

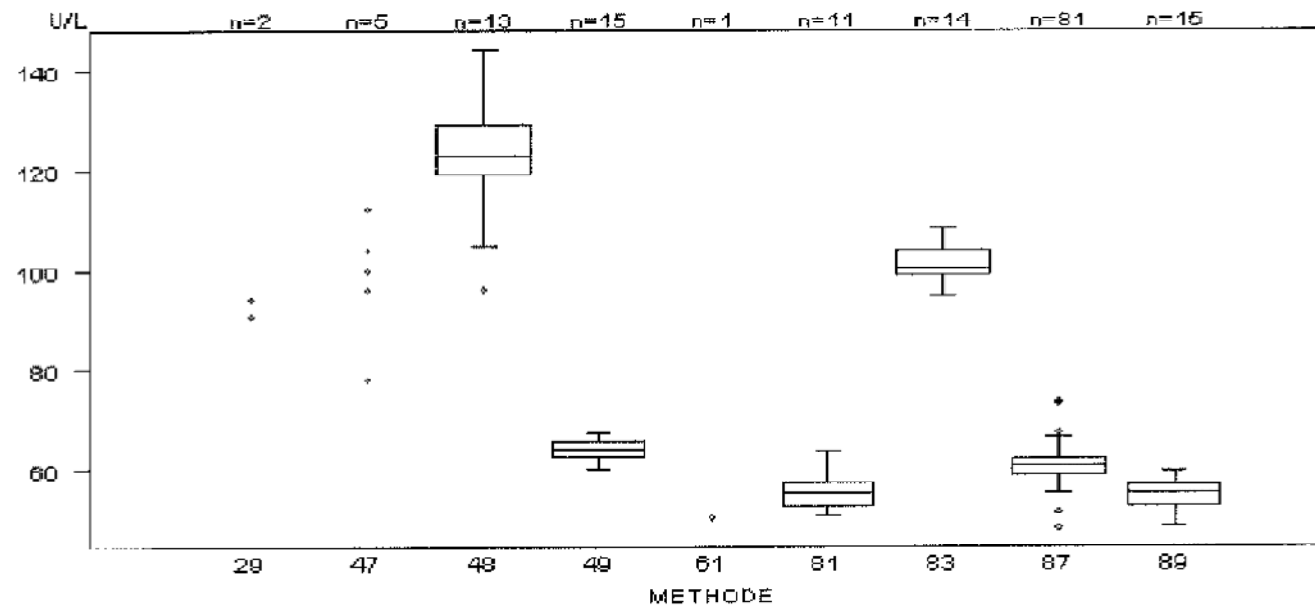
# Dosage des hormones glycoprotéiques et difficultés de standardisation

## L' hCG

M. Elsen

## HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (hCG)

HCG - d (%) : 19.0	R/12982					
METHOD	Median U/L	SD U/L	CV %	N labs		
029 Siemens Dimension Vista	91.0 94.0			2		
047 BioMérieux-Vidas	78.0	96.0	99.9	104.0	112.4	5
048 Siemens Immulite	123.0	7.4	6.0	13		
049 Siemens-ADVIA Centaur	64.0	2.4	3.7	15		
061 Abbott AxSYM	50.3			1		
081 Beckman Coulter-Access	55.0	3.5	6.3	11		
083 Vitros ECI (genII)	100.2	3.8	3.8	14		
087 Roche Elecsys / Mod E/ Cobas e	61.1	2.4	4.0	81		
089 Abbott-Architect	55.2	3.2	5.8	15		
<b>Global results (all methods and all measuring systems)</b>	<b>62.0</b>	<b>6.2</b>	<b>10.0</b>	<b>157</b>		



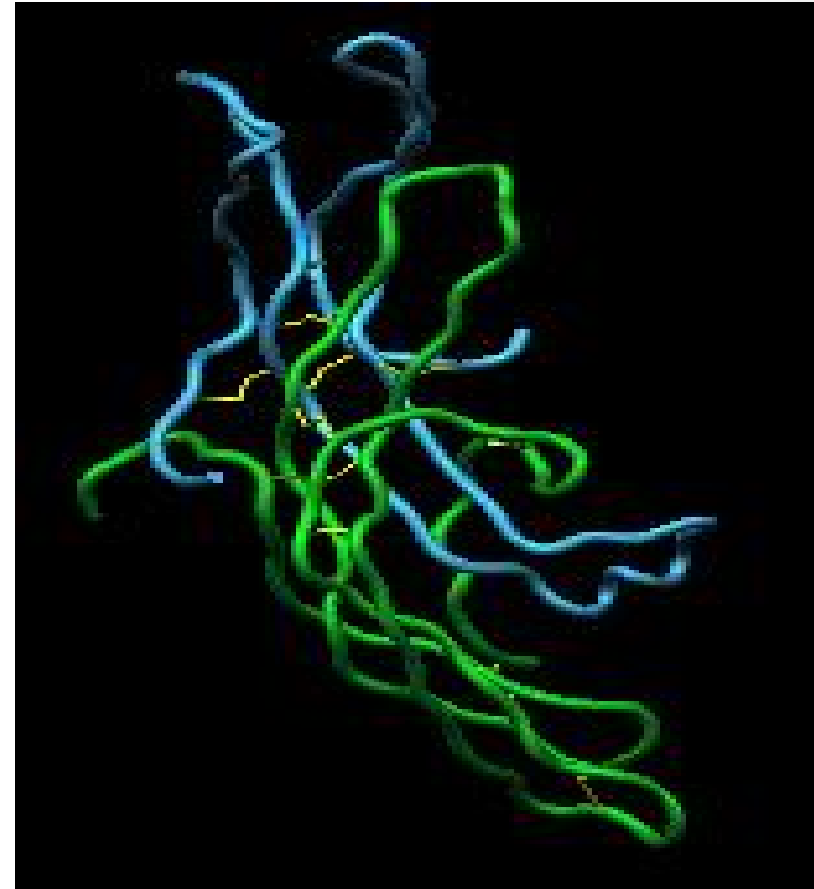
# Variations analytiques des immunodosages: Causes?

