

Méthodologie et utilisation du dosage de la chromogranine A en biologie clinique

Éric Baudin, François Degorce

Depuis la mise en œuvre du premier dosage de la chromogranine A (CGA) circulante en 1984, de nombreux travaux ont été conduits pour évaluer son intérêt en biologie clinique. Initialement décrite comme un marqueur des phéochromocytomes, son utilisation diagnostique a été étendue à l'ensemble des tumeurs neuroendocrines. Le développement clinique de ce marqueur ubiquitaire des tumeurs neuroendocrines a longtemps été freiné par des difficultés méthodologiques concernant notamment sa purification et la protéolyse

précoce à laquelle la CGA est soumise. Le développement d'anticorps monoclonaux a facilité la mise au point de dosages immunométriques à deux sites. Les données cliniques obtenues ont permis de montrer que le stade tumoral, le siège de la tumeur neuroendocrine primitive, et l'existence de sécrétions hormonales étaient autant de paramètres à prendre en compte dans l'interprétation d'un taux de CGA. Les résultats actuels permettent de situer la CGA dans l'approche diagnostique et pronostique des tumeurs neuroendocrines.

Parmi les granines, ce sont essentiellement les chromogranines, et notamment la chromogranine A (CGA), qui ont fait l'objet du développement clinique le plus avancé. Dès 1984, date d'apparition de la première méthode de dosage radioimmunologique, l'intérêt clinique du dosage de la CGA s'est orienté vers l'étude des tumeurs neuroendocrines [1]. Cette première étape du développement était logiquement, compte tenu du rôle joué par ce marqueur dans la structure des granules de sécrétion des cellules neuroendocrines, et de la place de la CGA comme marqueur ubiquitaire des tumeurs neuroendocrines en anatomopathologie [2]. Les tumeurs neuroendocrines constituent un réseau de tumeurs dispersées dans l'ensemble de l'organisme dans lequel on distingue deux sous-groupes en fonction du siège et de

l'origine embryologique : les tumeurs neuroendocrines dérivées du neuroectoderme (cancer médullaire de la thyroïde, phéochromocytome, paragangliome, adénome hypophysaire, tumeur de Merkel, neuroblastome), et celles dérivées de l'endoderme (adénome parathyroïdien, tumeurs neuroendocrines du larynx, des bronches, du thymus, du pancréas, de l'iléon, de l'appendice, du rectum notamment). La place potentielle des marqueurs biologiques dans l'approche clinique, diagnostique et pronostique de ces tumeurs est importante. En effet celles-ci se caractérisent par la sécrétion d'hormones responsables de syndromes cliniques, par une survie de plusieurs années pour certaines d'entre elles, même au stade métastatique, mais aussi par les limites de l'imagerie conventionnelle dans la recherche de la tumeur primitive ou même pour le bilan d'extension [3].

Considérations méthodologiques sur la détermination de la CGA plasmatique

Le développement du dosage biologique de la CGA s'est en premier lieu heurté à la difficulté de purification de la CGA puis à la protéolyse intense à laquelle cette glycoprotéine est soumise. Dès 1967, Smith et Winkler [4] décrivaient la purification de cette protéine à partir de cellules chromaffines de la glande surrénale bovine, organe qui, notamment en raison de sa disponibilité, a longtemps été une source privilégiée de CGA. Une étape décisive a été franchie par O'Connor *et al.* [5] avec l'isolement de la CGA humaine à partir de phéochromocytome et par l'obtention de l'anticorps monoclonal LK2H10 par Lloyd et Wilson [6] après immunisation avec un extrait du même tissu. Ces outils d'immuno-

détection, qu'il s'agisse d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ont tout d'abord permis d'étudier la distribution tissulaire de la CGA, et d'en faire rapidement un marqueur incontournable pour l'identification des contingents endocrines et neuroendocrines en anatomie pathologique [7]. En dépit de fortes homologues structurales entre les formes bovine et humaine [5], les anticorps dirigés contre la CGA humaine se sont naturellement avérés plus efficaces pour le premier dosage radio-immunologique (RIA) de la protéine mis au point par O'Connor et Bernstein [1].

