L (>1.0 mmol/L)

Protéines totales 72 g/L (65-80 g/L)

ASAT 259 U/L (< 35 UI/L)

ALAT 24 U/L (< 45 UI/L)

GGT 72 U/L (< 55 UI/L)

CRP < 5mg/L (<5mg/L)

IV.2.2.1 Conduite à tenir face à la découverte d'une hypertransaminémie

Question 1 :

Le médecin généraliste, surpris par les résultats de ce bilan, vous contacte pour savoir comment compléter ces dosages. Dans un premier temps, vous lui proposez de (1 seule réponse possible) :

- De prescrire un dosage sérique de transferrine désialylée (CDT)
- De prescrire une sérologie VHC/VHB
- De prescrire un bilan de contrôle portant sur ASAT et ALAT dans deux mois
- De prescrire un dosage sérique de la céruléoplasmine
- De prescrire un bilan martial

La réponse attendue était la « **prescription du bilan de contrôle portant sur ASAT et ALAT dans deux mois** », réponse majoritairement donnée par les participants (80% des réponses). Il faut souligner que 12% et 7% des participants ont respectivement choisi d'évoquer directement les deux principales étiologies à explorer en première intention dans le

cas d'une hypertransaminémie confirmée : infections par les virus hépatotropes (VHB et VHC) et un alcoolisme chronique.

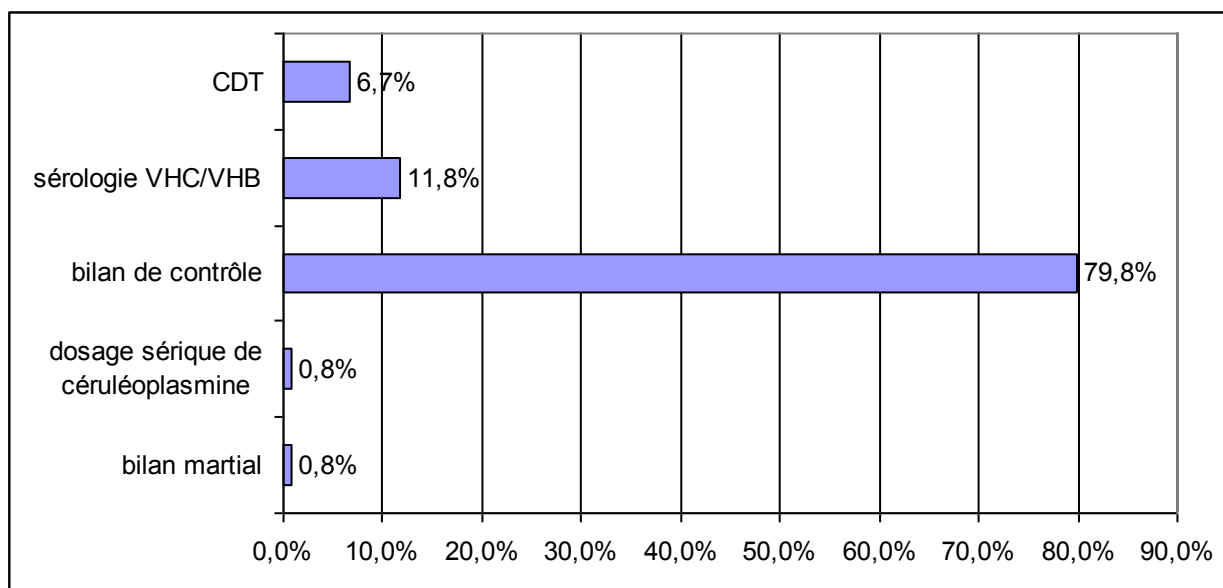


Figure 19 : Démarche des participants à l'enquête lors d'une augmentation isolée des ASAT.

Monsieur L. présente une élévation modérée (3 à 10x N) et isolée des ASAT. Le dosage des transaminases sériques est fréquemment prescrit en médecine générale. Dans le cas de M. L., le médecin généraliste a prescrit un bilan de routine incluant les transaminases, en raison d'un doute possible concernant l'appréciation de sa consommation d'alcool. La conduite à tenir face à une élévation isolée et/ou modérée de ces enzymes n'est pas clairement définie.

Si certains auteurs remettent en cause le dogme du contrôle systématique du dosage des transaminases avant toute exploration complémentaire, **la plupart des experts sont favorables à la prescription d'un deuxième dosage de contrôle** (178,179). Les recommandations portent principalement sur les élévations de l'activité ALAT, plus spécifique de l'organe hépatique que l'activité ASAT. L'association américaine de gastro-entérologie (AGA) propose un contrôle systématique des dosages enzymatiques face à tout résultat discordant et toute augmentation modérée des activités transaminases (180).

Dans le cas de M. L., l'existence d'une dissociation entre une activité ASAT augmentée et une activité ALAT comprise dans les valeurs de référence doit inciter le biologiste à demander un contrôle de ces valeurs avant toute exploration complémentaire, ceci afin d'éliminer une éventuelle interférence ou une cytolyse transitoire (181). S'il n'y a pas de consensus pour le délai, il est usuel de prescrire un bilan de contrôle 1 à 6 mois après le 1^{er} bilan. Dans ce cas clinique, le choix de 2 mois a été fait de manière arbitraire et peut donc être discuté.

Néanmoins, en pratique courante, un premier contrôle est en général rapidement réalisé pour mettre en évidence que cette augmentation n'est pas transitoire. D'après une étude de Friedman *et al.* concernant les élévations des ALAT chez des donneurs de sang, 28% persistent au-delà de 6 mois (182).

L'objectif était d'insister sur la nécessité de vérifier l'augmentation avant de faire un bilan complet d'hypertransaminémie.

En ce qui concerne les autres réponses, ces différents examens complémentaires peuvent être demandés en seconde intention. D'après une étude réalisée aux USA en 2003,

les 4 principales causes représentant au total 31% des hypertransaminémies sont l'alcool (consommation supérieure à 2 verres par jour pour un homme et supérieure à un verre par jour [soit 10g d'alcool pur] pour une femme), les infections virales par les virus de l'hépatite B et C et la surcharge en fer. Ces auteurs rapportent l'existence d'une augmentation isolée des ALAT chez 32 % des patients, d'une augmentation isolée des ASAT chez 25,6% et des deux enzymes dans 42,4% des cas (183).

- **La consommation chronique d'alcool**, peu probable dans ce cas, peut néanmoins être évoquée en raison d'une légère augmentation des GGT. Le meilleur marqueur biologique actuel d'une consommation excessive d'alcool est le dosage de la transferrine désialylée (ou transferrine carbodéficiente ou CDT). Cette dernière augmente lors d'une prise d'alcool d'au moins 50g par jour et est le reflet de la consommation alcoolique des 4 dernières semaines. La sensibilité de la CDT est supérieure à celle des autres marqueurs (184). Le dosage de CDT, en plus d'un interrogatoire approfondi, serait nécessaire pour évaluer la consommation d'alcool, ce d'autant plus que qu'une prise modérée d'alcool peut être à l'origine d'une cytolysse modérée (185).
- Les seconde et quatrième étiologies sont les **infections virales** respectivement **dues aux virus de l'hépatite C et de l'hépatite B**. La HAS a émis des recommandations en mars 2011 portant sur le dépistage de ces deux infections. Elle préconise la détection des Ac anti-VHC (ou la recherche directe de l'ARN viral chez les immunodéprimés sévères) pour déterminer le statut sérologique concernant le virus de l'hépatite C. Il est conseillé de réaliser un dépistage combinant la recherche de l'Ag HBs à celle des Ac anti-HBs et anti-HBc pour déterminer le statut sérologique concernant le virus de l'hépatite B (186).
- La 3^{ème} étiologie en cause est la **surcharge en fer**, ce qui nécessite la réalisation d'un bilan martial. Le coefficient de saturation à la transferrine permet de dépister une surcharge en fer lorsque ce dernier est généralement supérieur à 45%. Cette augmentation du coefficient de saturation de la transferrine est fréquemment associée à une hyperferritinémie. Ce tableau doit faire évoquer les deux grandes catégories de surcharge martiale : hémochromatosique et non hémochromatosique (187).

Le dosage de céruléoplasmine est utilisé pour le diagnostic de la **maladie de Wilson**. La prévalence de cette pathologie est de 1/25 000 en France et Monsieur L. ne présente aucun signe clinique évocateur. En général, le premier symptôme est une hépatite qui peut être fulminante. Par ailleurs, il est d'usage d'associer le dosage de la céruléoplasmine à celui du cuivre sérique et urinaire pour disposer d'une vision d'ensemble du métabolisme du cuivre (188).

IV.2.2.2 Etiologies à explorer face à une hypertransaminémie chronique

Un second bilan plus complet est réalisé 2 mois après le bilan initial. Les ASAT sont toujours augmentées (256 U/L) alors que les ALAT sont comprises dans les valeurs de référence. Les GGT sont légèrement augmentées (57 U/L). Les résultats des autres examens de laboratoire sont sans particularité (PAL, Bilirubine totale, CK, haptoglobine, bilan martial). Les sérologies VHC et VHB sont négatives. La recherche des IgA anti-transglutaminases est négative et ce patient ne présente pas de déficit en IgA.

Question 2 :

Quelles sont les 3 étiologies qui peuvent être écartées à la lecture des résultats du 2^{ème} bilan biologique de Monsieur L. ?

- Une hépatite auto-immune
- Un déficit en α 1-antitrypsine
- Une interférence analytique
- Une cause extra-hépatique
- Une maladie cœliaque
- Un syndrome métabolique

Le graphique ci-dessous représente les réponses des participants à cette question :

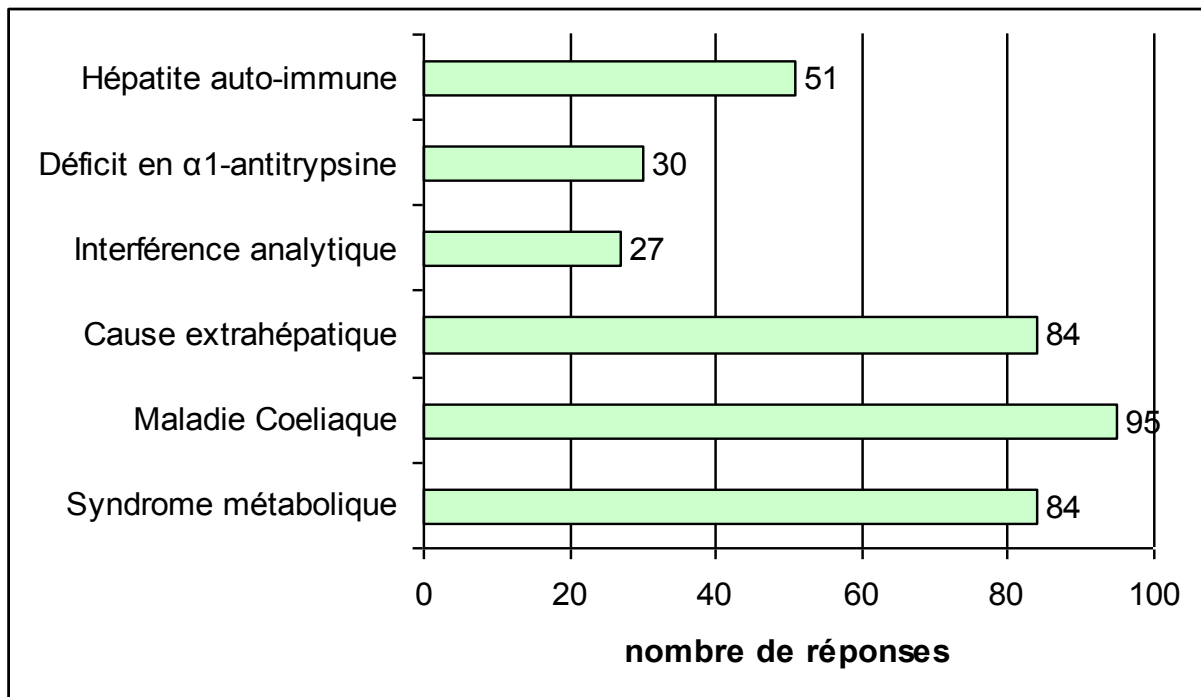


Figure 20 : Réponses des participants à la question 2 : Etiologies supprimées après la réalisation du bilan de contrôle

On voit que les participants ont majoritairement proposé les 3 réponses qui étaient attendues :

- Les causes extra-hépatiques
- La maladie cœliaque
- Le syndrome métabolique

Question 3 :

Pour éviter la prescription de bilans spécialisés coûteux, vous proposez au médecin d'éliminer en priorité l'une de ces étiologies. Laquelle ?

- Une hépatite auto-immune
- Un déficit en α 1-antitrypsine
- Une interférence analytique
- Une cause extra-hépatique
- Une maladie cœliaque
- Un syndrome métabolique

Le graphique ci-dessous représente les réponses des participants à cette question :

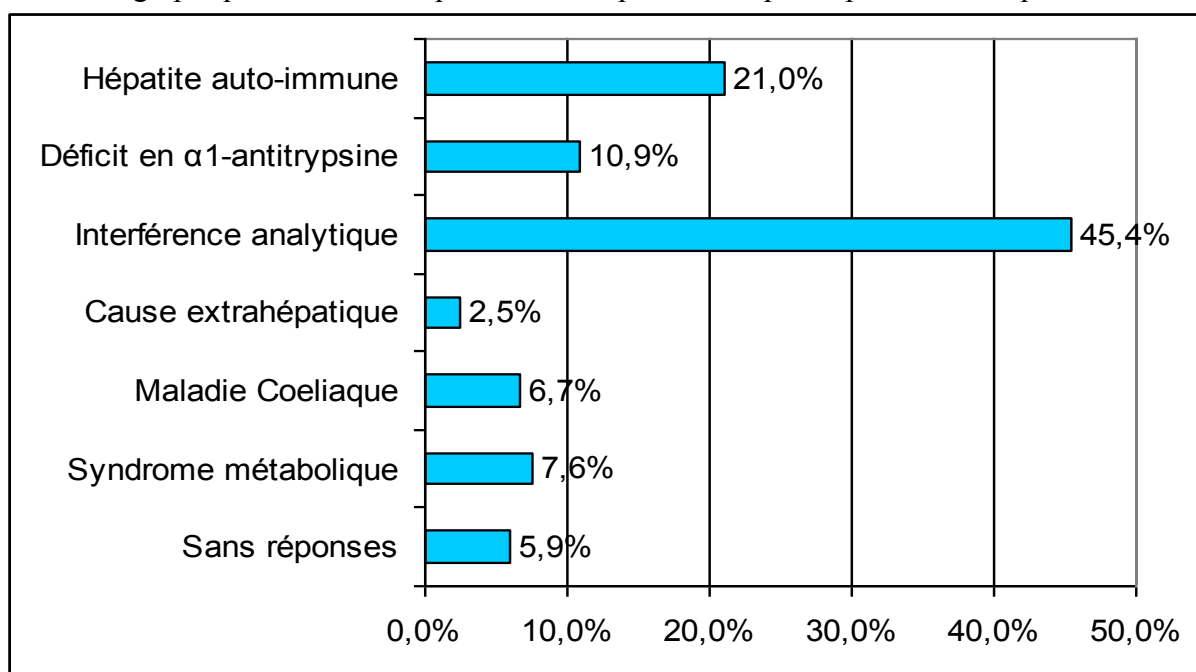


Figure 21 : Réponses des participants à la question 3 : Répartition de la principale étiologie à explorer après le bilan de contrôle

La majorité des réponses données par les participants concerne les interférences analytiques (45%), qui était la réponse attendue. Les réponses suivantes évoquent deux étiologies qui n'ont pas été éliminées par les bilans précédents : hépatite auto-immune (21%) et déficit en α 1-antitrypsine (11%).

Ces deux autres réponses étaient également envisageables, les examens réalisés ne permettant pas de les éliminer.

Toutes ces étiologies sont potentiellement responsables d'hypertransaminémies. Néanmoins, pour éviter un surcoût et des explorations non justifiées, il est préférable de hiérarchiser les examens à réaliser.

1. Une augmentation des ASAT isolée (sans augmentation des ALAT) peut être d'origine extrahépatique. En général, cette augmentation est importante ($> 7N$). Les ASAT sont présentes en forte quantité dans les muscles ou les hématies, il est nécessaire de vérifier l'absence de myolyse (dosage des CK) ou d'hémolyse (non

signalée par le biologiste et exclue par les dosages de bilirubine et d'haptoglobine). **Ce bilan permet d'écarter une éventuelle cause extrahépatique.**

2. Une élévation chronique inexplicée des transaminases peut être la seule manifestation d'une maladie cœliaque asymptomatique (189). La prévalence de l'augmentation des transaminases est proche de 10% chez des patients atteints de maladie cœliaque alors qu'elle est inférieure à 1% dans une population de référence (192). Le dépistage de la maladie cœliaque se fait dans un premier temps par la recherche des IgA anti-transglutaminase en s'assurant de l'absence d'un déficit en IgA. En cas de déficit en IgA, il convient actuellement de doser les IgG anti-transglutaminases ou IgG anti-endomysium. Les autres tests sérologiques n'ont plus leur place dans le diagnostic biologique de cette pathologie. La biopsie du grêle permettra de confirmer le diagnostic (191). Dans le cas de M.L., **la négativité des IgA anti-transglutaminases** et l'absence de déficit en IgA permettent **d'exclure le diagnostic de maladie cœliaque.**
3. Le syndrome polymétabolique est défini par la présence d'au moins 3 de ces critères : un tour de taille ≥ 102 cm chez l'homme, une pression artérielle $\geq 130/85$ mmHg, une hypertriglycémie $\geq 1,69$ mmol/L, une glycémie à jeun $\geq 6,1$ mmol/L ou un HDL-cholestérol $< 1,04$ mmol/L chez l'homme (192). M.L. ne présente **pas de syndrome polymétabolique.**

L'hypothèse la plus probable, qui n'a pas été exclue par les bilans de contrôles et qui nécessite donc d'être explorée en priorité est l'existence d'**une interférence analytique** et notamment la recherche d'une éventuelle macroaspartate aminotransférase (macroASAT). La dissociation constatée entre les activités ASAT et ALAT est importante ce qui est rarement observé en l'absence d'une étiologie extra-hépatique. Cette dissociation a été constatée lors des 2 bilans biologiques réalisés chez M.L., ce qui oriente d'emblée vers un problème d'interférence analytique ayant un caractère chronique.