- ” 1. Hétérogénéité de la molécule à doser
- ” 2. Spécificité de l'immunodosage
- ” 3. Composition (pureté) des préparations de référence (calibrateurs)

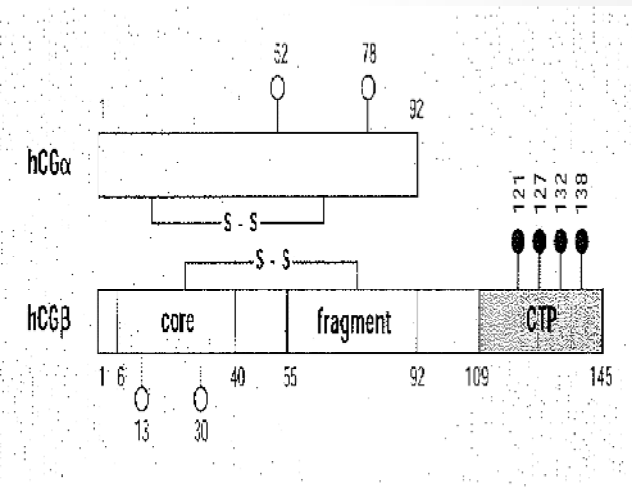
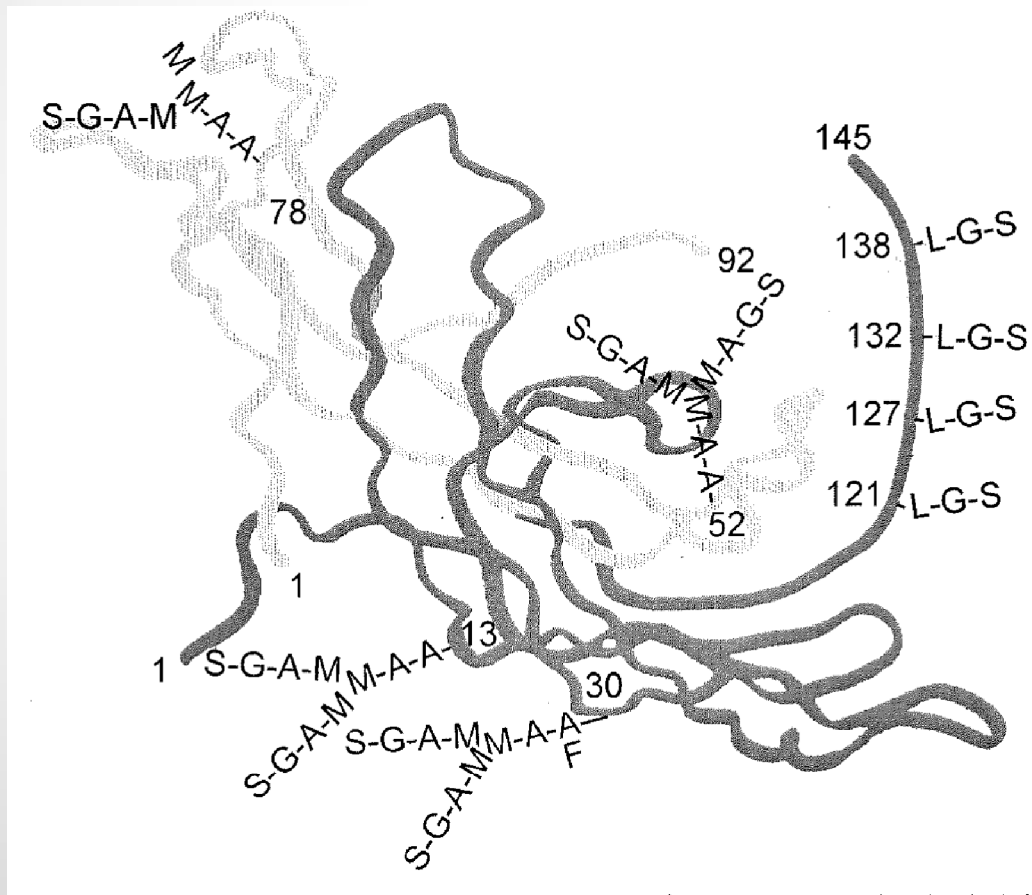