Suite à ces premières mises au point, bon nombre d'équipes ont adopté et transposé le dosage décrit par O'Connor afin d'en éprouver la valeur clinique. De fait, la plupart des données publiées jusqu'à récemment ont été obtenues au travers des dosages par compétition de la CGA. Ils mettent en jeu la CGA radiomarquée et surtout des anticorps polyclonaux (AcP) produits contre la protéine native. Ils sont par conséquent susceptibles de reconnaître différents épitopes au long de la séquence protéique. Dans cette configuration, la protéine marquée à l'iode 125 se lie à l'anticorps spécifique et peut être déplacée soit par son équivalent natif soit par des fragments portant le ou les épitopes détectables. Il est essentiel de considérer que la valeur clinique de la CGA a été établie sur cette base.

Différents travaux sur des CGA d'origine variée ont tout d'abord démontré sa spécificité tissulaire [8-10]. Dans la plupart des cas, les auteurs ont utilisé la filtration sur gel par HPLC puis la détection par des anticorps pour aboutir à des profils combinés (séparation/immunoréactivité) très différenciés d'un extrait tissulaire ou d'un sérum à l'autre. Corti *et al.* par exemple [2] ont montré que ces profils sont non seulement différents pour une série de 3 sérums provenant de patients atteints de phéochromocytome mais qu'ils ne se superposaient pas non plus à ceux obtenus pour un extrait brut de phéochromocytome, pour une préparation de CGA purifiée ou encore pour un surnageant de culture

obtenu de la lignée de neuroblastome CHP-134. De plus, ils varient sensiblement en fonction de l'immunos dosage utilisé (dosages immunométriques, aussi appelés dosages *sandwich*, associant soit deux anticorps monoclonaux - AcM -, soit un AcM et un AcP). En dépit du fait que des formes agrégées de la CGA ont déjà été décrites, les auteurs ont pu exclure toute polymérisation en dosant les échantillons avec des systèmes homologues (avec des anticorps dont l'épitope n'est pas répétitif). En réalité ce phénomène peut être expliqué par la migration anormale de la CGA et de ses fragments qui, compte tenu de leurs particularités structurales (caractère acide des polypeptides, organisation en *random coil*), ne peuvent être séparés de manière cohérente en fonction de leur masse moléculaire. L'étude de Kirchmair *et al.* [10] décrit une disparité voisine des profils suivant l'extrait tissulaire considéré, vue au travers du dosage d'un peptide correspondant à la séquence 366-391 de la CGA bovine (GE25).

Les recherches de Metz-Boutigue *et al.* ont donné beaucoup plus de consistance au phénomène de la protéolyse [11]. L'analyse du contenu de cellules chromaffines bovines en culture et de leurs sécrétions dans le milieu a d'abord abouti à l'identification de 12 sites principaux de protéolyse. Elle a également permis de les rapprocher de la production de fragments déjà décrits chez d'autres espèces (pancréastatine, β -granine, chromostatine), même s'il semble que ces peptides fassent partie de séquences plus grandes qui subissent une protéolyse ou une maturation complémentaires au niveau extramatriciel. La confirmation d'une protéolyse récurrente sur les extrémités amino- et carboxy-terminales est une base de travail essentielle dans l'élaboration d'un dosage se rapprochant au mieux des essais de référence par compétition. Méthodologiquement, la compétition vis-à-vis d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine native ou contre un peptide de synthèse demeure probablement une solution de première approche. Elle n'est pas sans inconvénient, notamment en raison de la nécessité de

produire un traceur hautement purifié, procédure délicate à industrialiser (CGA radiomarquée). De plus, la sensibilité de ce type de dosage est parfois limitée et sa dynamique réduite par rapport à un format immunométrique, et ces performances moindres sont éventuellement accentuées par l'utilisation d'anticorps anti-peptide possédant une affinité plus élevée pour l'immunogène originel que pour la protéine native. Enfin la pertinence du choix du peptide prend tout son sens en raison de la complexité de la protéolyse de la CGA.