Certaines hypothèses diagnostiques ne peuvent être totalement exclues mais restent peu probables :

- **Un déficit en $\alpha 1$ antitrypsine (A1AT)**, pathologie génétique de transmission autosomique récessive et de prévalence faible (1/2500). En général, ce diagnostic est évoqué en présence de symptômes respiratoires (emphysème pulmonaire) ou hépatiques, lesquels sont absents chez M.L. Le diagnostic peut être suspecté devant une diminution de la concentration sérique d' $\alpha 1$ antitrypsine et confirmé par un phénotypage de l'A1AT (IsoElectroFocalisation) ou par l'analyse du gène codant l'A1AT (193).
- **Une hépatite auto-immune**, est une maladie de prévalence très faible (de 0,1 à 1,2/100000 habitants) (195). Les transaminases peuvent alors être augmentées entre 2 et 50 fois. Deux pics de fréquence sont décrits : le premier entre 10 et 30 ans et le second entre 40 et 50 ans. Par ailleurs, ces patients présentent fréquemment une augmentation des gammaglobulines et une augmentation modérée des PAL. Le diagnostic est évoqué après avoir éliminé toutes les autres causes d'augmentation des transaminases. La confirmation se fait par la mise en évidence d'auto anticorps anti-muscle lisses, anti-nucléaires, anti-LKM1, anti-LC1 ou anti-SLA. Il peut être nécessaire de répéter ces examens (195). Le score modifié de l'International Autoimmune Hepatitis Group prend en compte différentes données pour établir le diagnostic (sexe, autres causes possibles d'hypertransaminémie, les auto-anticorps,

l'histologie et la réponse au traitement). Le diagnostic d'hépatite auto-immune reste souvent un diagnostic d'exclusion (196).

IV.2.2.3 Conclusion du cas clinique

Cette première partie du questionnaire avait essentiellement pour objectif de placer nos collègues biologistes en situation de prise en charge des hypertransaminémies modérées et chroniques. Nous souhaitons insister sur la nécessité de hiérarchiser les demandes lors de la prestation de conseils effectuée par le biologiste.

Les problèmes d'interférences analytiques qui vont nous occuper dans la suite du questionnaire sont importants à prendre en compte. En effet, le biologiste est le plus à même et bien souvent le seul à pouvoir envisager ce type de problème face à une anomalie biologique inexplicée.

IV.2.3 Cas clinico-biologique : exploration d'une interférence analytique

IV.2.3.1 Erreurs analytiques pouvant être mises en cause

Question 4 :

Indiquez l'hypothèse qui vous paraît la plus vraisemblable ?

- Dosage réalisé sur un tube non conforme
- Interférence due à un traitement intercurrent
- Défaut de prélèvement de l'automate lors du dosage des transaminases
- Présence d'une macroASAT interférant avec le dosage
- Interférence liée à une hémolyse du prélèvement

Réponses des participants et commentaires :

| Tube non conforme | Traitement interférent | Défaut de prélèvement | MacroASAT | hémolyse | Pas de réponse |
|-------------------|------------------------|-----------------------|-----------|----------|----------------|
| 1 | 6 | 1 | 99 | 8 | 4 |

Tableau 12 : Erreurs analytiques suspectés par les participants (nombre de réponses).

La majorité des participants (83%) envisagent une interférence provoquée par la présence d'une macroASAT.

Les macroenzymes sont une cause classique d'interférences et leur présence entraîne une augmentation chronique de l'activité d'une enzyme.

Dans ce cas c'est effectivement l'hypothèse la plus probable. En effet, cette interférence est répétable et le patient ne semble pas présenter de caractéristiques cliniques ou thérapeutiques particulières qui pourraient expliquer une autre cause d'interférence.

Cependant, les autres causes d'erreurs analytiques peuvent être évoquées ou faire l'objet d'une discussion.

- L'hémolyse *in vivo* a été éliminée sur le second prélèvement (haptoglobulinémie normale). Une hémolyse *in vitro* ne peut pas être éliminée avec les renseignements fournis. Néanmoins, devant l'importance des valeurs de transaminases et le caractère chronique de cette augmentation, ce type d'interférence est peu probable. La plupart

des automates affichent actuellement un indice d'hémolyse. En l'absence de système de contrôle, l'examen à l'œil nu du tube permet d'éliminer cette cause.

- Le tube non conforme ou le défaut de prélèvement sont deux hypothèses peu probables devant une interférence chronique. De plus, la non-conformité donne lieu à une alerte avec éventuellement annulation du dosage et information du prescripteur concerné.
- En revanche, l'interférence provoquée par un traitement n'est pas exclue et pourrait expliquer une hypertransaminémie chronique. Bien que l'interrogatoire ne mentionne aucun traitement particulier, le patient peut omettre de préciser ses traitements ou ses habitudes alimentaires. Pour éliminer ce type d'interférence, les fiches techniques des fournisseurs peuvent permettre une première approche mais ces dernières sont rarement exhaustives. Ainsi, il est souvent nécessaire de faire quelques recherches bibliographiques. La littérature dans ce domaine est souvent insuffisante et le biologiste se retrouve parfois démuné lorsqu'il faut établir un lien de causalité entre interférence et médicament.

Dans ces propositions, nous avons été contraints de mentionner la présence d'une macroASAT. Dans le cas d'une réponse libre, les participants ne se seraient peut être pas orienté vers cette hypothèse relativement rare.

La proportion de participants ayant envisagé une interférence par une macroASAT est probablement surestimée. Plus de 80% des participants y ont songé, alors que cette cause est inhabituelle, et qu'un tiers des participants n'ont jamais été confrontés à ce type d'anomalie. La suite du questionnaire a probablement orienté *a posteriori* les réponses à cette question, biaisant ainsi l'interprétation des résultats.

Aucune interférence spécifique (parmi celles qui sont proposées ou issues des réponses libres) n'est corrélée à l'utilisation d'un automate. Ceci suggère que les participants ne sont pas particulièrement sensibilisés à un risque d'interférence spécifique par rapport à leur technique de dosage. La conclusion est identique que les réactifs contiennent ou non du phosphate de pyridoxal (méthode recommandée par l'IFCC) (176,177).

IV.2.3.2 Démarches effectuées par les laboratoires en présence de cette interférence

Une question concernant l'exploration de cette interférence par les participants nous a permis de faire le point sur les démarches réalisées ainsi que leurs fréquences.

Question 5 :

Dans cette situation particulière quelle(s) décision(s) prenez-vous ?

- Vous n'avez jamais été confronté à ce type d'interférence.
- Vous jugez toute exploration complémentaire inutile.
- Vous concluez à une interférence analytique et vous prévenez le prescripteur pour qu'il le note dans le dossier médical du patient afin d'éviter toute exploration ultérieure inutile.
- Vous envoyez le prélèvement pour exploration complémentaire dans un centre spécialisé
- Vous prenez en charge cette exploration complémentaire dans votre LBM

Cette question nous permet d'évaluer les pratiques professionnelles face à une suspicion d'interférence par une macroenzyme. Les participants pouvaient répondre par

plusieurs items. Le graphique ci-dessous représente les réponses en fonction de l'attitude prise par le biologiste.

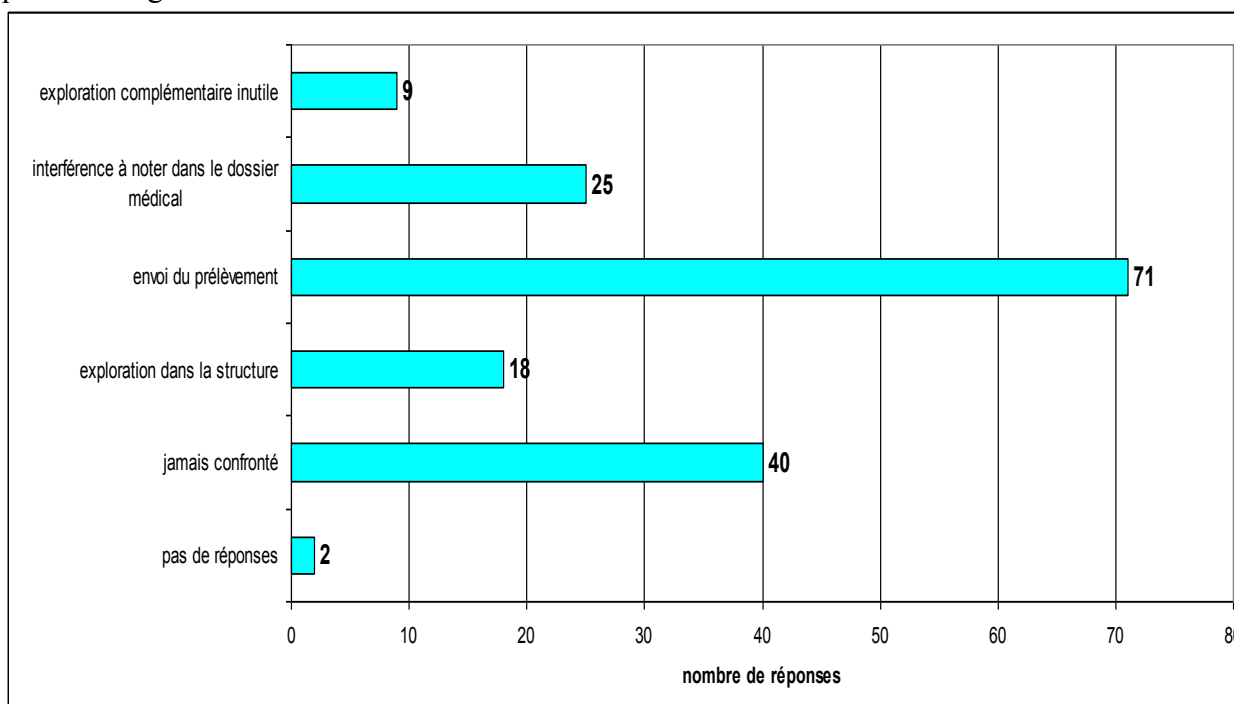


Figure 22 : Conduite adoptée par les participants lors de la recherche d'une macroenzyme

Une part non négligeable des participants (34%) n'a jamais été confrontée à ce type de problématique. Parmi eux, un certain nombre de participants (n=15 soit 12%) n'ont pas précisé leur attitude face à cette problématique. Nous les avons donc exclus du calcul des pourcentages suivants ainsi que les participants qui n'ont pas répondu à cette question.

Au total, 90 biologistes (88%) décident d'explorer cette interférence analytique. Lorsque les laboratoires disposent des moyens techniques adaptés, ces analyses complémentaires sont réalisées *in situ* (16%). Dans le cas contraire, elles font l'objet d'envoi vers des laboratoires extérieurs (69%). Vingt cinq % des participants envisagent de signaler l'interférence aux cliniciens, parfois avant même la réalisation des explorations complémentaires (envoi ou expertise au sein du LBM). Dans 3% des cas, le clinicien n'est pas prévenu et aucune exploration complémentaire n'est effectuée.

Il est décrit dans la littérature des cas où les macroenzymes peuvent perdurer pendant des années et conduire à des explorations inutiles et parfois invasives. Il semble donc nécessaire de signaler ce type d'interférence dans le dossier biologique.

IV.2.3.3 Utilité de l'identification de l'interférence

Question 6 :

Vous paraît-il utile de déterminer avec précision ce type d'interférence

- Oui, l'identification de l'interférence en cause peut orienter la prise en charge du patient
- Non, l'identification de l'interférence en cause n'a aucun impact sur la prise en charge du patient
- Cela dépend du dosage enzymatique concerné

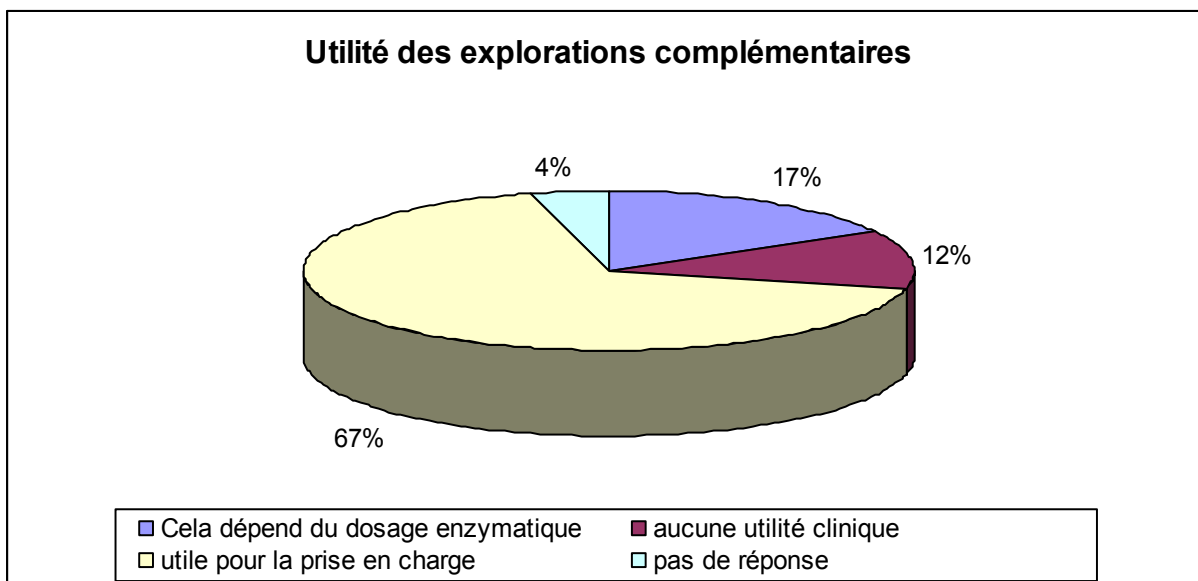


Figure 23 : Répartition des participants en fonction de leur avis sur l'utilité des explorations complémentaires

Si 67% des participants jugent la prescription d'explorations complémentaires utile dans la prise en charge des patients, 12% estiment cela sans intérêt. En revanche 17% des participants nuancent leur réponse en concluant que tout dépend du dosage enzymatique considéré.

Dans l'hypothèse où cette interférence est due à la présence d'une macroenzyme, la caractérisation de cette dernière peut avoir une importance non négligeable dans la prise en charge du patient.

Les impacts cliniques des macroenzymes ont été détaillés dans la partie 2.3 de ce manuscrit et sont synthétisés dans l'annexe 3 : Compte rendu de l'enquête de pratique professionnelle SFBC.

IV.2.3.4 Techniques utilisées pour mettre en évidence les macroenzymes

La dernière partie concerne le point très spécifique des techniques de dépistage des macroenzymes. Aucune recommandation n'est actuellement disponible sur ce sujet. Cette question avait un double objectif :

- ✓ Faire un inventaire des techniques utilisées ou envisagées par les laboratoires.
- ✓ Permettre, via le compte rendu, de faire le point sur les techniques de dépistage dans le but de contribuer à améliorer les pratiques.

Question 7 :

Quelle(s) est (sont) la(es) technique(s) utilisée(s) en 1^{ère} intention pour dépister ce type d'interférence en fonction des enzymes concernées

- L'électrophorèse des isoenzymes
- La chromatographie par gel filtration
- La précipitation par le PEG sans comparaison avec un témoin
- La précipitation par le PEG avec comparaison avec un témoin
- L'ultrafiltration

Dix huit virgule cinq % participants utilisent en première intention au moins deux techniques, 73,1% une seule technique et 8,4% n'ont pas répondu à la question. Ce taux de non réponse peut s'expliquer par l'aspect très technique de cette question.

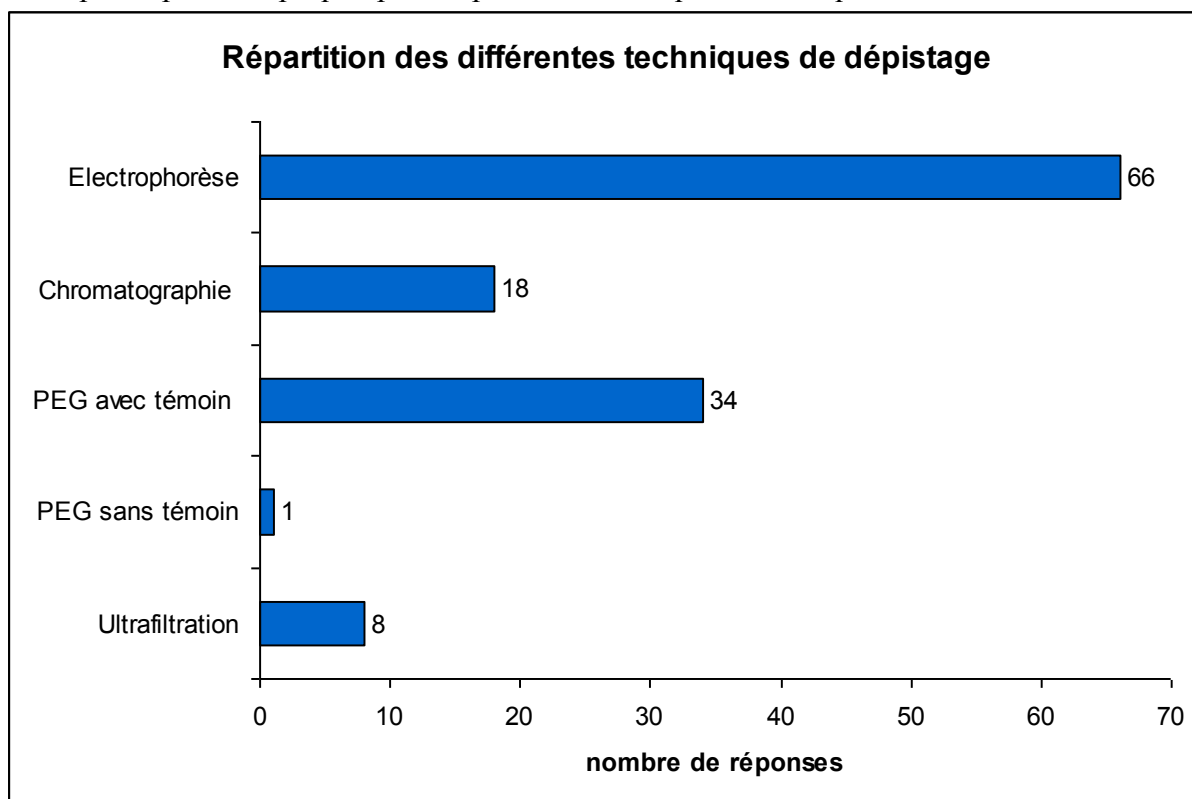


Figure 24 : Techniques de dépistage proposées par les biologistes.

Ces techniques peuvent toutes être utilisées dans le dépistage des macroenzymes.

La technique la plus plébiscitée par les biologistes est l'électrophorèse des isoenzymes qui représente un peu plus de 50% des réponses. La chromatographie par gel filtration représente 14% des réponses. Ces deux techniques sont les techniques de référence mais nécessitent des compétences spécifiques notamment pour la seconde.