# 1. Hétérogénéité de la molécule à doser

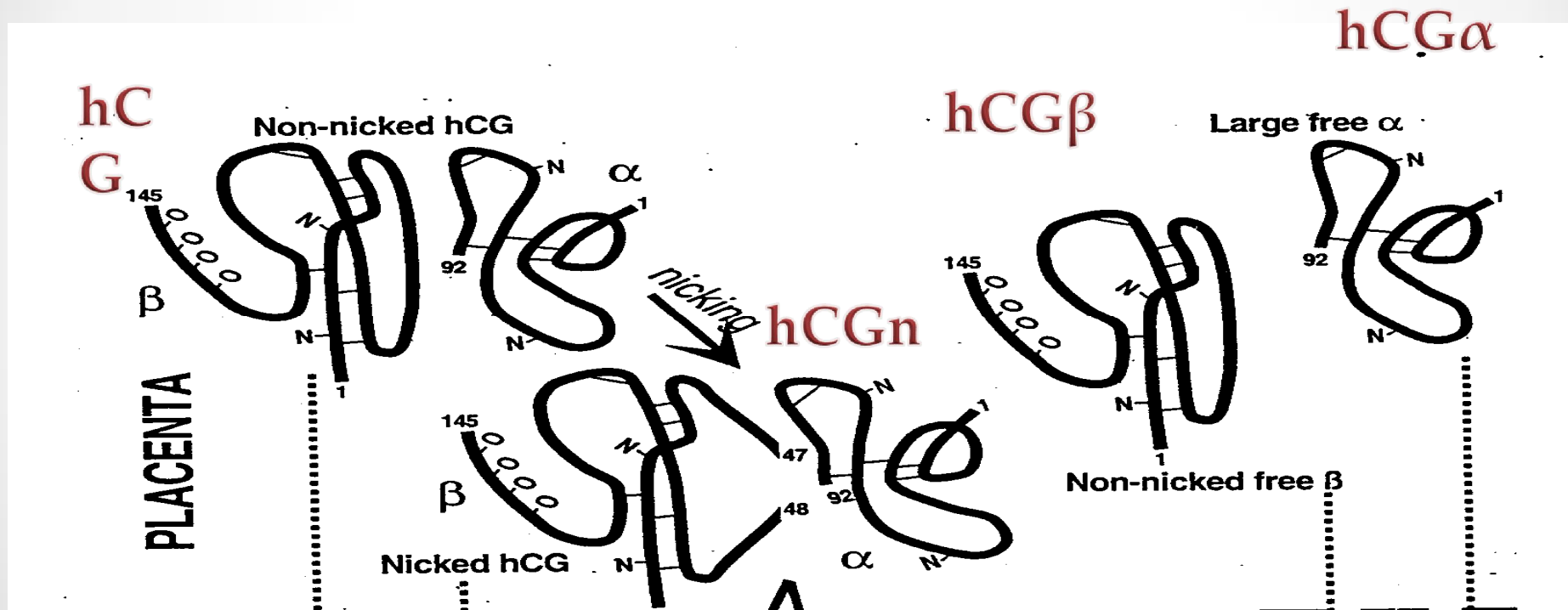
- ” Structure générale des glycoprotéines (TSH, LH, FSH et hCG)
- Une chaîne commune **alpha** de 92 a.a. et 2 chaînes glycaniques
  - Une chaîne spécifique **bêta** de 117 à 149 a.a. et 1 chaîne glycanique
  - Liaison non covalente



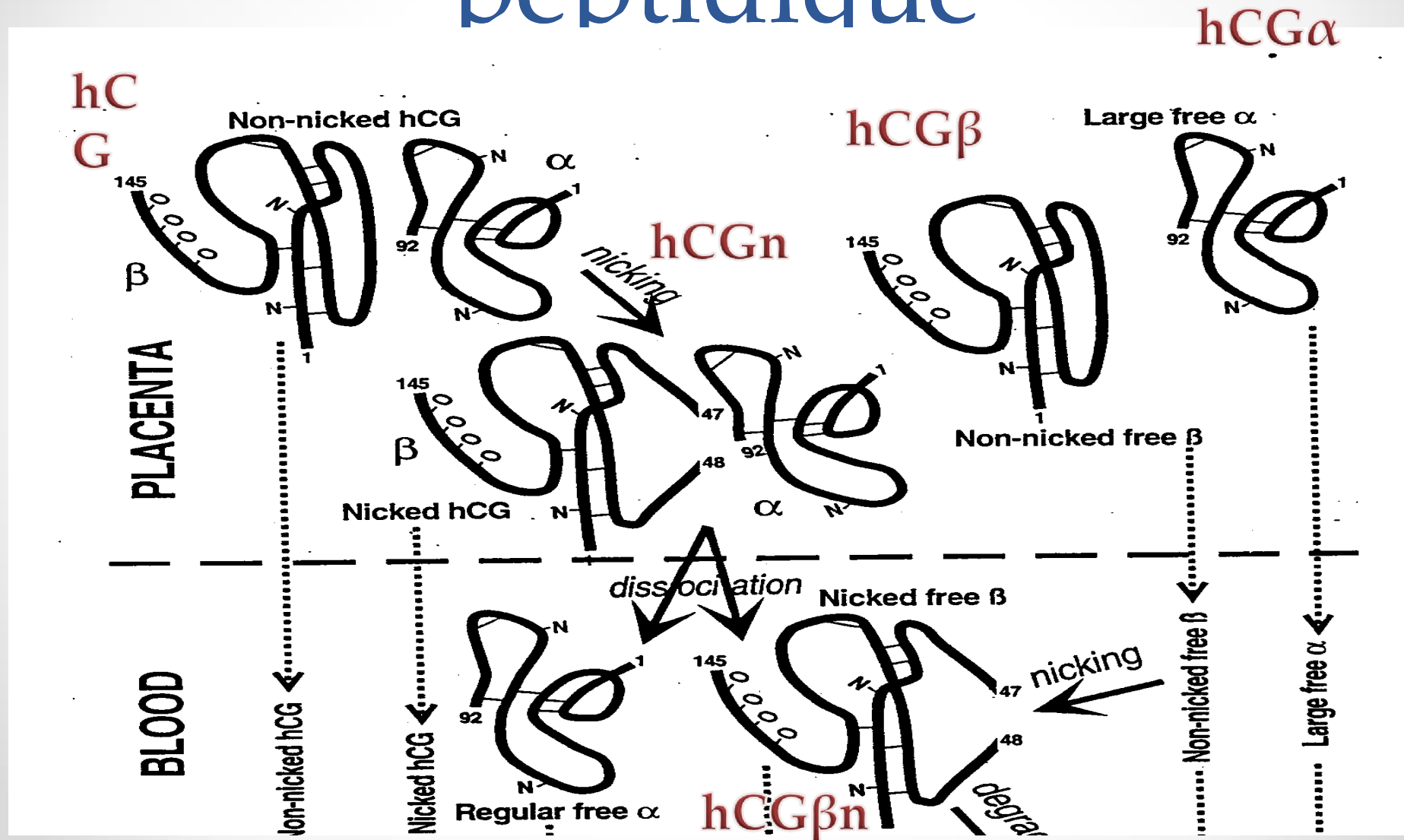
# L' hCG (human chorionic gonadotropin)