La littérature ne donne que des réponses très parcellaires sur la validation des dosages autres que par compétition. Syversen *et al.* [12] décrivent un dosage enzymoimmunométrique utilisant comme phase solide et comme traceur un même AcP dirigé contre le fragment C-terminal de 23 kDa de la CGA humaine. Les résultats cliniques semblent cohérents et ont été depuis confirmés par rapport aux dosages antérieurs publiés par O'Connor entre autres [13]. En revanche, il est frappant de constater que si ce système et un RIA utilisant le même AcP sont significativement corrélés, il existe une dispersion assez importante des valeurs ainsi qu'un certain nombre de cas réellement discordants [12]. Il faut enfin souligner que la disponibilité d'un tel dosage reste conditionnée à l'élaboration d'un antisérum aux performances constantes. Les dosages développés par Corti *et al.* [9] et Bender *et al.* [14] font appel à des systèmes « mixtes » utilisant à la fois des anticorps monoclonaux et polyclonaux, ou pour Dillen *et al.* [15] à un ELISA par compétition vis-à-vis de la CGA immobilisée. Malheureusement, aucune validation ne permet d'étayer leur valeur clinique. Enfin, nous avons évoqué plus haut l'hypothèse d'un dosage d'une partie restreinte de la CGA. Lorsque le dosage par compétition de la CGA est comparé à celui, sous un format identique, de la pancréastatine (fragment 248-294), il apparaît clairement que le premier possède un pouvoir discriminant plus important entre les sujets normaux et les patients atteints de diverses pathologies endocrines et

neuroendocrines [16]. Dans ce cas, comme dans celui du dosage du peptide 344-374 proposé par Nagasawa *et al.* [17], il est en effet probable que ces fragments se trouvent dans une région de la protéine qui représente une cible privilégiée de la protéolyse, voire qui possèdent une demi-vie plus courte dans la circulation sanguine.

Le développement d'un dosage immunométrique de la CGA totale requiert une sélection précise des épitopes reconnus par les anticorps spécifiques de la protéine native

Notre approche pour le développement d'un dosage de la CGA se décline sur la base de 3 principes: (1) comme décrit précédemment, la protéolyse de la CGA intéresse de manière récurrente ses deux extrémités; (2) un format immunométrique à deux sites présente des avantages indéniables sur la compétition; (3) l'utilisation d'AcM permet un dosage reproductible [18].

Nous avons donc produit deux séries d'anticorps monoclonaux de souris, la première avec de la CGA humaine purifiée à partir de phéochromocytome, la deuxième avec de la CGA humaine recombinante produite et purifiée suivant les travaux de Aunis *et al.* [19]. Une première cartographie Biacore® a permis de déterminer que les 24 AcM produits se répartissaient en 8 familles distinctes, éventuellement subdivisible pour l'une d'entre elles [19]. La partie essentielle de cette étude a consisté à utiliser les techniques déjà décrites par Metz Boutigue *et al.* [11] afin d'identifier les épitopes reconnus par chaque groupe sur la séquence de la CGA humaine.

Brièvement, nous avons procédé à la digestion enzymatique de la protéine recombinante suivie d'une séparation par HPLC. Chacun des huit AcM représentatifs a été testé contre tous les pics élués, puis la partie aminoterminal de chaque pic a été séquencée. L'analyse a été complétée

par une vérification en spectroscopie de masse. Les résultats obtenus sont résumés dans la *figure 1*. Il est apparu qu'indépendamment de la source d'immunogène utilisée, la majeure partie des épitopes étaient distribués dans les deux tiers carboxy-terminaux de la protéine, et plus particulièrement au niveau de l'extrémité 246-439 (16 anticorps sur 24). Les séquences détectées, bien qu'étant probablement plus larges que les épitopes réels, couvrent au maximum 57 acides aminés, à l'exception de CGS32 qui se lie vraisemblablement à un site conformationnel.