Les deux techniques permettant un dépistage simple et universel sont assez bien représentées :

- la précipitation par le PEG (27%)
- l'ultrafiltration (6%).

Les laboratoires qui effectuent ces explorations sont au nombre de 18, répartis comme suit : 16 CHRU, 2 CHG-CHR, 1 LBM d'un ETS privé. Parmi eux, 2 laboratoires confortent leurs résultats en réalisant un envoi à une autre structure.

Il est instructif de comparer les techniques de dépistage qui sont effectuées par les laboratoires exécutant eux-mêmes les explorations par rapport aux autres LBM.

| | LBM effectuant l'exploration (n=18) | Autres LBM (n=92) |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| Ultrafiltration | 4,5% | 8% |
| Electrophorèse | 32% | 56% |
| Chromatographie | 13,5% | 14% |
| PEG avec témoin | 50% | 22% |
| PEG sans témoin | 0% | 1% |
| Au moins deux techniques | 17% | 17% |

Tableau 13 : Comparaison des techniques de dépistage selon que les LBM effectuent l'exploration *in situ* ou pas.

Les laboratoires effectuant les explorations privilégient des procédés simples et universels, tels que la précipitation par le PEG, méthode largement décrite pour mettre en évidence les big-big prolactine (ou macroprolactine, macroPRL), (90,197).

Les laboratoires n'effectuant pas l'exploration citent préférentiellement l'électrophorèse comme technique de dépistage alors qu'en pratique, cette méthode n'est utilisée que par un tiers des LBM qui effectuent le dépistage. L'électrophorèse a la particularité de permettre la caractérisation des isoformes de certaines enzymes (CK, PAL, LDH). C'est probablement la raison pour laquelle les biologistes non experts pensent à cette technique en première intention.

Nous pouvons classer les méthodes utilisées pour mettre en évidence les macroenzymes en deux catégories :

- **Techniques de dépistage faciles à mettre en œuvre :**
 - **La précipitation par le PEG** décrite initialement par Lewitt et Ellis lors du dépistage d'une macroenzyme en l'occurrence la macroamylase (198). Depuis son application a été étendue à l'ensemble des macroenzymes (89). Le PEG a la propriété de faire précipiter quasiment totalement les immunoglobulines G et M et environ 80% des IgA. Il participe également à un réarrangement des lipides des LDL. C'est pourquoi il peut être utilisé pour les enzymes qui sont liées à ces deux types de molécules. Le PEG semble aussi faire précipiter d'autres macroenzymes, telles que les macro CK de type 2 (81). Toutefois, cette technique n'est actuellement pas standardisée et différents auteurs ont mis en évidence des variations en fonction des conditions opératoires. Par exemple, Les équipes de Patteet et de Fahie-Wilson ont montré que la variation de la concentration en PEG exerce une influence sur l'efficacité de la précipitation des macroenzymes (cf. annexe 4) (94,199).
 - **L'ultrafiltration** semble être aussi discriminante que la précipitation par le PEG. Wyness *et al.* ont montré que cette technique est fiable pour dépister les macroenzymes (étude réalisée sur les macroamylases et les macroCK). De part son principe, elle permet de détecter toutes les macroenzymes (81). Néanmoins les études concernant cette technique sont peu nombreuses.
 - Quelques comparaisons ont été effectuées entre ces deux techniques sans que l'une ou l'autre ne montre de supériorité. Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire ont également été déterminés. **Pour les LDH, amylase et lipase, l'ultrafiltration semble plus reproductible** tandis que **pour la GGT, la précipitation semble être mieux adaptée** (84). En ce qui concerne les macroCK, **la technique de précipitation par le PEG semble plus sensible** donc préférable dans le cadre d'un dépistage (81).
 - **Ces deux techniques sont économiques, reproductibles, fiables et faciles à mettre en œuvre** néanmoins il n'y a actuellement pas de consensus sur les protocoles et les valeurs de référence à utiliser.
 - C'est pourquoi il reste nécessaire d'établir ses propres valeurs de référence avec des témoins ou d'utiliser les données de la littérature (84,85). Wyness *et al.* ont établi des valeurs de référence de recouvrement de l'activité enzymatique pour huit enzymes (ASAT, ALAT, PAL, GGT, LDH, CK, amylase et lipase) après ultrafiltration et précipitation par le PEG. Concernant les ALAT, l'activité enzymatique mesurée après le prétraitement, quel que soit le procédé, est faible. Ceci conduit les auteurs à mettre en **doute** l'efficacité de ces techniques **pour détecter d'éventuelles macroALAT** (81,84).

- **Techniques plus spécialisées et nécessitant des compétences spécifiques :**

Si historiquement, Remaley et Wilding (1989) conseillent l'utilisation des techniques de précipitation par le PEG pour mettre en évidence les macroenzymes de type 1, ces auteurs soulignent l'intérêt des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie pour celles de type 2 (37).

- **Électrophorèse des isoenzymes** est une technique sensible qui permet de déterminer directement le type de macroenzyme. Le recours à cette technique est principalement réservé à 3 enzymes : PAL, GGT et CK.
- **Chromatographie d'exclusion stérique** peut être utilisée quelle que soit l'enzyme. Néanmoins devant la complexité de sa mise en œuvre, elle est réservée à certains laboratoires.

En conclusion, pour dépister une macroenzyme :

- Les laboratoires ne disposant pas des techniques de référence (électrophorèse des isoenzymes et chromatographie d'exclusion stérique) peuvent utiliser :
 - ✓ la **précipitation par le PEG** qui est une technique simple mais qui nécessite de se référer aux modes opératoires publiés et comparer les résultats obtenus aux valeurs de référence de ces publications (81,84,85). Il est conseillé dans ce cas d'utiliser des plasmas témoins pour valider la bonne réalisation technique de l'analyse (89,94).
 - ✓ L'**ultrafiltration** peut, comme la précipitation par le PEG, être utilisée par tous les laboratoires. En effet, ces deux techniques requièrent un équipement modeste (contrairement à l'électrophorèse ou la chromatographie).

Nous pouvons regretter qu'avec l'accréditation rendue obligatoire par l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010, la mise en place de ces techniques risque d'être progressivement abandonnée car nécessitant trop d'essais lors de la validation des méthodes pour pouvoir être rentable (167).

Dans tous les cas, face à un résultat positif obtenu avec une technique de dépistage (PEG, UF), il convient de confirmer la présence d'une macroenzyme au moyen d'une technique de référence (électrophorèse, chromatographie).

CONCLUSION

Lors de mon stage d'interne au sein du service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Métabolisme et Nutrition du CHRU de Nancy (chef de Service Pr. J-L. GUEANT), nous avons décelé une discordance biologique entre le dosage des CK-MB et des troponines, qui sont deux marqueurs de nécrose cardiaque chez des patients suivis pour une infection par le VIH. Cette apparente discordance biologique entre activités CK-MB élevées et concentrations plasmatiques de troponines indétectables en dehors de tout contexte évocateur d'une pathologie coronarienne ou d'une nécrose cardiaque nous a conduit à évoquer la présence d'une probable interférence.

Nous avons pu compléter l'analyse des dossiers biologiques de 16 patients répondant à ces critères par la réalisation d'une électrophorèse des isoenzymes des CK. Nous avons constaté la présence d'une macroCK de type 2 dans tous les cas, cette dernière expliquant les discordances observées. Cette molécule est à l'origine d'une augmentation chronique et artéfactuelle des activités CK et CK-MB, alors que les patients ne présentent pas de troubles musculaires ou cardiaques. Cette forme moléculaire rare est généralement observée lors de pathologies sévères. Dans notre cohorte de patients, aucune des pathologies classiquement associées à la présence d'une macroCK de type 2 n'était prédominante, si ce n'est une infection par le virus de l'immunodéficience humaine. En revanche, l'étude des dossiers cliniques de ces patients nous a orientés vers une éventuelle origine pharmacologique. L'examen de la bibliographie a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, un lien avec la prise de ténofovir (molécule antirétrovirale) a été mis en évidence dans la survenue de cette particularité biologique. Une estimation de la fréquence de survenue de cette interférence montre que le risque d'apparition de macroCK2 est supérieur chez les patients traités par ténofovir par rapport à ceux dont le traitement ne comporte pas cette molécule. Cette étude a été publiée dans la rubrique « Lettre à l'Editeur » de la revue *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (CCLM- Impact Factor 2012 = 3.009).

En nous inspirant de ce cas clinico-biologique, nous avons souhaité compléter ce travail par une enquête de pratiques professionnelles réalisée au niveau national, grâce au soutien de la Société Française de Biologie Clinique. Cette enquête avait pour objectif pédagogique de sensibiliser les biologistes à la problématique des macroenzymes et à l'importance de leur mise en évidence. Aucune recommandation ne définissant actuellement les conduites à tenir lors d'une suspicion de macroenzyme, nous avons également répertorié les techniques utilisées par les 119 laboratoires qui ont participé à cette enquête. L'étude de la bibliographie et ce retour des laboratoires semblent mettre en évidence que deux techniques simples, universelles, et économiques sont adaptées pour le dépistage des macroenzymes : l'ultrafiltration et la précipitation par le polyéthylène glycol.

En conclusion, ce travail, débuté par une approche analytique centrée sur des résultats biologiques évocateurs d'une interférence rare, s'est enrichi de la mise en place d'un dialogue clinico-biologique. Dans un second temps, le partage d'expérience, réalisé grâce à une enquête de pratique professionnelle, m'a permis de communiquer sur ces interférences et de profiter du retour d'expérience des participants pour proposer une démarche de dépistage des macroenzymes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994;40:1996-2005.
2. Barbier A, Vuillaume I, Baras A, Coiteux V, Maboudou P, Rousseaux J. Interférence par une IgM monoclonale dans un bilan biochimique : détection et recommandations. *Ann Biol Clin.* 2007;65(4):411-415.
3. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin.* 1999;57(6):685-95.
4. Bais R. The effect of sample hemolysis on cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem.* 2010;56(8):1357-1359.
5. Hainque B, Baudin B, Lefebvre P. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Médecine-Science. Flammarion. 2008.
6. Beaudeau JL, Durand G. Biochimie médicale. Marqueurs actuels et perspectives. Deuxième édition. Médecine Lavoisier. 2011.
7. Piketty M-L, Lancelin F, Poirier-Bègue E, Guillouzic D le. Pièges analytiques en hormonologie thyroïdienne. *MTE.* 2000;2(4):311-22.
8. Kaitwatcharachai C, Kaitwatcharachai S, Aeden J, Wiriyasombat D. The glucose interference in creatinine measurement using an enzymatic method: effect of creatinine concentrations. *J Med Assoc Thail.* 2011;94(Suppl 4):S131-134.
9. Émile C. Interférences médicamenteuses sur les résultats en immunoanalyse. *Option Bio.* 2009;20(413):16-17.
10. Siest G, Henny J, Schiele F. Référence en biologie clinique. Elsevier. 1990.
11. Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. *Ann Clin Biochem.* 2001;38(Pt 4):376-385.
12. Sapin R. Interférences dans les immunodosages : mécanismes et conséquences en endocrinologie. *Ann Endocrinol.* 2008;69(5):415-425.
13. Kesavachandran CN, Haamann F, Nienhaus A. Frequency of thyroid dysfunctions during interferon alpha treatment of single and combination therapy in hepatitis C virus-infected patients: a systematic review based analysis. *PloS One.* 2013;8(2):e55364.
14. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *American Association for Clinical Chemistry Press.* 2000. Fifth Edition.
15. Tintu A, Rouwet E, Russcher H. Interference of ethylene glycol with (L)-lactate measurement is assay-dependent. *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 1):70-72.
16. Powers RH, Dean DE. Evaluation of Potential Lactate/Lactate Dehydrogenase Interference with an Enzymatic Alcohol Analysis. *J Anal Toxicol.* 2009;33(8):561-563.
17. Malandain H, Cano Y. Place des techniques enzymatiques dans le diagnostic et le suivi des intoxications par un alcool ou un glycol. *Toxicorama.* 1999;6(4).

18. Schifferli JA, Roth P, Steiger G, Paccaud JP, Schmidt M. Macro-prostatic acid phosphatase in a patient's serum. *Clin Chem*. 1988;34(10):2172-2174.
19. Klonoff DC. Macroamylasemia and other immunoglobulin-complexed enzyme disorders. *West J Med*. 1980;133(5):392-407.
20. Fridhandler L, Berk JE. Macroamylasemia. *Adv Clin Chem*. 1978;20:267-286.
21. Adachi K, Suzuki K, Ohno Y, Sato B. Impaired amylase activities caused by binding of abnormal immunoglobulin A in patients with macroamylasemia. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1986;154(2):103-113.
22. Konttinen A, Murros J, Ojala K, Salaspuro M, Somer H, Räsänen J. A new cause of increased serum aspartate aminotransferase activity. *Clin Chim Acta*. 1978;84(1-2):145-147.
23. Weidner N, Lott JA, Yale VD, Wahl RL, Little RA. Immunoglobulin-complexed aspartate aminotransferase. *Clin Chem*. 1983;29(2):382-384.
24. Burlina A, Secchiero S, Bertorelle R, Plebani M, Zaninotto M. Immunoglobulin A (lambda chains) conjugated with lactate dehydrogenase in serum. *Clin Chem*. 1987;33(6):1085-1086.
25. Mishler JM, Dürr GH. Macroamylasemia induced by hydroxyethyl starch--confirmation by gel filtration analysis of serum and urine. *Am J Clin Pathol*. 1980;74(4):387-391.
26. Köhler H, Kirch W, Horstmann HJ. Hydroxyethyl starch-induced macroamylasemia. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*. 1977;15(9):428-431.
27. Ihara H, Aoki Y, Saito Y, Aoki T. Macro-creatine kinase type 1 possibly induced by intravenous hyperalimentation. *Clin Chim Acta*. 1988;178(1):109-110.
28. Triester SL, Douglas DD. Development of macro-aspartate aminotransferase in a patient undergoing specific allergen injection immunotherapy. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(1):243-245.
29. Parfait B, Pavie J, Ramond MJ, Leban M, Vidaud M, Fantin B. Exploration d'une augmentation isolée de l'aspartate aminotransférase chez une patiente traitée par la minocycline : mise en évidence d'une macroenzyme. *Ann Biol Clin*. 2000;58(1):97-99.
30. Loh TP, Ang YH, Neo SF, Yin C, Wong MS, Leong SM, et al. Immunoglobulin-associated creatine kinase masquerading as macro-creatine kinase type 2 in a statin user. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2012;51(9):1061-1064.
31. Wilding P, Cooke W, Nicholson I. Globulin-bound amylase: a cause of persistently Elevated Levels in Serum. *Ann Int Med*. 1964;60:1053-9.
32. Wilding P, Geokas MC, Haverback BJ, Stanworth DR. Hyperamylasemia due to protein-bound amylase. *Am J Med*. 1969;47(3):492-496.
33. Berk JE, Kizu H, Wilding P, Searcy RL. Macroamylasemia: a newly recognized cause for elevated serum amylase activity. *N Engl J Med*. 1967;277(18):941-946.
34. Lundh B. A macromolecular serum lactate dehydrogenase activity in a case of leukemia. *Clin Chim Acta*. 1967;16(2):305-309.
35. Ganrot PO. Lupoid cirrhosis with serum lactic acid dehydrogenase linked to an gamma A immunoglobulin. *Experientia*. 1967;23(7):593.
36. Nagamine M, Okuma S. Serum alkaline phosphatase isoenzymes linked to immunoglobulin G. *Clin Chim Acta*. 1975;65(1):39-46.
37. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*. 1989;35(12):2261-2270.

38. Mifflin TE, Bruns DE, Wrotnoski U, MacMillan RH, Stallings RG, Felder RA, et al. University of Virginia case conference. Macroamylase, macro creatine kinase, and other macroenzymes. *Clin Chem*. 1985;31(10):1743-1748.
39. Sturk A, Sanders GT. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1990;28(2):65-81.
40. Levitt MD, Cooperband SR. Hyperamylasemia from the binding of serum amylase by an 11S IgA globulin. *N Engl J Med*. 1968;278(9):474-479.
41. Tomasi TB Jr, Hauptman SP. The binding of alpha-1 antitrypsin to human IgA. *J Immunol Baltim Md*. 1974;112(6):2274-2277.
42. Laurell CB, Thulin E. Complexes in plasma between light chain kappa immunoglobulins and alpha 1-antitrypsin respectively prealbumin. *Immunochemistry*. 1974;11(11):703-709.
43. Fujita K, Sakurabayashi I, Kusanagi M, Kawai T. A lactate dehydrogenase-immunoglobulin G1 complex, not blocked by anti-idiotypic antibody, in a patient with IgG1-lambda type M-proteinemia. *Clin Chem*. 1987;33(8):1478-1483.
44. Chappell DJ, BATTERY JE, Pannall PR. Atypical LD isoenzymes with five diffuse bands and evidence for two types of binding. *Clin Chim Acta*. 1987;162(1):37-44.
45. Fridhandler L, Berk JE, Wong D. Affinity characteristics of amylase-binding substance(s) prepared from macroamylase complexes. *Clin Chem*. 1974;20(1):22-25.
46. Stein W, Bohner J, Bahlinger M. Macro lipase--a new member of the family of immunoglobulin-linked enzymes. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1987;25(12):837-843.
47. Moriyama T, Ashiie T, Kikuri K, Nishiyama Y, Ito Y, Nobuoka M, et al. Mitochondrial aspartate aminotransferase linked to immunoglobulin G of the kappa-lambda type: report of a case. *Clin Chim Acta*. 1986;160(3):297-305.
48. Kohno H, Sudo K, Kanno T. Intestinal alkaline phosphatase linked to immunoglobulin G of the kappa type. *Clin Chim Acta*. 1983;135(1):41-48.
49. Kajita Y, Majima T, Yoshimura M, Hachiya T, Miyazaki T, Ijichi H, et al. Demonstration of antibody for glutamic pyruvic transaminase (GPT) in chronic hepatic disorders. *Clin Chim Acta*. 1978;89(3):485-492.
50. Crofton PM. Site of alkaline phosphatase attachment in alkaline phosphatase-immunoglobulin G complexes. *Clin Chim Acta*. 1981;112(1):33-42.
51. Moriyama T, Takebe T, Nobuoka M, Makino M. Characterization of amylase linked immunoglobulin G to distinguish human salivary and pancreatic isoamylases. *Clin Chim Acta*. 1988;174(1):25-33.
52. Kanno T, Sudo K. Properties of amylase-linked immunoglobulins. *Clin Chim Acta*. 1977;76(1):67-77.
53. Cepelak I, Cvoriscec D. Why is it necessary to recognize macroenzymes? *Biochem Medica*. 2007;17(1):52-9.
54. Urdal P, Landaas S, Kierulf P, Strømme JH. Macroamylase immunoglobulins show high affinity for animal and human amylases. *Clin Chem*. 1985;31(5):699-702.
55. Urdal P. Macro creatine kinase BB isoenzyme in serum: most likely an antigen-autoantibody complex. *Scand J Clin Lab Invest*. 1981;41(5):499-505.
56. Maekawa M, Sudo K, Iwahara K, Kanno T. Lactate dehydrogenase inhibition by immunoglobulin G in human serum. *Clin Chem*. 1986;32(7):1347-1349.
57. Fujita K, Takeya C, Saito T, Sakurabayashi I. Macro lactate dehydrogenase: an LDH-immunoglobulin M complex that inhibits lactate dehydrogenase activity in a patient's serum. *Clin Chim Acta*. 1984;140(2):183-195.