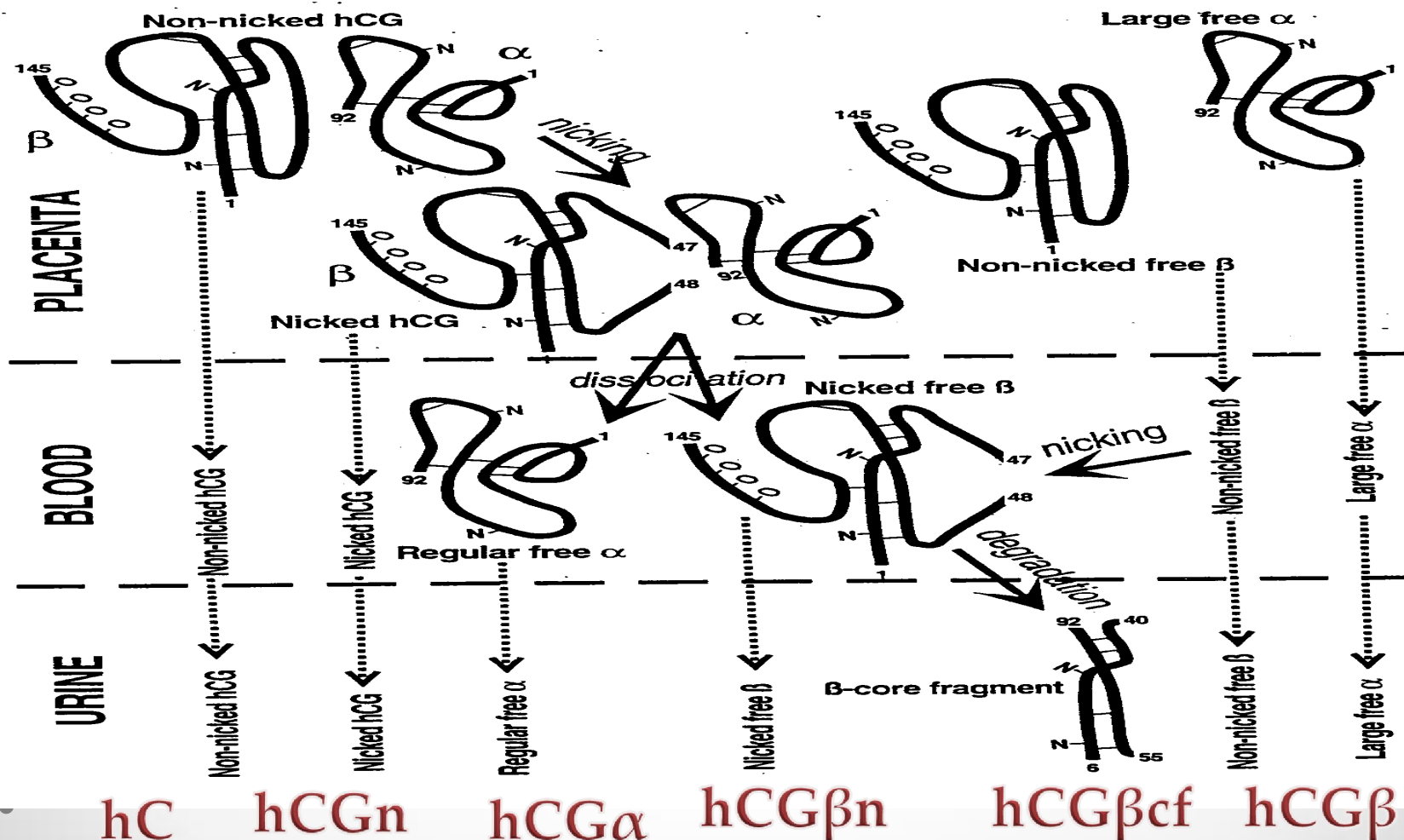
# 1.1 Par la structure peptidique



# 1.1 Par la structure peptidique

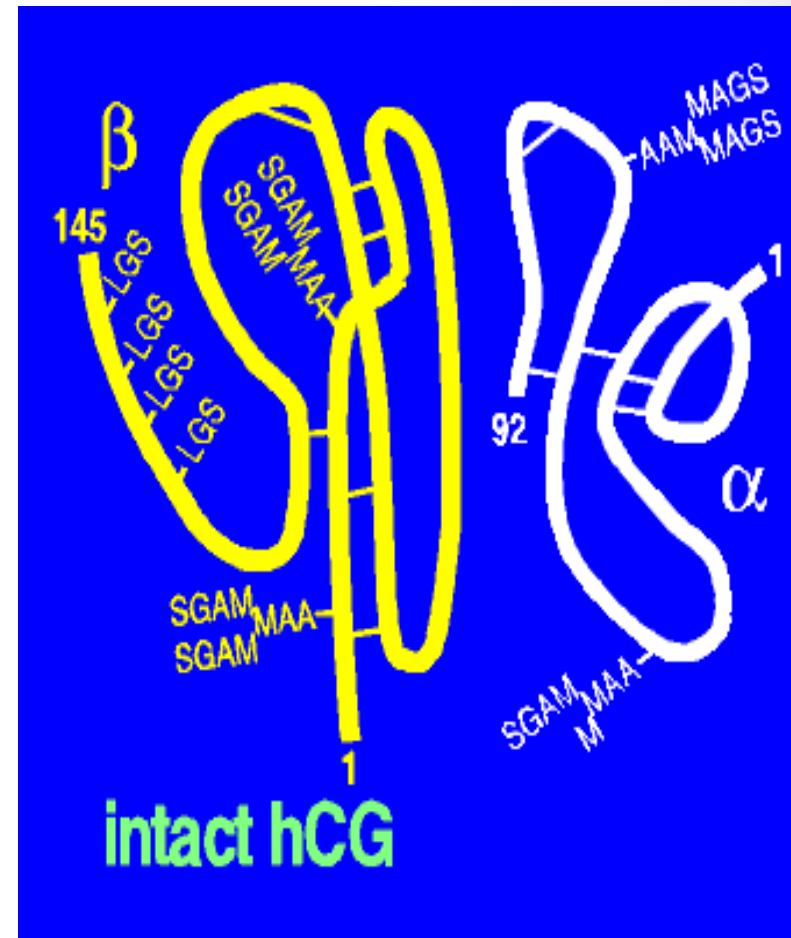


# 1.1 Par la structure peptidique



# 1.2 Par leur structure oligosaccharidique

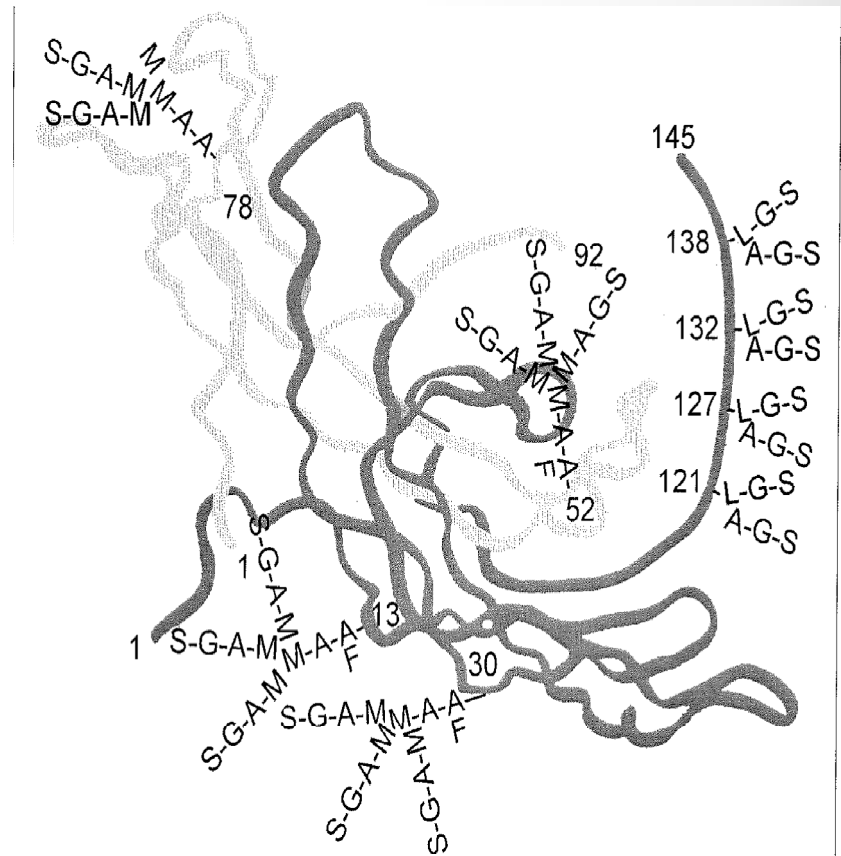
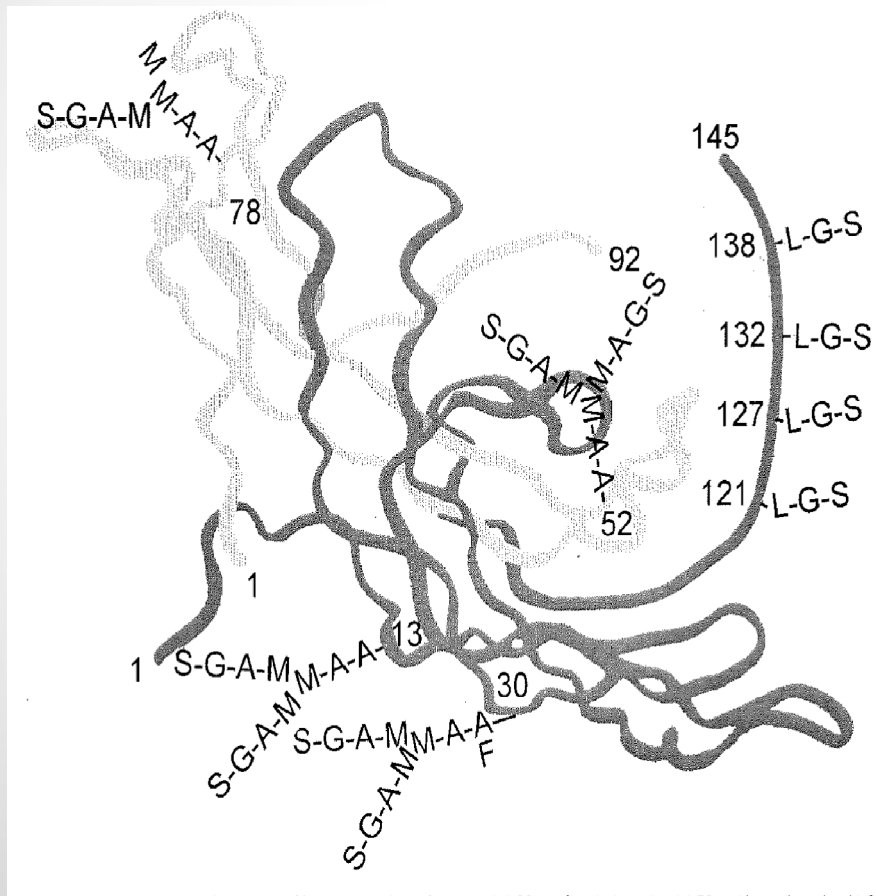
- “ Mécanismes de glycosylation
  - Glycosylation en bloc des résidus asparagine par une liaison N-glycosidique puis épissage
  - Glycosylation pas par pas
- “ Différentes isoformes
  - Variables selon les compartiments et les conditions physiopathologiques
  - Formes hypoglycosylées – formes hyperglycosylées