Suivant nos hypothèses de départ, nous avons développé un dosage RIA avec l'anticorps le plus médian, CGS06, susceptible de piéger les fragments majeurs issus de la dégradation de la CGA. Ce dosage, validé sur une série de 46 plasmas provenant de sujets sains et 211 autres de patients atteints de tumeurs endocrines et neuroendocrines, a montré une bonne cohérence par rapport aux études déjà citées. Parallèlement, toutes les combinaisons possibles associant les 8 AcM dans un format immunométrique ont été testés sur 3 pools de sérums: normaux, phéochromocytomes et carcinoïdes intestinaux. Les combinaisons les plus discriminantes, et les mieux corrélées au dosage de référence, étaient constituées par l'appariement hétérologue des anticorps médians: CGS06 et CGS30. De plus, nous avons observé que certaines combinaisons mettant en jeu des épitopes distants, par exemple CGS06 et CGS10, ne détectaient pratiquement plus, de CGA dans les prélèvements pathologiques, alors que le niveau du pool de sérums normaux demeurait à la concentration attendue. D'autres paires, aux épitopes moins espacés, donnaient des résultats intermédiaires avec des taux de CGA encore détectables. La répartition des épitopes sur la région carboxy-terminale nous a donc paru représenter un outil approprié pour éprouver le degré de protéolyse dans cette zone. Nous avons donc élargi la série de prélèvements à 20 normaux et 39 plasmas pathologiques et testé cette population avec le RIA de référence et 3 combinaisons impliquant des épitopes plus ou moins espacés.

La *figure 2* montre les résultats obtenus avec les systèmes RIA et médian (CGS06/CGS30). L'analyse statistique du ratio pathologique/95^e percentile de la population normale par le test de Wilcoxon en échantillons appariés montre que le RIA et le test médian d'une part, et le RIA et le système CGS06/CGS04 (situation intermédiaire) d'autre part sont significativement reliés entre eux ($p < 0,0001$). En revanche, le système CGS06/CGS29, qui met en jeu la même phase solide et un traceur (CGS29) reconnaissant un épitope identique à celui de CGS10 (extrémité carboxy-terminale, 395-439), est significativement différent du RIA. Dans ce dernier cas en effet, la plupart des plasmas pathologiques (29 sur 39) ne contenait pas de CGA détectable, le système intermédiaire minimisant quant à lui le taux de faux négatifs (avec tout de même 8 échantillons substantiellement sous-dosés). Ce test a confirmé que la CGA humaine subit une protéolyse carboxy-terminale intense qui affecte particulièrement les derniers sites de protéolyse. Il a également prouvé la relative insensibilité de la partie médiane de la CGA à la protéolyse et validé par là même le développement d'un dosage immunométrique reproductible, corrélé aux dosages par compétition déjà décrits.

Sensibilité du dosage biologique de la chromogranine A

Les données actuelles concernant l'étude de patients porteurs de tumeurs neuroendocrines indiquent que la sensibilité du dosage sérique de la CGA dépend du volume tumoral mais aussi du siège de la tumeur neuroendocrine primitive. L'existence d'une sécrétion hormonale associée et sa nature biochimique influencent également les résultats du dosage [20] (*Tableau I*).

Plusieurs travaux ont retrouvé une corrélation positive entre le taux sérique de CGA et le volume tumoral. Celle-ci a été mise en évidence notamment dans l'étude des phéochromocytomes [21, 22], des cancers médullaires de la thyroïde [23], des neuroblastomes [24, 25], des cancers bronchiques à petites cellules [26,

27] et des tumeurs neuroendocrines iléales [20, 28, 29]. En revanche, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence dans les gastrinomes

[30, 31], dans lesquels la sécrétion de CGA est reliée à l'hyperplasie des cellules entéro-chromaffines gastriques secondaire à l'hypergastrinémie.

Dans notre expérience, la sensibilité de la CGA varie de 29 à 67 % lorsqu'on étudie une tumeur neuroendocrine au stade locorégional