58. Yasmineh WG, Lewis LA, Apple FS. Chromatographic behavior of immunoglobulin-bound creatine kinase on DEAE-Sephadex A-50. *Clin Chim Acta*. 1984;144(1):29-37.
59. Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl Lekárske Listy*. 2004;105(7-8):260-263.
60. Artur Y, Sanderink GJ, Maire I. Les macroenzymes dans le plasma humain, 2ème partie. Macrogamma-glutamyltransférase, macroalanine aminopeptidase, macrophosphatase alcaline, macroaminotransférases et autres macroenzymes. *Ann Biol Clin*. 1987;45(3):277-284.
61. Schifferli JA, Despont JP, Cruchaud A, Carpentier N, Jeannet M, Schmidt M. Macro-creatine kinase type 1. Immunological studies in 14 patients with comments on clinical significance. *Arch Pathol Lab Med*. 1986;110(5):425-429.
62. Hirano T, Matsuzaki H, Miura M, Kojima E, Tamura N, Sekine T. An immunoglobulin G inhibiting lactate dehydrogenase activity. *Clin Chim Acta*. 1986;159(1):17-25.
63. Zimmerman HM, Bank S, Buch P, Katzka I, Lendvai S. Macroamylase in the pleural fluid of a patient with lymphoma. *Gastroenterology*. 1983;85(1):190-193.
64. Tomasi TB, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med*. 1965;121:101-124.
65. Delanghe J, De Buyzere M, De Scheerder I, Vanderborght J, Wieme R. Macro-lactate dehydrogenase in serum after acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 1987;33(6):1103-1104.
66. Delanghe J, De Scheerder I, De Buyzere M, Algoed L, Robbrecht J. Macro CK type 1 as a marker for autoimmunity in coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1986;60(3):215-219.
67. Van Acker K, Verbraeken H, Baluwé R, Neels H. Abnormal patterns of lactate dehydrogenase isoenzymes after streptokinase therapy. *Clin Chem*. 1986;32(12):2210.
68. Podlasek SJ, McPherson RA, Threatte GA. Specificity of autoantibodies to lactate dehydrogenase isoenzyme subunits. *Clin Chem*. 1985;31(4):527-532.
69. Wu AH, Herson VC, Bowers GN Jr. Macro creatine kinase types 1 and 2: clinical significance in neonates and children as compared with adults. *Clin Chem*. 1983;29(1):201-204.
70. Stein W, Bohner J, Bahlinger M. Analytical patterns and biochemical properties of macro creatine kinase type 2. *Clin Chem*. 1985;31(12):1952-1958.
71. Soboll S, Brdiczka D, Jahnke D, Schmidt A, Schlattner U, Wendt S, et al. Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(4):857-866.
72. Schlattner U, Wallimann T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem*. 2000;275(23):17314-17320.
73. Lang H, Würzburg U. Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clin Chem*. 1982;28(7):1439-1447.
74. Crofton PM, Smith AF. High-molecular-mass alkaline phosphatase in serum and bile: physical properties and relationship with other high-molecular-mass enzymes. *Clin Chem*. 1981;27(6):860-866.
75. Huseby NE. Multiple forms of serum gamma-glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 1982;124(1):103-112.
76. De Broe ME, Borgers M, Wieme RJ. The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. *Clin Chim Acta*. 1975;59(3):369-372.

77. Levitt MD. Clinical use of amylase clearance and isoamylase measurements. *Mayo Clin Proc.* 1979;54(7):428-431.
78. Sapin R. Thyroxine (T4) totale et libre. *EMC – Biologie médicale.* 2003;1-0 [Article 90-10-0900].
79. Vlahos I, MacMahon W, Sgoutas D, Bowers W, Thompson J, Trawick W. An improved ultrafiltration method for determining free testosterone in serum. *Clin Chem.* 1982;28(11):2286-2291.
80. Guéchet J, Fiet J. Dosage de la testostérone plasmatique : difficultés méthodologiques et intérêt physiopathologique. *Rev Francoph Lab.* 2009; (414):51-56.
81. Wyness SP, Hunsaker JJH, La'ulu SL, Rao LV, Roberts WL. Detection of macro-creatinine kinase and macroamylase by polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration methods. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23-24):2052-2057.
82. Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, Pawlikowski M, Świątosławski J, Winczyk K. The detection of macroprolactin by precipitation and ultrafiltration methods. *Endokrynol Pol.* 2011;62(6):529-536.
83. Prazeres S, Santos MA, Ferreira HG, Sobrinho LG. A practical method for the detection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58(6):686-690.
84. Wyness SP, Hunsaker JJH, La'ulu SL, Roberts WL. Reference intervals for six enzymes after polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration. *Clin Chim Acta.* 2011;412(11-12):1161-1162.
85. Davidson DF, Watson DJM. Macroenzyme detection by polyethylene glycol precipitation. *Ann Clin Biochem.* 2003;40(Pt 5):514-520.
86. Henning T. Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. *SÖFW-J.* 2001;127(10):28-32.
87. Thomas X, Cannas G, Chelghoum Y, Gougounon A. Alternatives thérapeutiques à la L-asparaginase native dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'adulte. *Bull Cancer.* 97(9):1105-1117.
88. Macquin-Mavier I, Hezode C, Dhumeaux D. Les interférons pégylés : bases pharmacologiques. *Gastroenterol Clin Biol.* 2002;26:742-47.
89. Wener RRL, Loupatty FJ, Schouten WEM. Isolated elevated aspartate aminotransferase: a surprising outcome for clinicians. *Neth J Med.* 2012;70(3):136-138.
90. Coussieu C. Prolactine : pièges et difficultés pour le laboratoire. *Rev Francoph Lab.* 2009; (414):41-49.
91. Briggs CJ, Anderson D, Johnson P, Deegan T. Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol. *Ann Clin Biochem.* 1981;18(3):177-181.
92. George R, Wallage M, Goodall R. The use of trypsin to confirm the presence of macrocreatinine kinase on isoenzyme electrophoresis. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(4):359-362.
93. Lagabrielle JF, Bonnefoy B, Vergnaud S, Boin V, Tachet A. Une « cytolysé hépatique chronique » : découverte d'une macro-ASAT. *Immunoanal Biol Spec.* 2008;23(3):179-182.
94. Patteet L, Simoens M, Piqueur M, Wauters A. Laboratory detection of macro-aspartate aminotransferase: case report and evaluation of the PEG-precipitation method. *Clin Biochem.* 2012;45(9):691-693.

95. Buttery JE, Milner CR, Nenadovic P, Pannall PR. Detection of alkaline phosphatase/immunoglobulin complexes. *Clin Chem.* 1980;26(11):1620-1621.
96. Bauer K, Bayer PM, Deutsch E, Gabl F. Binding of enzyme-IgG complexes in human serum to Protein-A Sepharose CL-4B. *Clin Chem.* 1980;26(2):297-300.
97. Hocchi K, Ohashi T, Miura T, Sasagawa K, Sato Y, Nomura F, et al. Development of an ELISA method for detecting immune complexes between tissue-nonspecific alkaline phosphatase and immunoglobulin G. *J Clin Lab Anal.* 2007;21(5):322-329.
98. Davidson DF, Scott JG. Detection of creatine kinase macroenzymes. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(5):482-485.
99. Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(3):233-235.
100. Etienne E, Hanser A-M, Woehl-Kremer B, Mohseni-Zadeh M, Blaison G, Martinot M. Macroenzymes : macro-ASAT et macro-CPK. Deux observations et revue de la littérature. *Rev Med Interne.* 2009;30(11):963-969.
101. Cabrera-Abreu J, Jain R, Robinson P, Edees S, Staughton T. A case of aspartate aminotransferase macroenzyme. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(Pt 3):320-322.
102. Orlando R, Carbone A, Lirussi F. Macro-aspartate aminotransferase (macro-AST). A 12-year follow-up study in a young female. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(12):1371-1373.
103. Sass DA, Chadalavada R, Virji MA. Unexplained isolated elevation in serum aspartate aminotransferase: think macro! *Am J Med.* 2007;120(9):5-6.
104. Sudo K, Maekawa M, Watanabe H, Matsumoto K, Mori Y, Sasaki T, et al. A case of immunoglobulin G conjugated with lactate dehydrogenase, producing both loss of enzyme activity and an abnormal isoenzyme pattern. *Clin Chem.* 1986;32(7):1420-1422.
105. Wickus GG, Smith MJ. Rapid loss of lactate dehydrogenase isoenzyme activity in serum by cold-induced formation of immunoglobulin G-lactate dehydrogenase complex. *Clin Chem.* 1984;30(1):11-17.
106. Nakagawa H, Umeki K, Yamanaka K, Kida N, Ohtaki S. Macromolecular alkaline phosphatase and an immunoglobulin G that inhibited alkaline phosphatase in a patient's serum. *Clin Chem.* 1983;29(2):375-378.
107. Lee KN, Csako G, Bernhardt P, Elin RJ. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem.* 1994;40(7):1278-1283.
108. Stein W, Bohner J, Renn W, Maulbetsch R. Macro creatine kinase type 2: results of a prospective study in hospitalized patients. *Clin Chem.* 1985;31(12):1959-1964.
109. Hoshino T, Sakai Y, Yamashita K, Kishi K, Tanjoh K, Hirayama A, et al. Clinical evaluation of a new creatine kinase MB activity reagent abrogating the effect of mitochondrial creatine kinase. *Clin Lab.* 2013;59(3-4):307-316.
110. Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, et al. Increase in serum mitochondrial creatine kinase levels induced by tenofovir administration. *J Infect Chemother.* 2012;18(5):675-682.
111. Recommandation HAS : Rapport - Evaluation de l'amylasémie et de la lipasémie pour le diagnostic initial de la pancréatite aiguë. juin 2009.
112. Lott JA, Ellison EC, Applegate D. The importance of objective data in the diagnosis of pancreatitis. *Clin Chim Acta.* 1989;183(1):33-40.

113. Yanagitani N, Kaira K, Sunaga N, Naito Y, Koike Y, Ishihara S, et al. Serum amylase is a sensitive tumor marker for amylase-producing small cell lung cancer? *Int J Clin Oncol*. 2007;12(3):231-233.
114. Oita T, Yamashiro A, Mizutani F, Tamura A, Sakizono K, Okada A. Simultaneous presence of macroamylase and macrolipase in a patient with celiac disease. [Abstract] *Rinsho Byori*. 2003;51(10):974-977.
115. Bernades P, Corbic M, Jardillier JC, Schlegel N, Dupuy R. Macroamylasémie : Rapport de trios nouveaux cas. *Arch Fr Mal App Dig*. 1975;64(1):47-52.
116. Touboul JP, Hadchouel P, Hirsh-Marie H, Caroli J, Renault H. Macroamylasémie associée à une malabsorption et une cryoglobulinémie. Etude clinique et biologique d'un nouveau cas. *Médecine Chir Dig*. 1974;3(6):419-426.
117. Leroux-Roels GG, Wieme RJ, de Broe ME. Occurrence of enzyme-immunoglobulin complexes in chronic inflammatory bowel disease. *J Lab Clin Med*. 1981;97(3):316-321.
118. Crofton PM, Kilpatrick DC, Leitch AG. Complexes in serum between alkaline phosphatase and immunoglobulin G: immunological and clinical aspects. *Clin Chim Acta*. 1981;111(2-3):257-265.
119. Tozawa T. Electrophoretic analysis of enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance. *J Chromatogr*. 1991;569(1-2):347-365.
120. Galasso PJ, Litin SC, O'Brien JF. The macroenzymes: a clinical review. *Mayo Clin Proc*. 1993;68(4):349-354.
121. Lang PO, Govind S, Aspinall R. L'immunosénescence. *NPG Neurol - Psychiatr - Gériatrie*. 2012;12(70):171-181.
122. Perez-Calle JL, Marin-Jimenez I, Lopez-Serrano P, Gisbert JP, Pena AS, Fernandez-Rodriguez C. Prevalence of Macrocreatin kinase Type 1 in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(2):486-489.
123. Caropreso M, Fortunato G, Lenta S, Palmieri D, Esposito M, Vitale DF, et al. Prevalence and long-term course of macro-aspartate aminotransferase in children. *J Pediatr*. 2009;154(5):744-748.
124. Weijers RN, Oude Elferink RP, Mulder J, Kruijswijk H. Characterization of immunoglobulin A kappa autoantibodies to human lactate dehydrogenase isoenzyme-3. *Clin Immunol Immunopathol*. 1987;42(1):110-122.
125. Bode C, Riederer J, Brauner B, Bode JC. Macrolipasemia: a rare cause of persistently elevated serum lipase. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(4):412-416.
126. Yuu H, Ishizawa S, Takagi Y, Gomi K, Senju O, Ishii T. Macro creatine kinase: a study on CK-linked immunoglobulin. *Clin Chem*. 1980;26(13):1816-1820.
127. Whelan PV, Malkus H. A macro creatine kinase isoenzyme in serum of apparently healthy individuals. *Clin Chem*. 1983;29(7):1411-1414.
128. Wu AH, Bowers GN Jr. Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB and BB from macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals. *Clin Chem*. 1982;28(10):2017-2021.
129. Sax SM, Moore JJ, Giegel JL, Welsh M. Further observations on the incidence and nature of atypical creatine kinase activity. *Clin Chem*. 1979;25(4):535-541.
130. Bohner J, Stein W, Steinhart R, Würzburg U, Eggstein M. Macro creatine kinases: results of isoenzyme electrophoresis and differentiation of the immunoglobulin-bound type by radioassay. *Clin Chem*. 1982;28(4):618-623.

131. Dingjan PG, Postma T, Stroes JA. The diagnostic value of certain alkaline phosphatase isoenzyme patterns in human serum, fractions obtained by polyacrylamide disc electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 1975;60(2):169-183.
132. Hattori Y, Yamamoto K, Urabe C, Furuya M, Eguchi H, Hattori H, et al. Frequency of alkaline phosphatase-immunoglobulin complex among diseased and healthy populations. *Clin Chim Acta*. 1985;147(2):155-158.
133. Lawson GJ. Prevalence of macroamylasaemia using polyethylene glycol precipitation as a screening method. *Ann Clin Biochem*. 2001;38(1):37-45.
134. Forsman RW. Macroamylase: prevalence, distribution of age, sex, amylase activity, and electrophoretic mobility. *Clin Biochem*. 1986;19(4):250-253.
135. Schmid H, Mühlbayer D, Röling J, Sternfeld T, Jülg B, Schlattner U, et al. Macroenzyme creatine kinase (CK) type 2 in HIV-infected patients is significantly associated with TDF and consists of ubiquitous mitochondrial CK. *Antivir Ther*. 2006;11(8):1071-1080.
136. Okano K, Yamamoto K, Ohba Y, Matsumura K, Miyaji T. Source of elevated serum mitochondrial creatine kinase activity in patients with malignancy. *Clin Chim Acta*. 1987;169(2-3):159-163.
137. Nakagawa H, Kida N, Maesa M, Wakuta Y, Ohtaki S. An abnormal isoenzyme of creatine kinase in the serum of a patient with metastatic carcinoma: identity with mitochondrial creatine kinase. *Clin Chem*. 1982;28(4):723-725.
138. Mercer DW, Talamo TS. Multiple markers of malignancy in sera of patients with colorectal carcinoma: preliminary clinical studies. *Clin Chem*. 1985;31(11):1824-1828.
139. Wright SA, Liggett NW. Elevation of creatine kinase as a marker of malignancy. *Ir Med J*. 2003;96(7):217.
140. Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Physical properties of gamma-glutamyltransferase in human serum. *Clin Chim Acta*. 1984;141(2-3):205-218.
141. Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Multiple forms of gamma-glutamyltransferase: a clinical study. *Clin Chem*. 1985;31(4):569-573.
142. Turecký L, Kupcová V, Laktis K, Uhlíková E, Szántová M. Use of gamma glutamyltransferase isoenzymes in the differentiation of chronic liver diseases [Abstract]. *Bratisl Lek Listy*. 1997;98(3):137-140.
143. Take S, Fridhandler L, Berk JE. Macroamylasemia: possible role of polysaccharide in composition of macroamylase. *Clin Chim Acta*. 1970;27(2):369-371.
144. Omar MA, Wilson JP, Cox TS. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Ann Pharmacother*. 2001;35(9):1096-1107.
145. Dorosz P. Guide pratique des médicaments. 25^{ième} édition. Maloine; 2005;p974-77.
146. Authier F-J, Chariot P, Gherardi RK. Skeletal muscle involvement in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Muscle Nerve*. 2005;32(3):247-260.
147. Elhayany A, Mishaal RA, Vinker S. Is there clinical benefit to routine enzyme testing of patients on statins? *Expert Opin Drug Saf*. 2012;11(2):185-190.
148. Piscopo TV, McDonald PS, Miller ARO. Serum creatine phosphokinase monitoring in patients infected with HIV. *Int J STD AIDS*. 2006;17(1):61-62.

149. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Férard G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(6):635-642.
150. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J.* 2010;31(18):2197-2204.
151. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem.* 1999;45(7):1104-1121.
152. Pudek MR, Jacobson BE. Falsely negative laboratory diagnosis for myocardial infarction owing to the concurrent presence of macro creatine kinase and macro lactate dehydrogenase. *Clin Chem.* 1982;28(12):2434-2437.
153. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999;130(6):461-470.
154. Tsai CC, Follis KE, Sabo A, Beck TW, Grant RF, Bischofberger N, et al. Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science.* 1995;270(5239):1197-1199.
155. Perry CM, Simpson D. Tenofovir disoproxil fumarate: in chronic hepatitis B. *Drugs.* 2009;69(16):2245-2256.
156. Turret J, Deray G, Bagnis C. Néphrotoxicité du ténofovir. *EMC Néphrologie.* 2013;10(3):1-9.
157. Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther.* 2002;24(10):1515-1548.
158. Nelson MR, Katlama C, Montaner JS, Cooper DA, Gazzard B, Clotet B, et al. The safety of tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HIV infection in adults: the first 4 years. *AIDS Lond Engl.* 2007;21(10):1273-1281.
159. Zaidan M, Lescure F-X, Brochériou I, Dettwiler S, Guiard-Schmid J-B, Pacanowski J, et al. Tubulointerstitial Nephropathies in HIV-Infected Patients over the Past 15 Years: A Clinico-Pathological Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(6):930-938.
160. Woratanarat K, Kanjanabuch T, Suankratay C. Tenofovir disoproxil fumarate-associated nephrotoxicity in HIV-infected patients: a prospective controlled study. *J Med Assoc Thail.* 2013;96(4):432-439.
161. Becker S, Ruane P, Cimoch P, et al. Safety profile of tenofovir disoproxil fumarate in patients with advanced HIV disease. Program and abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 16-19 December 2001; Chicago.
162. Badre-Sentenac S. Intérêt du suivi thérapeutique des antirétroviraux chez le patient insuffisant rénal: Exemple du ténofovir. *Rev Fr Lab.* 2008;365:73-81.
163. Tsoukas CM, Bernard NF. Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(1):14-28.
164. Schmid H, Tokarska-Schlattner M, Fießl B, Röder M, Kay L, Attia S, et al. Macro CK2 accumulation in tenofovir-treated HIV patients is facilitated by CK oligomer stabilization but is not predictive for pathology. *Antivir Ther.* 2013;18(2):193-204.

165. Jacob N, Aimone-Gastin I, Arzouni J, Augereau C. Développement professionnel continu et biologie médicale. *Spectra biologie*. 2013;(200):28-31.
166. Arrêté du 26 février 2013 fixant la liste des orientations nationales du développement professionnel continu des professionnels de santé pour l'année 2013 (JORF n°0052 du 2 mars 2013).
167. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale (JORF n°0012 du 15 janvier 2010).
168. Norme NF EN ISO 15189 – Laboratoires de biologie médicale. Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. 2012.
169. Rapport d'évaluation technologiques : Les marqueurs cardiaques dans la maladie coronarienne et l'insuffisance cardiaque en médecine ambulatoire. HAS juillet 2010.
170. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 2007;53(4):552-574.
171. Rapport de la Cour des Comptes : La Biologie Médicale. 18 juillet 2013.
172. Wiltshire EJ, Crooke M, Grimwood K. Macro-AST: a benign cause of persistently elevated aspartate aminotransferase. *J Paediatr Child Health*. 2004;40(11):642-643.
173. Schneider N, Aakre KM, Thue G, Sandberg S, Durlach V, Gillery P. Evaluation de la prescription et de l'interprétation des dosages de microalbuminurie en médecine générale. *Ann Biol Clin*. 2009;67(1):47-53.
174. Skeie S, Perich C, Ricos C, Araczkki A, Horvath AR, Oosterhuis WP, et al. Postanalytical external quality assessment of blood glucose and hemoglobin A1c: an international survey. *Clin Chem*. 2005;51(7):1145-1153.
175. Chasuk RM, Brantley PJ, Martin PD. Knowledge and attitudes of family physicians about clinical practice guidelines and the care of patients with type 2 diabetes mellitus. *J La State Med Soc*. 2001;153(1):31-44.
176. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PFH, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):718-724.
177. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PFH, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):725-733.
178. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005;172(3):367-379.
179. Aragon G, Younossi ZM. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Cleve Clin J Med*. 2010;77(3):195-204.
180. Green RM, Flamm S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1367-1384.
181. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem*. 2000;46(12):2027-2049.

182. Friedman LS, Dienstag JL, Watkins E, Hinkle CA, Spiers JA, Rieder SV, et al. Evaluation of blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med.* 1987;107(2):137-144.
183. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(5):960-967.
184. Fletcher LM, Kwong-Gain I, Powell EE, Powell LW, Halliday JW. Markers of chronic alcohol ingestion in patients with nonalcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *Hepatology Baltim Md.* 1991;13(3):455-459.
185. Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Torchio P. Meta-analysis of alcohol intake in relation to risk of liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol Oxf.* 1998;33(4):381-392.
186. Recommandations en santé publique : Stratégies de dépistage biologique des hépatites virales B et C (Synthèse). HAS. mars 2011.
187. Omar S, Feki M, Kaabachi N. Le métabolisme du fer : revue générale et récents développements. *Ann Biol Clin.* 2006;64(6):523-534.
188. Duclos-Vallée J, Ichai P, Chapuis P, Misrahi M, Woimant F. La maladie de Wilson. *Orphanet.* Mars 2006. [<https://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-Wilson.pdf>].
189. Thevenot T, Mathurin P, Di Martino V, Nguyen-Khac E, Canva-Delcambre V, Campin G, et al. Maladie cœliaque et atteinte hépatique. *Gastroentérologie Clin Biol.* 2003;27(1):28-42.
190. Bardella MT, Vecchi M, Conte D, Del Ninno E, Fraquelli M, Pacchetti S, et al. Chronic unexplained hypertransaminasemia may be caused by occult celiac disease. *Hepatology Baltim Md.* 1999;29(3):654-657.
191. Bon usage des technologies de santé : Quelles recherches d'anticorps prescrire dans la maladie coeliaque? HAS. Juin 2008.
192. Balkau B, Charles M-A, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002;28(5):364-376.
193. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:16.
194. Chazoullières O. Hépatites auto-immunes : actualités. FMC-HGE. Post-U Paris; 2004. 17-25. [<http://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf/63.pdf>].
195. Gleeson D, Heneghan MA, British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut.* 2011;60(12):1611-1629.
196. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatology.* 1999;31(5):929-938.
197. Agin A, Gasser F, Fischbach E, Schlienger JL, Sapin R. Estimation de la prolactine monomérique après précipitation du sérum au polyéthylène glycol (PEG). *Immuno-Immunoanal Biol Spec.* 2004;19(5):301-305.
198. Levitt MD, Ellis C. A rapid and simple assay to determine if macroamylase is the cause of hyperamylasemia. *Gastroenterology.* 1982;83(2):378-382.
199. Fahie-Wilson MN, Burrows S, Lawson GJ, Gordon T, Wong W, Dasgupta B. Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. *Ann Clin Biochem.* 2007;44(Pt 4):377-383.

ANNEXES

Letter to the Editor

Anthony Léon, Françoise Barbé, Christian Rabaud and Isabelle Aimone-Gastin*

An unusual interference in CK MB assay caused by a macro enzyme creatine phosphokinase (CK) type 2 in HIV-infected patients

Keywords: electrophoresis; HIV; interference; macro creatine phosphokinase; tenofovir.

*Corresponding author: Isabelle Aimone-Gastin, MD, PhD, Laboratory of Biochemistry, University Hospital of Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, Phone: +33 3 83 15 35 13, Fax: +33 3 83 15 37 85, E-mail: i.gastin@chu-nancy.fr; gastinisabelle@yahoo.fr
Anthony Léon and Françoise Barbé: Laboratory of Biochemistry, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Christian Rabaud: Department of Infectious Diseases, University Hospital of Nancy-Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Creatine phosphokinase (CK) assays are routinely performed in HIV-infected patients, irrespective of their symptoms [1]. Elevation of CK is used to detect muscle disease that can be caused by HIV itself or can occur secondary to antiretroviral treatment [1, 2]. At the request of the clinicians, CK-MB activity is systematically measured after immunoinhibition of the CK-M subunits every time CK is >145 U/L (Olympus Diagnostic Systems Beckman-Coulter® France, Villepinte, France). Most of the time, patients with CK-MB >24 U/L are explored by a troponin I assay to exclude a myocardial infarction (Access AccuTnI, Beckman-Coulter® France, Villepinte, France). We were surprised to observe frequently high serum CK and CK-MB concentrations in outpatients referred to the Department of Infectious Diseases. Sixteen HIV-infected patients (7 F/9 M; median age 46 years; range 24–87 years) were included in a 4-month period and considered as 'macro CK suspect' on the basis of the association of elevated total CK activity (median 181 U/L; range 147–716 U/L) and unexpected high CK-MB activity (median 39 U/L; range 24–80 U/L) with a ratio of CK-MB to total CK ranging between 5 and 54%. Electrophoresis of CK isoenzymes was carried out to allow the detection of a possible macro-CK. Electrophoresis patterns revealed a typical band that was consistent with a significant macro CK type 2 in all the patients (Figure 1).

For three of them (18.7%), both macro CK 2 and CK-MB were observed, as previously reported [3]. The macro CK 2 fraction represented 1.2%–21.4% of the total CK activity. In our study, the median of total CK activity was moderately increased (181 U/L). This result was consistent with previous reports indicating that macro CK 2 induced lower total CK activity elevation than macro CK 1 [3].

The diagnosis of HIV infection was carried on average 13 years previously (from 4.7 to 21 years). Most of the patients (87.5%) had an efficient treatment assessed by a viral load <40 copies/mL. Seven patients (43.7%) were investigated for cardiovascular diseases but none of them had coronaropathy. Two patients (12.5%) had a moderate decreased GFR and two others (12.5%) showed proteinuria. Conversely, despite four patients co-infected with hepatitis virus (two HCV co-infected patients and two HBV co-infected patients), AST/ALT ratio median was found at 1.13 (range 0.63–1.63) in all patients and none of them had liver cirrhosis. These laboratory investigations allowed us to exclude accumulation of macro CK 2 as a consequence of reduced renal clearance capacity or of liver cytolysis [1]. Even if four patients (25%) were known to have had neoplasia (breast, prostate with metastasis, Kaposi sarcoma, and skin), macro CK 2 appears to be released during serious cellular damage rather than during cell proliferations [1]. Surprisingly, all of the 16 patients received tenofovir associated with other molecules emtricitabine (n=13), ritonavir (n=6), atazanavir (n=6), efavirenz (n=5), nevirapine (n=1), abacavir (n=1), saquinavir (n=1), lopinavir (n=1) and didanoside (n=1). Tenofovir treatment was started between 2 and 48 months (median 14 months).

In addition, we performed a retrospective clinical and therapeutic analysis in 557 HIV-infected patients under antiretroviral treatment (305 with tenofovir, 252 without tenofovir), included in the same 4-month period. All of these patients were included in the NADIS® cohort, a dynamic French cohort of HIV-infected patients, after receiving oral information and giving written consent. The

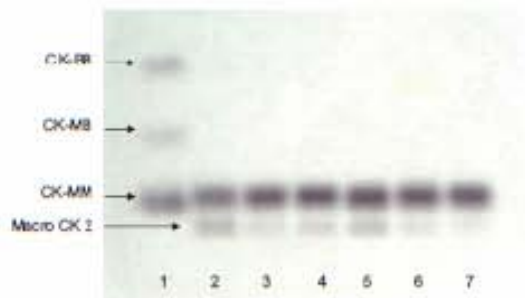


Figure 1 Electrophoresis of CK isoenzymes was carried out for 16 patients according to the manufacturer's protocol (Hydragel 7 iso-CK, Sebia®, Evry, France). Lane 1, internal quality control electrophoresis pattern shows three bands corresponding to creatinine phosphokinase MM, MB, and BB, respectively. Lanes 2–7, patients electrophoresis patterns. All patients present a typical band, migrating to the cathodic side and corresponding to a macro CK 2.

collected data of the networking organization have been submitted to the French National Commission on Informatics and Rights (CNIL) [4].

CK and CK MB assays were done for all these 557 patients. Twenty-four percent of the patients receiving tenofovir (74/305) presented a significant rise of the CK MB, while an increase of the CK MB was only observed at 1.6% of the patients not receiving tenofovir. The χ^2 -test for homogeneity was applied to compare patients with regard to the treatment used. The observed difference was considered as very significant ($p < 0.001$). Even if we cannot estimate the prevalence of macro CK 2 in patients receiving tenofovir, our findings underlined the high frequency of elevation of plasma CK and CK MB in this population.

Macro CK is the most common macro enzyme that frequently causes difficulty in the interpretation of diagnostic enzyme results [3]. Both macro CK types are widely known to be involved in falsely elevated serum CK and CK MB concentrations and to cause high CK MB/CK ratios. Macro CK 1 is an Ig-bound macroenzyme of cytoplasmic origin [3]. It has a prevalence rate of 0.4%–1.2% and is associated with autoimmune disease [6]. Macro CK 2 is bound to the exterior surface of the inner mitochondrial membrane. Macro CK 2, also called mitochondrial CK (MtCK), is detected in 3.7% of hospitalized patients and is not age-related but correlates with severe diseases [3, 5]. Because of its high molecular weight, macro CK 2 is not readily cleared and has a long half-life in the circulation [5]. Detection of elevated mitochondrial CK in plasma means disruption of the mitochondria and represents a marker of cell death [1, 7].

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is the first nucleotide reverse transcriptase inhibitor (NRTI) approved for use in combination with other antiretroviral agents in the treatment of HIV-1 infection. TDF is excreted by the kidney, via a glomerular filtration followed by an active tubular secretion. Initially, the most commonly reported laboratory abnormality was an increase of total CK (11.7%) without information on the isoenzymes concerned [8]. Shere-Wolfe and Verley (2002) described the case of a 47-year-old HIV-infected man receiving tenofovir who developed elevations of CK [9]. Schmid et al. [2006] reported a 7.8% prevalence of macro CK 2 composed of ubiquitous mitochondrial CK (MtCK) in a group of 408 HIV outpatients [1]. TDF treatment was the prominent common feature in these patients. More recently, Watanabe et al. showed a significantly higher MtCK activity in patients receiving TDF than in those receiving antiretroviral therapy without TDF or in naive patients [7]. Kidney is known to be a major source for ubiquitous MtCK, and TDF administration has been shown to induce mitochondrial damage in the renal proximal tubular cells [1, 10]. TDF should damage the mitochondria and MtCK leaks into the circulation from ruptured cells [7].

In conclusion, we reported elevated total CK and CK MB activities as well as an accumulation of macro CK 2 in 16 HIV-infected patients receiving tenofovir. The retrospective analysis of clinical findings in HIV patients allowed us to conclude that 95% of patients (74/78) with both an elevation of plasma CK and CK MB were treated by TDF. Macro CK 2 seemed a possible explanation for elevated serum CK in patients receiving TDF. Biologists and clinicians should be alerted by such an analytical interference when CK are elevated in absence of muscle disease in patients receiving TDF. Macro CK 2 can be rapidly detected by an isoenzymes electrophoresis, which is an easy to use technique.

Acknowledgments: The authors would like to thank Pr. B. Namour, Dr. R.-M. Gueant-Rodriguez and Dr. A. Oussalah for their critical review of this manuscript and S. Thirion for her excellent technical assistance (Laboratory of Biochemistry, Hospital of Nancy-Brabois, France).

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Ethical approval: The patients are all included in the NADIS[®] cohort, a dynamic French cohort of HIV-infected patients, after receiving verbal information and giving written consent. The collected data and details of the networking organization have been submitted to the French National Commission on Informatics and Rights (CNIL). All patients provide written informed consent prior to the inclusion of their data in the EME. All merged data for analysis are therefore anonymous.

Guarantor of the article: Isabelle Aimoné-Gastin, MD, PhD.

Authors' contributions: IAG conceived the study. IAG and AL researched literature and analyzed the data. AL and FB were involved in the protocol development and CR was involved in the patients' recruitment. AL wrote the first draft of the manuscript. All authors reviewed, edited and approved the final version of the manuscript.

Received June 22, 2012; accepted July 14, 2012; previously published online August 29, 2012

References

- Schmid H, Mühlbauer D, Röling J, Stemfeld T, Jülg B, Schlattner U, et al. Macroenzyme creatine kinase (CK) type 2 in HIV-infected patients is significantly associated with TDF and consists of ubiquitous mitochondrial CK. *Antivir Ther* 2006;11:1071–80.
- Gherardi RK. Skeletal muscle involvement in HIV-infected patients. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20:232–7.
- Lee KN, Csako G, Bernhardt P, Elin RJ. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem* 1994;40:1278–83.
- Pugliese P, Cuzin L, Cabié A, Poizat-Martin L, Alkavena C, Duvivier C, et al. A large French prospective cohort of HIV-infected patients: the Nadis Cohort. *HIV Med* 2009;10:504–11.
- Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem* 1989; 35:2261–70.
- Laureys M, Sion JP, Slabbynck H, Steenssens L, Cobbaert C, Derde MP, et al. Macromolecular creatin kinase type 1: a serum marker associated with disease. *Clin Chem* 1991;37:430–4.
- Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, et al. Increase in serum mitochondrial creatine kinase levels induced by tenofovir administration. *J Infect Chemother* 2012. DOI: 10.1007/s10156-012-0593-8 (PubMed)
- Fung HB, Stone EA, Placert J. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* 2002; 24:1515–48.
- Shee-Wolfe KD, Verkey JR. Marked elevation of the creatine phosphokinase level in a patient receiving tenofovir. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1137.
- Köhler JJ, Hosseini SH, Hoyrig-Brandt A, Green E, Johnson DM, Russ R, et al. Tenofovir renal toxicity targets mitochondria of renal proximal tubules. *Lab Invest* 2009; 89:513–9.

Annexe 2 : courriel explicatif envoyé avec le questionnaire

Chers Collègues,

En cliquant sur le lien affiché ci-dessous, vous participerez à une enquête de pratique professionnelle proposée par la SFBC et sa Commission Développement Professionnel Continu. Cette démarche, centrée autour d'un cas clinico-biologique, est entreprise par Anthony LEON, Interne DES en Biologie Médicale au CHU de Nancy. L'objectif est de faire le point sur la prise en charge et l'interprétation de certains dosages enzymatiques de pratique quotidienne au laboratoire de Biologie Médicale.

Nous vous remercions vivement de l'attention que vous accorderez à ce document. Pour répondre aux questions posées, il vous suffira de cocher les cases ou de répondre aux endroits réservés à cet effet. Les résultats de cette enquête seront traités après anonymisation. Un document de synthèse comprenant une restitution commentée des réponses attendues ainsi que des références bibliographiques vous sera adressé à la fin de cette enquête.