# hCG hyperglycosylée

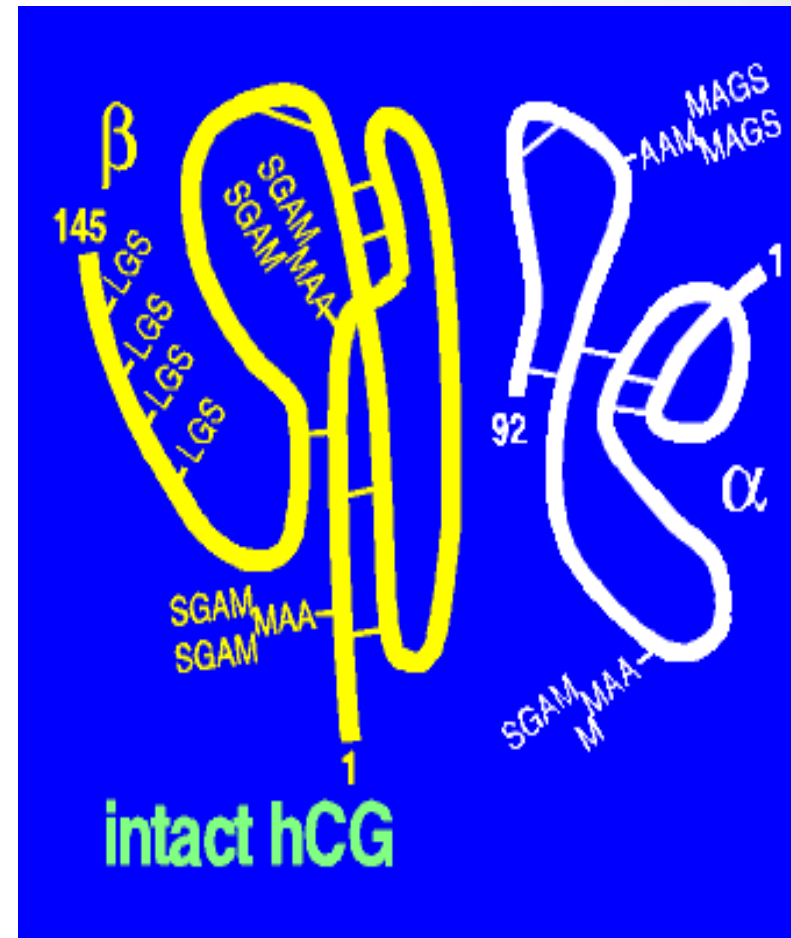
hCG

hCGh



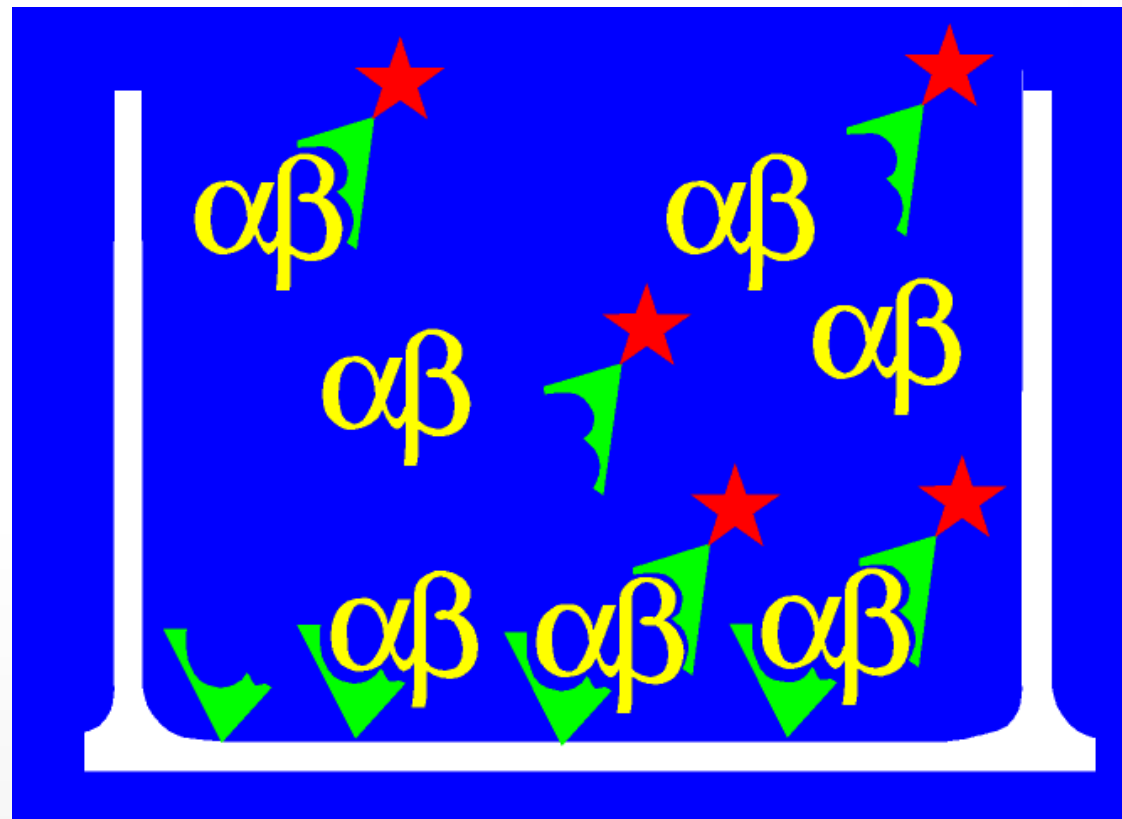
# 1.2 Par leur structure oligosaccharidique

- ” Mécanismes de glycosylation
  - Glycosylation en bloc des résidus asparagine par une liaison N-glycosidique puis épissage
  - Glycosylation pas par pas
- ” Différentes isoformes
  - Variables selon les compartiments et les conditions physiopathologiques
  - Formes hypoglycosylées – formes hyperglycosylées
  - Activité biologique est influencée par glycosylation (>< l'immunoréactivité)