<https://docs.google.com/forms/d/1OZZXn4WBrO3OZc0Pn4LdBi4IZi5MVppoYaCTY0N9ODg/vjewform>

Nous restons à votre entière disposition pour toute information complémentaire,
Bien cordialement,

Isabelle AIMONE-GASTIN
Commission DPC SFBC
Médecin Biologiste – MCU-PH
Laboratoire de Biochimie et BM
CHU de Nancy-Brabois
03 83 15 35 13
i.gastin@chu-nancy.fr

Anthony LEON
Interne DES de BM
CHU de Nancy
anthonyleon88@gmail.com

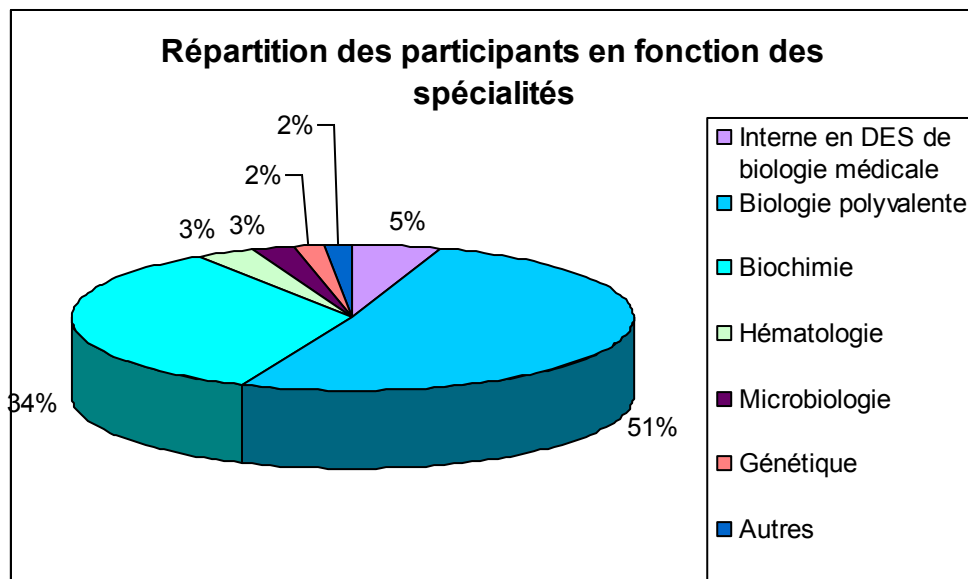
Annexe 3 : Compte rendu de l'enquête de pratique professionnelle SFBC

Profil des biologistes participants

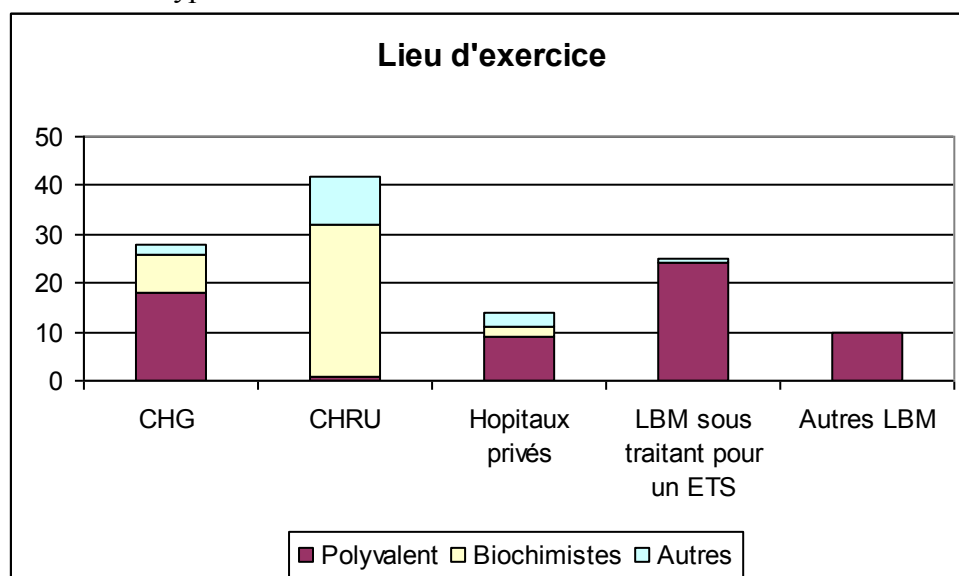
119 participants (52 femmes et 67 hommes) ont répondu à cette enquête.

| < 30 ans | 30 à < 40ans | 40 à < 50 ans | 50 à < 60ans | > 60 ans | Non communiqué |
|----------|--------------|---------------|--------------|----------|----------------|
| 6 | 14 | 26 | 50 | 22 | 1 |

Tableau de répartition des participants en fonction des classes d'âge.



Les biologistes polyvalents et les biochimistes représentent respectivement 51% et 34% des participants. Ceci s'explique sûrement en partie par le fait que ce sont ces deux spécialités qui sont confrontées à ce type de bilan.



Une majeure partie des participants sont des biologistes hospitaliers. Le nombre de participants ne prenant pas en charge de patients est très faible.

Cas clinico-biologique

Monsieur L., 54 ans, consulte son médecin généraliste.

L'examen clinique de Monsieur L. est sans particularité : il pèse 72 kgs pour une taille de 176 cm (IMC = 23,5 kg/m²) et sa TA est égale à 13/7.

Monsieur L. ne prend ni médicaments, ni phytothérapies et n'est pas exposé à des toxiques particuliers lors de son activité professionnelle. Il ne consomme pas de drogues et estime que sa consommation d'alcool n'est pas excessive.

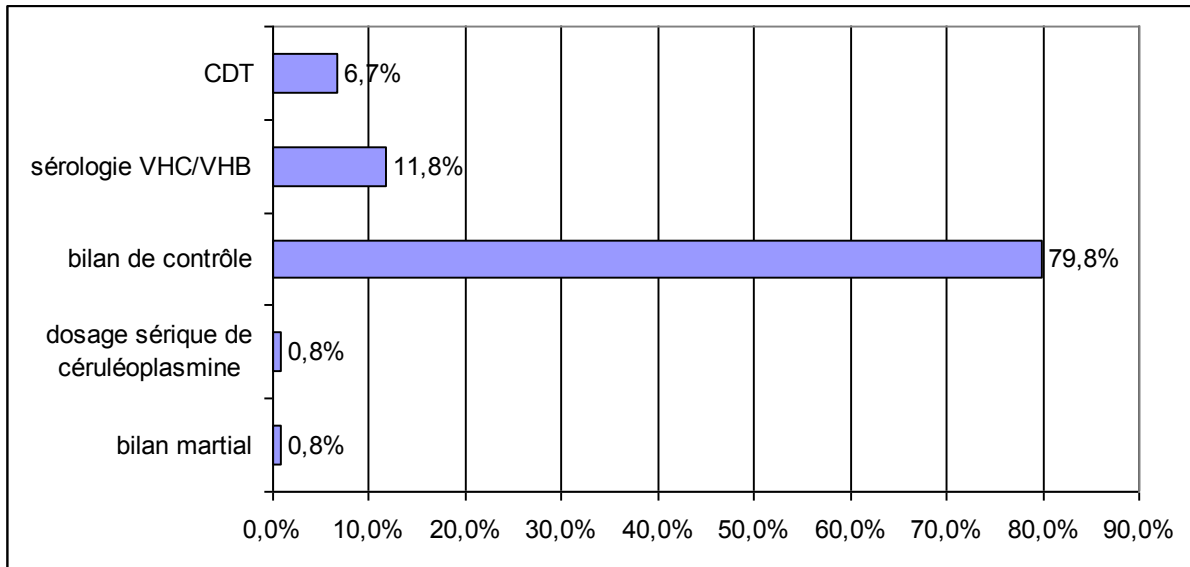
NFS : sans particularité

Biochimie (Les valeurs de référence du laboratoire sont indiquées entre parenthèses)

| | |
|------------------------------|--------------------|
| Glycémie à jeun 5.3 mmol/L | (3.9-5.5 mmol/L) |
| Triglycérides 1.2 mmol/L | (0.4-1.7 mmol/L) |
| Cholestérol total 4.9 mmol/L | (4.10-5.20 mmol/L) |
| LDL cholestérol 3.7 mmol/L | (< 4.10 mmol/L) |
| HDL cholesterol 0.7 mmol/L | (>1.0 mmol/L) |
| Protéines totales 72 g/L | (65-80 g/L) |
| ASAT 259 U/L | (< 35 UI/L) |
| ALAT 24 U/L | (< 45 UI/L) |
| GGT 72 U/L | (< 55 UI/L) |
| CRP < 5mg/L | (<5mg/L) |

Question 1 : Le médecin généraliste, surpris par les résultats de ce bilan, vous contacte pour savoir comment compléter ces dosages. Dans un premier temps, vous lui proposez de (1 seule réponse possible) :

- De prescrire un dosage sérique de transferrine désialylée (CDT)
- De prescrire une sérologie VHC/VHB
- De prescrire un bilan de contrôle portant sur ASAT et ALAT dans deux mois
- De prescrire un dosage sérique de la céruléoplasmine
- De prescrire un bilan martial

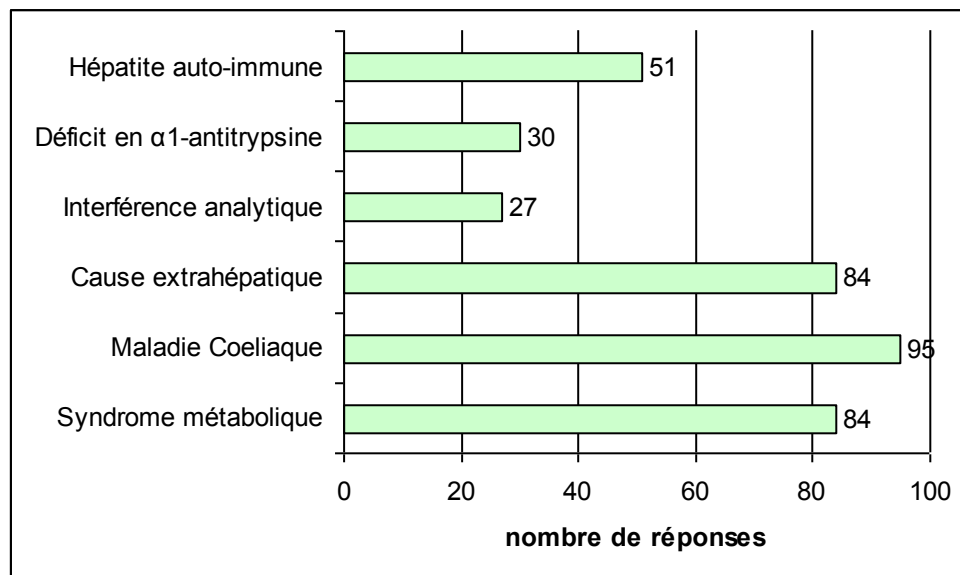


La réponse attendue était la « prescription du bilan de contrôle portant sur ASAT et ALAT dans deux mois », réponse majoritairement donnée par les participants (80% des réponses). Il faut souligner que 12% et 7% des participants ont respectivement choisi d’explorer les deux principales étiologies à évoquer en première intention face à une hypertransaminémie confirmée : infections par les virus hépatotropes (VHB et VHC) et alcoolisme chronique.

Un second bilan plus complet est réalisé 2 mois après le bilan initial. Les ASAT sont toujours augmentées (256 U/L) alors que les ALAT sont comprises dans les valeurs de référence. Les GGT sont légèrement augmentées (57 U/L). Les résultats des autres examens de laboratoire sont sans particularité (PAL, Bilirubine totale, CK, haptoglobine, bilan martial). Les sérologies VHC et VHB sont négatives. La recherche des IgA anti transglutaminases est négative et ce patient ne présente pas de déficit en IgA.

Question 2 : Quelles sont les 3 étiologies qui peuvent être écartées à la lecture des résultats du 2^{ème} bilan biologique de Monsieur L. ?

- Une hépatite auto-immune
- Un déficit en α 1-antitrypsine
- Une interférence analytique
- Une cause extra-hépatique
- Une maladie cœliaque
- Un syndrome métabolique

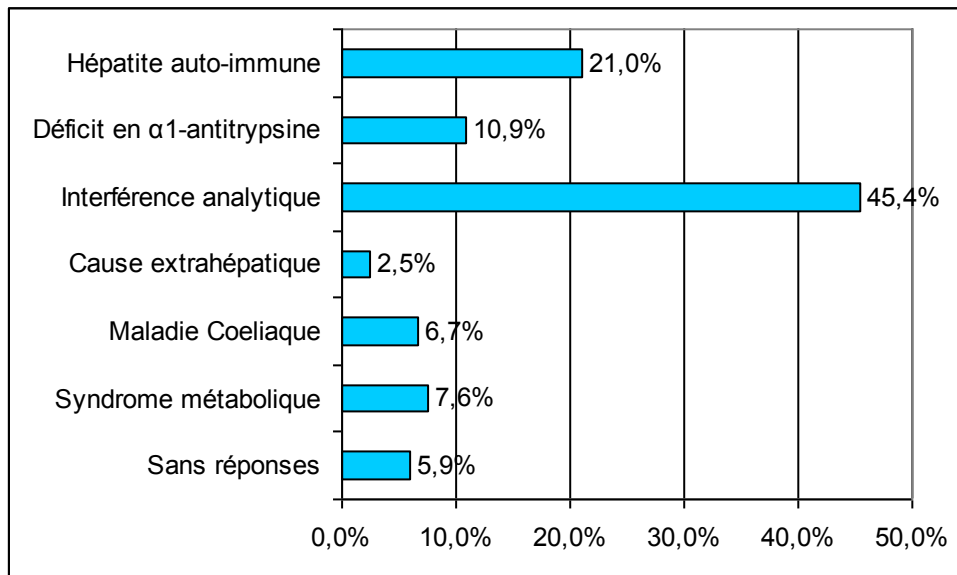


Les participants ont majoritairement donné les 3 réponses attendues :

- **Cause extra hépatique**
- **Maladie cœliaque**
- **Syndrome métabolique**

Question 3 : Pour éviter la prescription de bilans spécialisés coûteux, vous proposez au médecin d'éliminer en priorité l'une de ces étiologies. Laquelle ?

- Une hépatite auto-immune
- Un déficit en α 1-antitrypsine
- Une interférence analytique
- Une cause extra-hépatique
- Une maladie cœliaque
- Un syndrome métabolique



La majorité des réponses données par les participants concerne les interférences analytiques (45%), réponse attendue.

Les réponses suivantes évoquent deux étiologies qui n'ont pas été éliminées par les bilans précédents : hépatite auto-immune (21%) et déficit en α 1-antitrypsine (11%). Ces deux autres réponses étaient également envisageables, les examens réalisés ne permettant pas de les éliminer.

Question 4 : Indiquez l'hypothèse qui vous parait la plus vraisemblable ?

- Dosage réalisé sur un tube non conforme
- Interférence due à un traitement intercurrent
- Défaut de prélèvement de l'automate lors du dosage des transaminases
- Présence d'une macro ASAT interférant avec le dosage
- Interférence liée à une hémolyse du prélèvement

Nombre de réponses des participants :

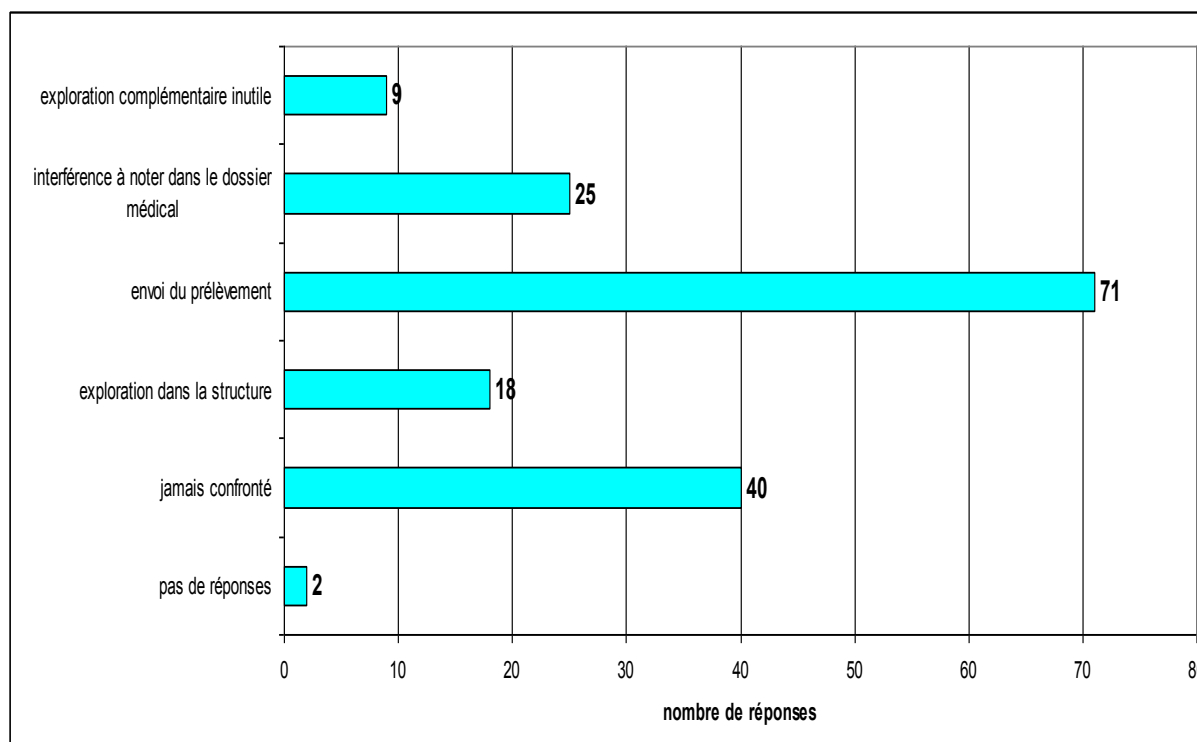
| Tube non conforme | Traitement interférent | Défaut de prélèvement | Macro ASAT | hémolyse | Pas de réponse |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 6 | 1 | 99 | 8 | 4 |

La majorité des participants (83%) envisagent une interférence provoquée par la présence d'une macro ASAT. Les macroenzymes sont une cause classique d'interférences et leur présence entraîne une augmentation chronique de l'activité d'une enzyme. Dans notre cas, c'est effectivement l'hypothèse la plus probable. En effet, cette interférence est répétable et le patient ne semble pas présenter de caractéristiques cliniques ou thérapeutiques particulières qui pourraient orienter le biologiste vers une autre cause d'interférence.

Question 5 : Dans cette situation particulière, quelle(s) décision(s) prenez-vous (plusieurs réponses possibles) ?

- Vous n'avez jamais été confronté à ce type d'interférence.
- Vous jugez toute exploration complémentaire inutile.
- Vous concluez à une interférence analytique et vous prévenez le prescripteur pour qu'il le note dans le dossier médical du patient afin d'éviter toute exploration ultérieure inutile.
- Vous envoyez le prélèvement pour exploration complémentaire dans un centre spécialisé
- Vous prenez en charge cette exploration complémentaire dans votre LBM

Cette question nous permet d'évaluer les pratiques professionnelles face à une suspicion d'interférence par une macroenzyme. Les participants pouvaient répondre par plusieurs items. **Le graphique ci-dessous représente les réponses données par les biologistes.**



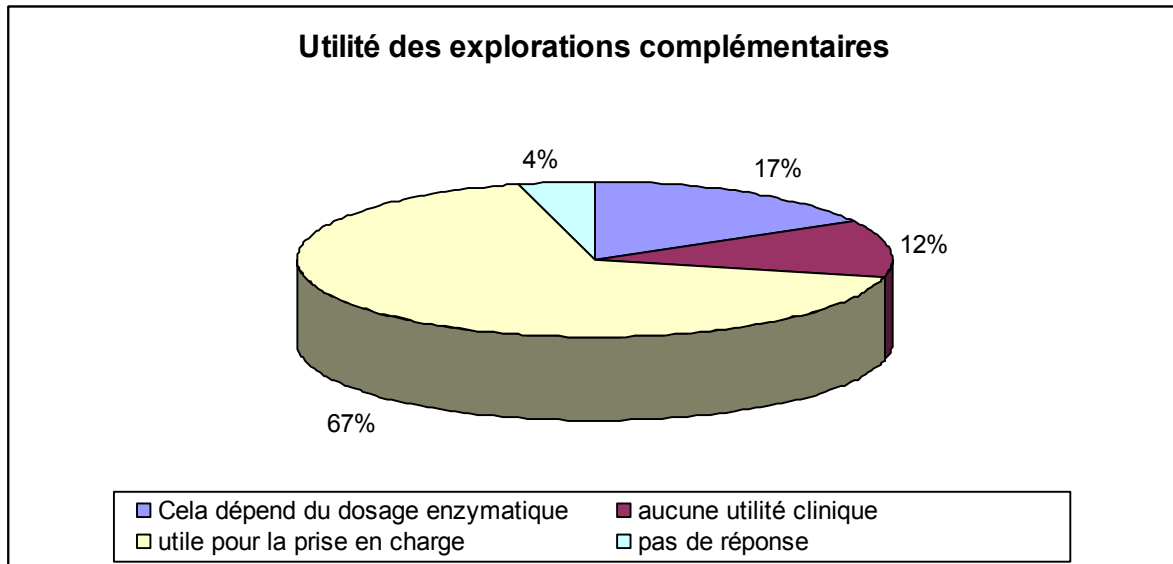
Une part non négligeable des participants (34%) n'a jamais été confrontée à ce type de problématique. Parmi eux, un certain nombre de participants (n=15 soit 12%) n'ont pas précisé leur attitude face à cette problématique. Nous les avons donc exclus du calcul des pourcentages suivants ainsi que les participants qui n'ont pas répondu à cette question.

Au total, 90 biologistes (88%) décident d'explorer cette interférence analytique. Lorsque les laboratoires disposent des moyens techniques adaptés, ces analyses complémentaires sont réalisées in situ (16%). Dans le cas contraire, elles font l'objet d'envoi vers des laboratoires extérieurs (69%). Vingt cinq pourcents des participants envisagent de signaler l'interférence aux cliniciens, parfois avant même la réalisation des explorations complémentaires (envoi ou expertise au sein du LBM). Dans 3% des cas, le clinicien n'est pas prévenu et aucune exploration complémentaire n'est effectuée.

Il est décrit dans la littérature des cas où les macroenzymes peuvent perdurer pendant des années et conduire à des explorations inutiles parfois invasives. Il semble donc nécessaire de signaler ce type d'interférence dans le dossier biologique.

Question 6 : Vous parait-il utile de déterminer avec précision ce type d'interférence

- Oui, l'identification de l'interférence en cause peut orienter la prise en charge du patient
- Non, l'identification de l'interférence en cause n'a aucun impact sur la prise en charge du patient
- Cela dépend du dosage enzymatique concerné



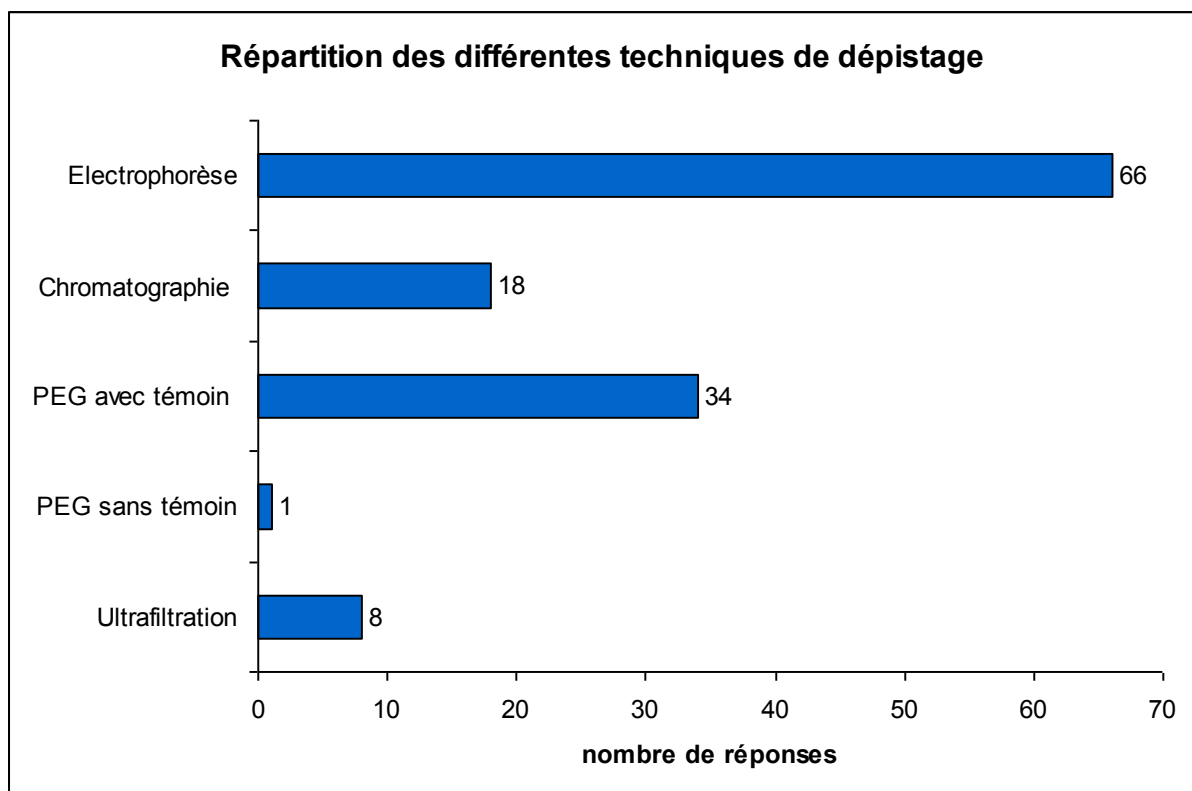
Si 67% des participants jugent la prescription d'explorations complémentaires utile dans la prise en charge des patients, 12% estiment cela sans intérêt. En revanche 17% des participants nuancent leur réponse en concluant que tout dépend du dosage enzymatique considéré.

Dans l'hypothèse où cette interférence est due à la présence d'une macroenzyme, la caractérisation de cette dernière peut avoir une importance non négligeable dans la prise en charge du patient.

Question 7 : Quelle(s) est (sont) la(es) technique(s) utilisée(s) en 1^{ère} intention pour dépister ce type d'interférence en fonction des enzymes concernées

- L'électrophorèse des isoenzymes
- La chromatographie par gel filtration
- La précipitation par le PEG sans comparaison avec un témoin
- La précipitation par le PEG avec comparaison avec un témoin
- L'ultrafiltration

18,5% participants utilisent en première intention au moins deux techniques, 73,1% une seule technique et 8,4% n'ont pas répondu à la question. Ce taux de non réponse peut s'expliquer par l'aspect très technique de cette question.



La technique la plus plébiscitée est l'électrophorèse des isoenzymes qui représente un peu plus de 50% des réponses. La chromatographie par gel filtration représente 14% des réponses.

Les deux techniques de dépistage faciles à mettre en place sont assez bien représentées:

- la précipitation par le PEG (27%)
- l'ultrafiltration (6%).

Ces techniques peuvent toutes être utilisées dans le dépistage des macroenzymes.

Pour en savoir plus : commentaires détaillés et références bibliographiques

Question 1

Monsieur L. présente une élévation modérée (3 à 10x N) et isolée des ASAT. Le dosage des transaminases sériques est fréquemment prescrit en médecine générale. Dans le cas de Mr. L., le médecin généraliste a prescrit un bilan de routine incluant les transaminases, en raison d'un doute concernant l'appréciation de sa consommation d'alcool.

La conduite à tenir face à une élévation isolée et/ou modérée de ces enzymes n'est pas clairement définie.

Si certains auteurs remettent en cause le dogme du contrôle systématique du dosage des transaminases avant toute exploration complémentaire (Giannini et al., 2005 ; Aragon et al., 2010), la plupart des experts sont favorables à la prescription d'un deuxième dosage de **contrôle**. Les recommandations portent principalement sur les élévations de l'activité ALAT, plus spécifique de l'organe hépatique que l'activité ASAT. L'association américaine de gastro-entérologie (AGA) propose un contrôle systématique des dosages enzymatiques face à tout résultat discordant et toute augmentation modérée des activités transaminases (Green et Flamm 2002).

Dans le cas de Mr. L., l'existence d'une dissociation entre une activité ASAT augmentée et une activité ALAT comprise dans les valeurs de référence doit inciter le biologiste à demander un contrôle de ces valeurs avant toute exploration complémentaire, ceci afin d'éliminer une éventuelle interférence ou une cytolyse transitoire (Dufour et al. Clin Chem, 2000). S'il n'y a pas de consensus pour le délai, il est usuel de prescrire ce bilan de contrôle 1 à 6 mois après le 1^{er} bilan. Dans ce cas clinique, le choix de 2 mois a été fait de manière arbitraire et peut donc être discuté.

En ce qui concerne les autres réponses, ces différents examens complémentaires peuvent être demandés en seconde intention. D'après une étude réalisée aux USA en 2003, les 4 principales causes représentant 31% des hypertransaminémies sont l'alcool (consommation supérieur à 2 verres par jour pour un homme et supérieur à un verre par jour (soit 10g d'alcool pur) pour une femme), les infections virales par les virus de l'hépatite B et C et la surcharge en fer (Clark JM et al, Am J Gastroenterol. 2003). Ces auteurs rapportent l'existence d'une augmentation isolée des ALAT chez 32 % des patients, d'une augmentation isolée des ASAT chez 25,6% et des deux enzymes dans 42,4% des cas.

1. **La consommation chronique d'alcool**, peu probable dans ce cas, peut néanmoins être évoquée en raison d'une légère augmentation des GGT. Le meilleur marqueur biologique actuel d'une consommation excessive d'alcool est le dosage de la transferrine désialylée (ou transferrine carbodéficiente ou CDT). Cette dernière augmente lors d'une prise d'alcool d'au moins 50g par jour et est le reflet de la consommation alcoolique des 4 dernières semaines. La sensibilité de la CDT est supérieure à celle des autres marqueurs (Fletcher et al., Hepatology 1991). Le dosage de CDT, en plus d'un interrogatoire approfondi, serait nécessaire pour évaluer la consommation d'alcool, ce d'autant plus que qu'une prise modérée d'alcool peut être à l'origine d'une cytolyse modérée. (Corrao et al., Alcohol Alcohol 1998)
2. **Les seconde et quatrième étiologies sont les infections virales respectivement dues aux virus de l'hépatite C et de l'hépatite B.** La HAS a émis des recommandations en mars 2011 portant sur le dépistage de ces deux infections. Elle préconise la détection des Ac anti-VHC (ou la recherche

directe de l'ARN viral chez les immunodéprimés sévères) pour déterminer le statut sérologique concernant le virus de l'hépatite C. Il est conseillé de réaliser un dépistage combinant la recherche de l'Ag HBs à celle des Ac anti-HBs et anti-HBc pour déterminer le statut sérologique concernant le virus de l'hépatite B.

3. La 3^{ème} étiologie en cause est la **surcharge en fer**, ce qui nécessite la réalisation d'un bilan martial. Le coefficient de saturation à la transferrine permet de dépister une surcharge en fer lorsque ce dernier est généralement supérieur à 45%. Cette augmentation du coefficient de saturation de la transferrine est généralement associée à une hyperferritinémie. Ce tableau doit faire évoquer deux grandes catégories de surcharge martiale hémochromatosique et non hémochromatosique. (Omar et al., *Ann Biol Clin* 2006)

Le dosage de **céruléoplasmine** est principalement utilisé face à une suspicion de maladie de Wilson. La prévalence de cette pathologie est de 1/25 000 en France et Monsieur L. ne présente aucun signe clinique évocateur. En général, le premier symptôme est une hépatite qui peut être fulminante. Par ailleurs, il est d'usage d'associer le dosage de la céruléoplasmine à celui du cuivre sérique et urinaire pour disposer d'une vision d'ensemble du métabolisme du cuivre.

Bibliographie

- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem*. 2000,46(12):2027-49.
- Cadranet J.-F. Élévation chronique des transaminases : hypertransaminasémie chronique. *EMC - AKOS (Traité de Médecine)*. 2011. 1-8.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005. 172(3):367-79.
- Aragon G, Younossi ZM. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Cleve Clin J Med*. 2010. 77(3):195-204.
- Green RM, Flamm S. AGA Technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *gastroenterology*. 2002. 123:1367-84.
- Smellie WS, Forth J, Ryder S, Galloway MJ, Wood AC, Watson ID. Best practice in primary care pathology: review 5. *J Clin Pathol*. 2006. 59(12):1229-37.
- Kamath PS. Clinical approach to the patient with abnormal liver test results. *Mayo Clin Proc*. 1996. 71(11):1089-94.
- Musana KA, Yale SH, Abdulkarim AS. Tests of liver injury. *Clin Med Res*. 2004. 2(2):129-31.
- Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*. 2003. 79(932):307-12.
- Duclos-Vallée JC, Ichai P, Chapuis P, Misrahi M, Wiomant F. La maladie de Wilson. La revue du praticien. *Orphanet*. 2006.
- Omar S, Feki M, Kaabachi N. Le métabolisme du fer : revue générale et récents développements. *Ann Biol Clin*. 2006. 64(6):523-34.

Question 2

4. Une augmentation isolée des ASAT peut être d'origine extrahépatique. En général, cette augmentation est importante ($> 7N$). Les ASAT sont présentes en forte quantité dans les muscles ou les hématies, il est nécessaire de vérifier l'absence de myolyse (dosage des CK) ou d'hémolyse (non signalée par le biologiste et exclue par les dosages de bilirubine et d'haptoglobine). **Ce bilan permet d'écarter une éventuelle cause extrahépatique.**
5. Une élévation chronique inexplicée des transaminases peut être la seule manifestation d'une maladie cœliaque asymptomatique. (Thévenot et al. *Gastroenterol Clin Biol* 2003). La prévalence de l'augmentation des transaminases est proche de 10% chez des patients atteints de maladie cœliaque, alors qu'elle est inférieure à 1% dans une population de référence. (Bardella et al. *Hepatology* 1999). Le dépistage de la maladie cœliaque se fait dans un premier temps par la recherche des IgA anti-transglutaminase en s'assurant de l'absence d'un déficit en IgA (recommandations de la HAS, 2008). En cas de déficit en IgA, il convient actuellement de doser les IgG anti-transglutaminases ou IgG anti-endomysium. Les autres tests sérologiques n'ont plus leur place dans le diagnostic biologique de cette pathologie. La biopsie du grêle permettra de confirmer le diagnostic. Dans le cas de Mr.L., la négativité des IgA anti-transglutaminases et l'absence de déficit en IgA permettent **d'exclure le diagnostic de maladie cœliaque.**
6. Le syndrome polymétabolique est défini par la présence d'au moins 3 de ces critères : un tour de taille ≥ 102 cm chez l'homme, une pression artérielle $\geq 130/85$ mmHg, une hypertriglycémie $\geq 1,69$ mmol/L, une glycémie à jeun $\geq 6,1$ mmol/L ou un HDL-cholestérol $< 1,04$ mmol/L chez l'homme (Balkau et al. *Diabetes Metab* 2002). Mr.L. ne présente **pas de syndrome polymétabolique.**

Bibliographie

- Thévenot T, Mathurin P, Di Martino V, N'Guyen-Khac E, Canva-Delcambre V, Campin G et al. Maladie coeliaque et atteinte hépatique. *Gastroenterol Clin Biol*. 2003, 27:28-42.
- Bardella MT, Vecchi M, Conte D, Del Ninno E, Fraquelli M, Pacchetti S, et al. Chronic unexplained hypertransaminasemia may be caused by occult celiac disease. *Hepatology*. 1999. 29:654-7.
- Recommandations HAS. Quelles recherches d'anticorps prescrire dans la maladie cœliaque ? 2008.
- Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, et al. For The European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR). Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab*. 2002. 28:344-76.
- Imbert A, Colombat M, Capron J-B. Démarche diagnostique devant une augmentation modérée et prolongée des transaminases. *Presse Med*. 2003. 32:73-8.

Question 3

Toutes ces étiologies sont potentiellement responsables d'hypertransaminémies. **Néanmoins pour éviter un surcoût et des explorations non justifiées, il est préférable de hiérarchiser les examens à réaliser.**

L'hypothèse la plus probable, qui n'a pas été exclue par les bilans précédents et qui nécessite donc d'être explorée en priorité est l'existence d'**une interférence analytique** et notamment la recherche d'une éventuelle macroaspartate aminotransférase (macroASAT). La dissociation constatée entre les activités ASAT et ALAT est importante ce qui est rarement observé en l'absence d'une étiologie extra-hépatique. Cette dissociation a été constatée lors des 2 bilans biologiques réalisés chez Mr.L., ce qui oriente d'emblée vers un problème d'interférence analytique ayant un caractère chronique.

Certaines hypothèses diagnostiques ne peuvent être totalement exclues mais restent peu probables :

- **Un déficit en $\alpha 1$ antitrypsine (A1AT)**, maladie génétique de transmission autosomique récessive et de prévalence faible (1/2500). En général, ce diagnostic est évoqué en présence de symptômes respiratoires (emphysème pulmonaire) ou hépatiques, lesquels sont absents chez Mr.L. Le diagnostic peut être suspecté devant une diminution de la concentration sérique d' $\alpha 1$ antitrypsine et confirmé par un phénotypage de l'A1AT (IsoElectroFocalisation) ou par l'analyse du gène codant l'A1AT.