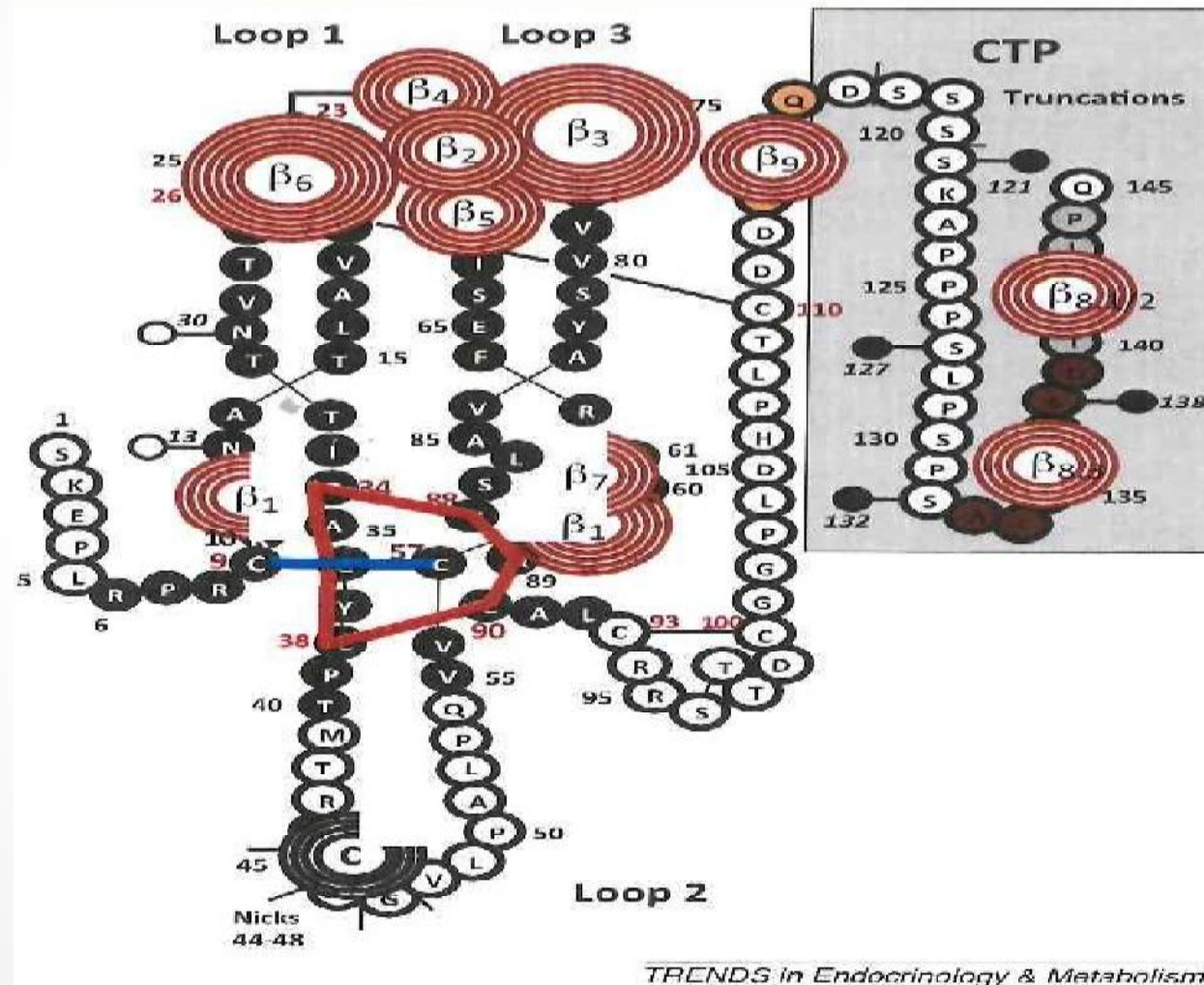


## 2. Spécificité de l'immunodosage

- ” Méthode « sandwich » (IRMA, ELISA), Ac monoclonaux



# 2.1 carte épitopique



# 2.1 carte épitopique

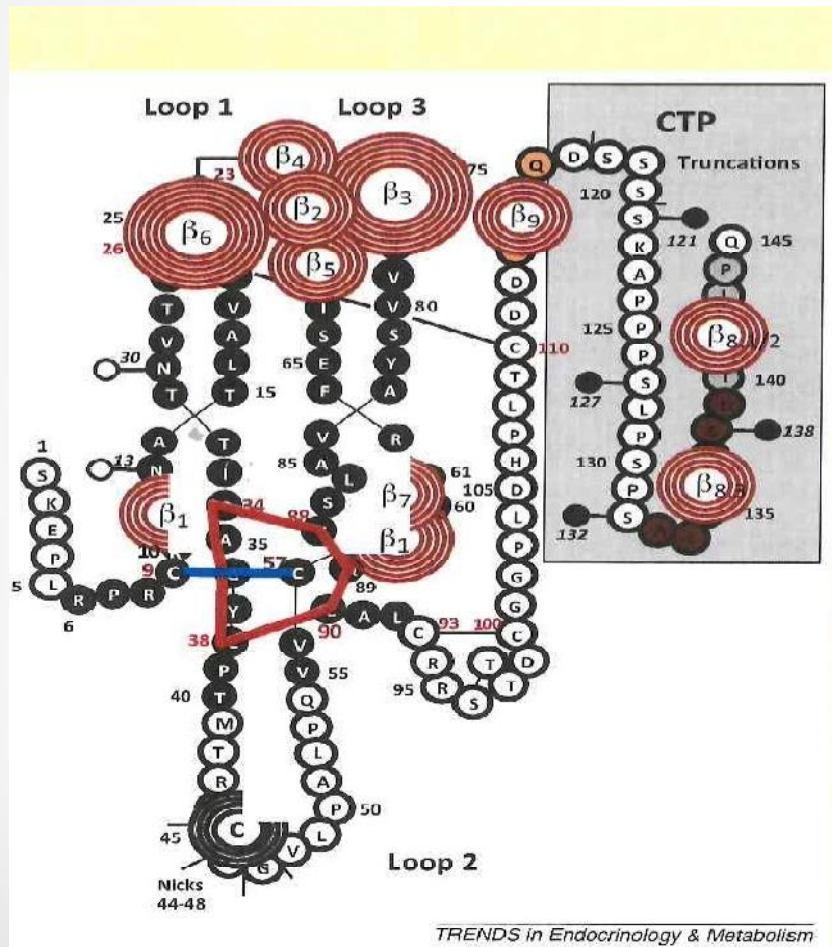


Figure I. Three-dimensional hCGβ map showing antigenic domains/epitopes.