- **Une hépatite auto-immune**

Sa prévalence est très faible, de 0,1 à 1,2/100 000 habitants (Chazoullères, 2004). Dans cette pathologie, les transaminases peuvent être augmentées entre 2 et 50 fois. Deux pics de fréquence sont décrits : le premier entre 10 et 30 ans et le second entre 40 et 50 ans. Par ailleurs, ces patients présentent fréquemment une augmentation des gammaglobulines et une augmentation modérée des PAL. Le diagnostic est évoqué après avoir éliminé toutes les autres causes d'augmentation des transaminases. La confirmation se fait par la mise en évidence d'auto anticorps anti-muscle lisses, anti-nucléaires, anti-LKM1, anti-LC1 ou anti-SLA. Il peut être nécessaire de répéter ces examens. (Gleeson et al, 2011) Le score modifié de l'International Autoimmune Hepatitis Group prend en compte différentes données pour établir le diagnostic (sexe, autres causes possibles d'hypertransaminémie, les auto-anticorps, l'histologie et la réponse au traitement). Le diagnostic d'hépatite auto-immune reste souvent un diagnostic d'exclusion. (Alvarez et al., 1999)

Bibliographie

- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003. 98(5):960-7.
- Fletcher LM, Kwok-Gain I, Powell EE, Powell LW, Halliday JW. Markers of chronic alcohol ingestion in patients with nonalcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. *Hepatology*. 1991. 13:455-9.
- Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Torchio P. Meta-analysis of alcohol intake in relation to risk of liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol*. 1998. 33:381-92.
- Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis*. 2008. 19;3:16.
- HAS, Stratégies de dépistage biologique des hépatites virales B et C, 2011.
- Adams PC, Barton JC, McLaren GD et al. Screening for iron overload: Lessons from the HEmochromatosis and IRon Overload Screening (HEIRS) Study. *Can J Gastroenterol*. 2009. 23(11):769-772.

- Chazoullères O, Hépatites autoimmunes : actualités, FMC-HGE » POST'U 2004-Paris, www.fmcgastro.org.
- Gleeson D, Heneghan MA; British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut*. 2011. 60(12):1611-29.
- Alvarez F et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999. 31:929-93

Question 4

Les autres causes d'erreurs analytiques sont peu probables.

- L'hémolyse *in vivo* a été éliminée sur le second prélèvement (haptoglobulinémie normale). Une hémolyse *in vitro* ne peut pas être éliminée avec les renseignements fournis. Néanmoins, devant l'importance des valeurs de transaminases et le caractère chronique de cette augmentation, ce type d'interférence est peu probable. La plupart des automates affichent actuellement un indice d'hémolyse. En l'absence de système de contrôle, l'examen à l'œil nu du tube permet d'éliminer cette cause.
- Le tube non conforme et le défaut de prélèvement sont deux hypothèses peu probables devant une interférence chronique. De plus, la non-conformité donne lieu à une alerte avec éventuellement annulation du dosage et information du prescripteur concerné.
- En revanche l'interférence provoquée par un traitement n'est pas exclue et pourrait expliquer une hypertransaminémie chronique. Bien que l'interrogatoire ne mentionne aucun traitement particulier, le patient peut mettre de préciser ses traitements ou ses habitudes alimentaires. Pour éliminer ce type d'interférence, les fiches techniques des fournisseurs peuvent permettre une première approche, mais ces dernières sont rarement exhaustives et il est souvent nécessaire de faire quelques recherches bibliographiques. La littérature dans ce domaine est souvent insuffisante et le biologiste se retrouve parfois démuné lorsqu'il faut établir un lien de causalité entre interférence et médicament.

Question 5

Pour en savoir plus:

- Wener RR, Loupatty FJ, Schouten WE. Isolated elevated aspartate aminotransferase: a surprising outcome for clinicians. *Neth J Med*. 2012. 70(3):136-8
- Wiltshire EJ, Crooke M, Grimwood K. Macro-AST: a benign cause of persistently elevated aspartate aminotransferase. *J Paediatr Child Health*. 2004. 40(11):642-3.
- Orlando R, Carbone A, Lirussi F. Macro-aspartate aminotransferase (macro-AST). A 12-year follow-up study in a young female. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003. 15(12):1371-3.
- Caropreso M, Fortunato G, Lenta S, Palmieri D, Esposito M, Vitale DF, Iorio R, Vajro P. Prevalence and long-term course of macro-aspartate aminotransferase in children. *J Pediatr*. 2009. 154(5):744-8.

Question 6

Dans l'hypothèse où cette interférence est due à la présence d'une macroenzyme, la caractérisation de cette dernière peut avoir une importance non négligeable dans la prise en charge du patient.

Les macroenzymes sont des enzymes de masse moléculaire augmentée, ce qui diminue leur clairance rénale et a pour double conséquence une accumulation de la macromolécule dans la circulation sanguine et une augmentation des activités plasmatiques concernées. Parfois, l'activité enzymatique peut ne pas être augmentée, notamment en ce qui concerne les macroamylases, macro CK et macro LDH. (Remaley et Wilding P, 1989). En pratique, ce sont les augmentations des activités enzymatiques qui sont source d'erreurs diagnostiques. Par ailleurs certains types de macroenzymes sont associés à des pathologies.

Deux types de macroenzymes ont été décrits :

- **Macro enzyme de type 1 : l'enzyme est liée à une immunoglobuline.** Cette liaison se fait en général avec des IgG ou IgA (Klonoff, 1980). La liaison avec l'immunoglobuline peut être spécifique ou non. La plupart des patients ne présente aucun symptôme clinique ou biologique et la présence de macroenzyme de type 1 peut alors être considérée comme un phénomène bénin. En revanche, il est classique d'observer ces macroenzymes lors de pathologies auto-immunes (PR, Lupus, Sclérodémie, cryoglobulinémie, maladie inflammatoire de l'intestin...), sans que l'on puisse préciser qu'il s'agit d'un symptôme ou d'une cause de la maladie (Turecky, 2004). **Les biologistes doivent alerter les prescripteurs, ces derniers pourront mettre alors en place une surveillance dans le but de détecter le plus rapidement l'apparition possible une éventuelle maladie auto-immune chez leur patient.**
- **Macroenzymes de type 2 :** Différentes formes existent, et concernent des « autopolymérisations » de l'enzyme concernée (ex : macroCK) ou des liaisons avec de l'enzyme à des médicaments ou des lipoprotéines.
 - o Les macroCK de type 2 sont en général associées à des lésions hépatiques, des maladies systémiques sévères ou à certains traitements.
 - o Les macroenzymes du système hépatobiliaire peuvent être mises en évidence chez des sujets sains mais leur fréquence augmente chez les sujets porteurs d'une atteinte hépatique. (Remaley and Wilding, 1989)

Bibliographie

- Klonoff DC. Macroamylasemia and other immunoglobulin-complexed enzyme disorders. *West J Med* .1980. 133:392-407.
- Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl Lek Listy*. 2004. 105 (7-8):260-263.
- Traynor OJ, Wood CB, Echetebe ZO, Whitaker KB, Moss DW. Measurement of high molecular weight forms of enzymes in serum in the detection of hepatic metastases of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1986, 53(4):483-7.
- Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*. 1989. 35(12):2261-70.
- Wener RR, Loupatty FJ, Schouten WE. Isolated elevated aspartate aminotransferase: a surprising outcome for clinicians. *Neth J Med*. 2012. 70(3):136-8
- Galasso PJ, Litin SC, O'Brien JF. The macroenzymes : a clinical review. *Mayo Clin*. 1993. 349-54.

Question7

- **Techniques de dépistage faciles à mettre en œuvre :**

- **La précipitation par le PEG** permet de dépister de nombreuses macroenzymes (Wener et al., 2012). Le PEG a la propriété de faire précipiter quasiment totalement les immunoglobulines G et M et environ 80% des IgA. Il participe également à un réarrangement des lipides des LDL. C'est pourquoi il peut être utilisé pour les enzymes qui sont liées à ces deux types de molécules. Le PEG semble aussi faire précipiter d'autres macroenzymes, telles que les macroCK de type 2 (Wyness et al., 2011).
- **L'ultrafiltration** semble être aussi discriminante que la précipitation par le PEG. Wyness et al. ont montré que cette technique est fiable pour dépister les macroenzymes (étude réalisée sur les macroamylases et les macroCK). De part son principe, elle permet de détecter toutes les macroenzymes.
- Ces deux techniques sont économiques, reproductibles, fiables et faciles à mettre en œuvre (Wyness et al., 2011) néanmoins il n'y a pas de consensus actuel sur les protocoles et les valeurs de référence à utiliser. C'est pourquoi il reste nécessaire d'établir ses propres valeurs de référence avec des témoins ou d'utiliser les données de la littérature. (Davidson et Watson, 2003 ; Wyness et al., 2011)

- **Techniques plus spécialisées et nécessitant des compétences spécifiques :**

Si historiquement, Remaley et Wilding (1989) conseillent l'utilisation des techniques de précipitation par le PEG pour mettre en évidence les macroenzymes de type 1, ces auteurs soulignent l'intérêt des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie pour celles de type 2.

- **Électrophorèse des isoenzymes** est une technique sensible qui permet de déterminer directement le type de macroenzyme. Le recours à cette technique est principalement réservé à 3 enzymes : PAL, GGT et CK.
- **Chromatographie d'exclusion stérique** peut être utilisée quelle que soit l'enzyme. Néanmoins devant la complexité de sa mise en œuvre, elle est réservée à certains laboratoires.

En conclusion, pour dépister une macroenzyme :

-Si vous ne disposez pas des techniques de référence (électrophorèse des isoenzymes et chromatographie d'exclusion stérique).

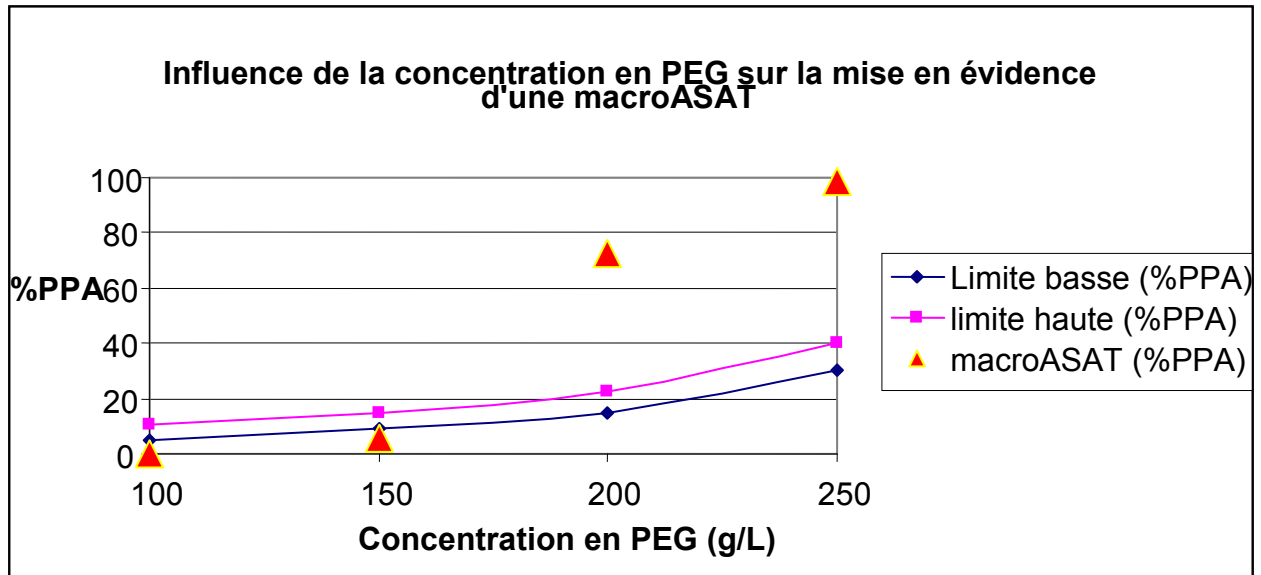
- ✓ **la précipitation par le PEG** est une technique simple mais il faut se référer aux modes opératoires **publiés** et comparer les résultats obtenus aux valeurs de référence de ces publications (Davidson et Watson, 2003 ; Wyness et al., 2010 ; Wyness et al., 2011). Il est conseillé dans ce cas d'utiliser des plasmas témoins pour valider la bonne réalisation technique de l'analyse. (Wener et al., 2012, Patteet et al., 2012).
- ✓ **L'ultrafiltration** peut, comme la précipitation par le PEG, être utilisée par tous les laboratoires. En effet, ces deux techniques requièrent un équipement modeste (contrairement à l'électrophorèse ou la chromatographie). Cette dernière semble être plus reproductible et discriminante dans le cas des macroenzymes en faible quantité. Néanmoins les études concernant cette technique sont peu nombreuses.

Dans tous les cas, face à un résultat positif obtenu avec une technique de dépistage (PEG, UF), il convient de confirmer la présence d'une macroenzyme au moyen d'une technique de référence (électrophorèse, chromatographie).

Bibliographie

- Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*. 1989. 35(12):2261-70.
- Wener RR, Loupatty FJ, Schouten WE. Isolated elevated aspartate aminotransferase: a surprising outcome for clinicians. *Neth J Med*. 2012. 70(3):136-8
- Mifflin TE, Bruns DE, Wrotnoski U, MacMillan RH, Stallings RG, Felder RA, Herold DA. University of Virginia case conference. Macroamylase, macro creatine kinase, and other macroenzymes. *Clin Chem*. 1985. 31(10):1743-8.
- Davidson DF, Watson DJ. Macroenzyme detection by polyethylene glycol precipitation. *Ann Clin Biochem*. 2003. 40:514-20.
- Wyness SP, Hunsaker JJ, La'ulu SL, Rao LV, Roberts WL. Detection of macro-creatine kinase and macroamylase by polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration methods. *Clin Chim Acta*. 2011. 20;412:2052-7.
- Wyness SP, Hunsaker JJH, La'ulu SL, Roberts WL. Reference intervals for six enzymes after polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration. *Clin Chem Acta*. 2011. 412(11-12):1161-2.
- Patteet L, Simoens M, Piqueur M, Wauters A. Laboratory detection of macro-aspartate aminotransferase: case report and evaluation of the PEG-precipitation method. *Clin Biochem*. 2012. 45(9):691-3.

Annexe 4 : Graphique représentant l'influence de la concentration en PEG dans la mise en évidence d'une macroASAT d'après Patteet *et al. Clinical Biochemistry*. 2011. (94).









L'activité précipitable par le PEG (%PPA) traduit l'effet de la précipitation par le PEG sur l'activité résiduelle.

Dans leur étude, Patteet *et al.* mettent en évidence que pour une concentration de solution de PEG supérieure ou égale à 200 g/L, la précipitation par le PEG permet de mettre en évidence les macroASAT sans ambiguïtés (%PPA supérieur aux valeurs de référence). En revanche, pour des concentrations inférieures, ces dernières ne sont pas mises en évidence par cette technique.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29 octobre 2013

| | |
|--|---|
| <p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Anthony LEON</p> <p><u>Sujet :</u> Mise en évidence d'une macrocréatine kinase induite par la prise de ténofovir : De l'analyse des résultats de l'étude clinico-biologique nancéienne à la mise en place d'une enquête de pratique professionnelle nationale.</p> <p><u>Jury :</u> Président : Monsieur le Professeur J.Y Jouzeau Directeur : Madame le Docteur I Aimone-Gastin Juges : Monsieur le Professeur J.L Guéant Monsieur le Professeur T May</p> | <p align="center">Vu, Nancy, le 24/09/2013</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">  J.Y. JOUZEAU </p> <p align="center">  Docteur Isabelle AIMONE-GASTIN MCU-PH Laboratoire de Biochimie des Protéines et Centre de Tri CHU Nancy - Hôpital de Brabois F 54511 - VANDŒUVRE LES NANCY Cedex Tél.. 03 83 15 35 13 - Fax: 03 83 15 35 91 </p> |
| <p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 26.09.13</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Francine PAULUS </p> <p align="center">  </p> | <p align="center">Vu, Nancy, le 4.10.2013</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Pierre MUTZENHARDT </p> <p align="center">  </p> <p align="center">N° d'enregistrement : 6636 .</p> |

N° d'identification :

TITRE

Mise en évidence d'une macrocréatine kinase induite par la prise de ténofovir : de l'analyse des résultats de l'étude clinico-biologique nancéenne à la mise en place d'une enquête de pratique professionnelle nationale.

Thèse soutenue le 29 Octobre 2013

Par Anthony LEON

RESUME :

La mise en évidence d'une interférence analytique n'est pas toujours chose aisée pour le biologiste. Les macroenzymes sont des complexes macromoléculaires responsables d'interférences analytiques pouvant être à l'origine d'erreurs diagnostiques. Les biologistes médicaux doivent être sensibilisés à la présence éventuelle de cette interférence.

Nous avons mis en évidence la présence d'une macrocréatine kinase de type 2 chez 16 patients traités pour une infection par le virus de l'immunodéficience humaine, vraisemblablement induite par la prise de ténofovir. Nous avons essayé d'estimer la fréquence de survenue de cette interférence analytique en analysant *a posteriori* les activités enzymatiques CK totales et CK-MB dans une population de 557 patients infectés par le VIH dont le traitement comprenait ou non du ténofovir. Il existait une probable interférence sur le dosage de l'activité CK-MB chez 24% des patients traités par ténofovir contre moins de 2% chez les autres patients.

En nous inspirant de ce cas clinico-biologique, nous avons souhaité compléter ce travail par une enquête de pratiques professionnelles réalisée au niveau national grâce au soutien de la Société Française de Biologie Clinique. L'objectif essentiel était de sensibiliser les biologistes médicaux à la problématique des macroenzymes et à l'importance de leur mise en évidence. L'exploitation des résultats de cette enquête et ainsi qu'une revue de la bibliographie, nous ont permis de conclure que deux techniques semblent bien adaptées au dépistage des macroenzymes quelle que soit la taille de la structure. Il s'agit de la précipitation par le polyéthylène glycol et l'ultrafiltration. Les techniques plus spécifiques, électrophorèse séparative ou chromatographie d'exclusion stérique, sont utilisables par les laboratoires qui en ont l'expertise. Les résultats de cette enquête ont permis d'éditer un document pédagogique mis à disposition des participants sur le site de la SFBC.

En conclusion, ce travail, débuté par une approche analytique centrée sur des résultats biologiques évocateurs d'une interférence rare, s'est enrichi de la mise en place d'un dialogue clinico-biologique. Dans un second temps, le partage d'expérience, réalisé grâce à une enquête de pratique professionnelle, m'a permis de communiquer sur ces interférences et de profiter du retour d'expérience des participants pour proposer une démarche de dépistage des macroenzymes.

MOTS CLES :

Macroenzyme, ténofovir, enquête de pratique, dépistage des macroenzymes, précipitation par le PEG, ultrafiltration.

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---|---|---|
| <u>Dr Isabelle AIMONE-GASTIN</u> | <u>Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Nutrition et Métabolisme CHRU Nancy</u> | Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | Thème 5 |

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
 3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
 5 – Biologie 6 – Pratique professionnelle