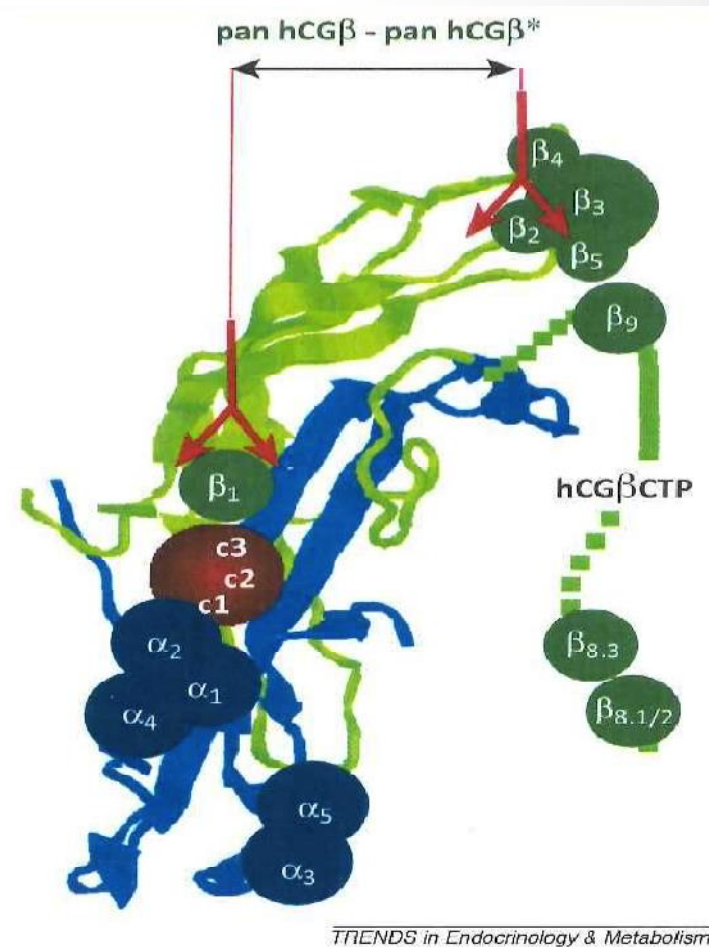


Figure II. Three-dimensional epitope map of hCG and location of epitopes β<sub>1</sub>-β<sub>2</sub> for the construction of wide spectrum hCG+hCGβ+hCGβcf methods [6,10].

## 2.2 Construction de l'immunodosage

” Sélection des Ac en fonction de leurs spécificités et des objectifs cliniques du test

Spécificité du test	Combinaisons Ac	Utilité clinique
hCG + hCG $\beta$	B1 avec $\beta$ 2 ou $\beta$ 4	Monitoring grossesse Oncologie T21
hCG	C1/c2 avec $\beta$ 2 ou $\beta$ 4	Monitoring grossesse
hCG $\beta$ + hCG $\beta$ cf	B6/ $\beta$ 7 avec $\beta$ 2 ou $\beta$ 4	T21 Oncologie
hCG $\alpha$	A6 – $\alpha$ 4 – $\alpha$ 5	Tumeur hypophysaire
hCG $\beta$ cf(seul)	B11 avec $\beta$ 2 ou $\beta$ 4	Détection urinaire
.....		

## 2.2 Construction de l'immunos dosage

- ” La connaissance de ces spécificités est indispensable à la compréhension de la réactivité du dosage par rapport aux différentes isoformes.

Combi Ac	hCG	hCGn	hCG $\beta$	hCG $\beta$ n	hCGcf	hCG $\alpha$
$\beta$ 1/ $\beta$ 2-4	✓	✓	✓	✓	✓	
C3/ $\beta$ 2-4	✓	✓				
$\alpha$ 6/ $\alpha$ 3						✓

# 3. Composition des préparations de référence

- Origine hypophysaire/urinaire
- Composition du mélange d'isoformes
- Pureté de l'hormone de référence
- Calibration en fonction de l'activité biologique (UI/L) (4th IS 75/589)



# Idéalement

Standardisation des immunodosages

- ” Système capable de reconnaître toutes les isoformes de manière équimolaire.
- ” Références reproduisant la diversité des isoformes dans toutes les situations physiologiques et pathologiques

**Mission impossible ?**

# Réponses

- ” Hormones de référence (calibrateurs)
  - Hormones recombinantes
    - ” Quantité illimitée
    - ” Qualité constante
    - ” Composition oligosacharidique?
    - ” Proportions relatives des isoformes?
  - Caractérisation précise (analyse des acides aminés) des isoformes présentes dans les préparations de référence existantes et leur quantification pondérale (mole/L) (1st IRR 99/688, hCG 0,39 nmol ou 179 IU)

# Réponses

## ” Alternatives analytiques

- Développement d'essais multiplex sensibles aux différentes isoformes
- Spectrométrie de masse



# Difficultés de standardisation du dosage de l'hCG

- Hétérogénéité de la molécule à doser (isoformes peptidiques et oligosaccharidiques)

Connaissance et uniformisation de la nomenclature des isoformes

- Spécificité de l'immunodosage avec reconnaissance non équimolaire ou nulle des différentes isoformes.

Connaissance des qualités du test utilisé/ nouvelle approche analytique (spectrométrie)

- Composition préparations de référence (calibrateurs)

Utilisation de solutions de référence calibrées pour les principales isoformes en nmol/L (>< UI/L)