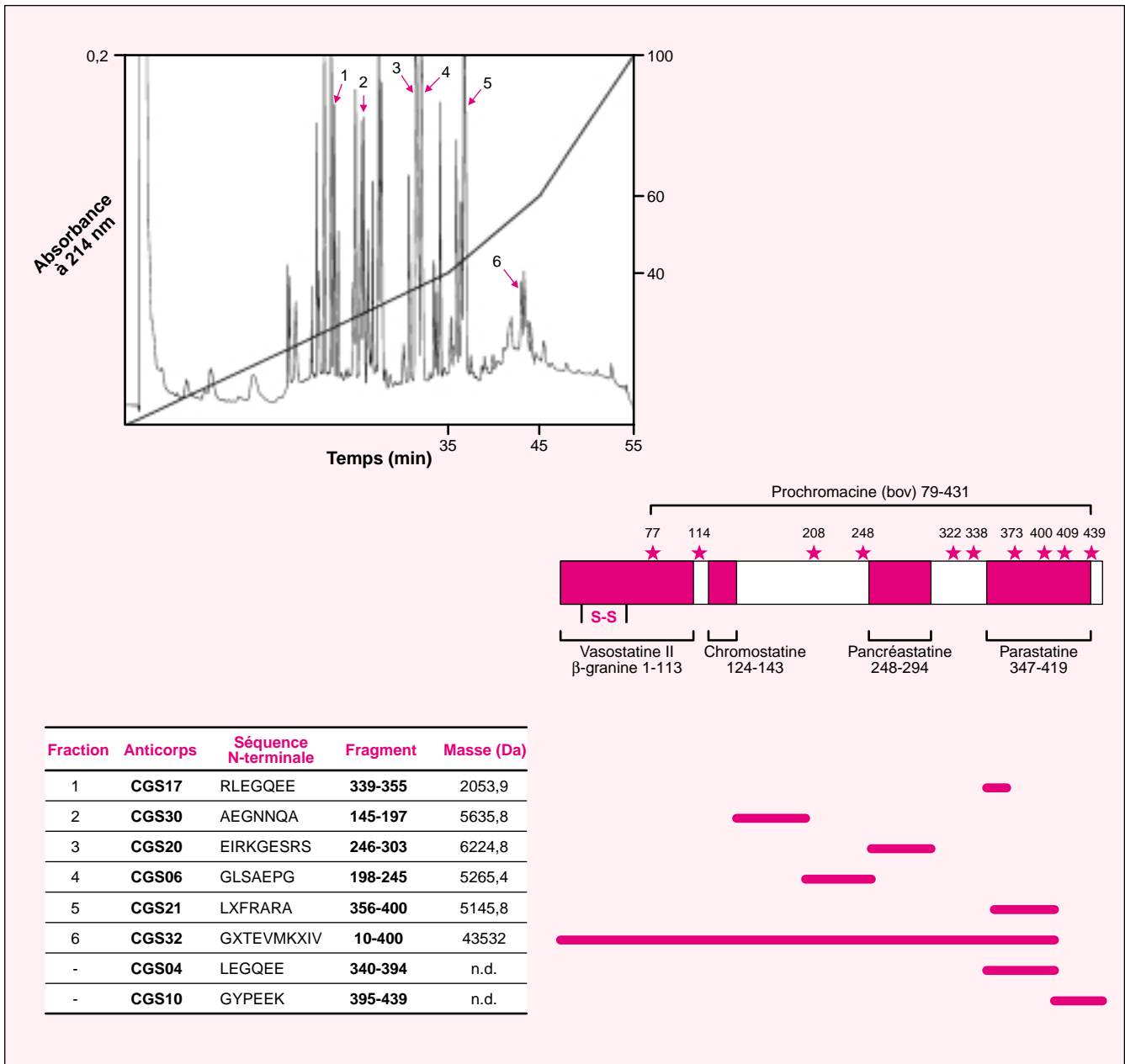


Figure 1. **Cartographie épitopique des anticorps monoclonaux anti-CGA.** L'enregistrement HPLC (en haut) montre le profil obtenu après digestion protéolytique de la CGA humaine recombinante. Les pics 1 à 6 correspondent aux différents fragments reconnus par les AcM représentatifs de chaque famille épitopique. Le tableau de gauche détaille les caractéristiques des fragments immunodétectés. La partie amino-terminale de chaque fragment a été séquencée, l'information complémentaire donnée par la spectrométrie de masse permettant de déduire la séquence complète du peptide reconnu. Le graphique de droite positionne les épitopes par rapport à la séquence de la CGA humaine et montre la prédominance des sites dans les deux tiers carboxy-terminaux de la protéine. Seul l'épitope de CGS32 n'a pu être déterminé de façon précise, laissant supposer un déterminant de nature conformationnelle. L'adressage de CGS04 et CGS10 a été effectué par western-blot puis séquençage selon la méthode décrite par Metz-Boutigue et al. [11].

ou métastatique [20]. Au sein des cancers bronchiques à petites cellules, une étude récente montre une variation de sensibilité de 27 % à 48 % en comparant des cancers bron-

chiques à envahissement locorégional ou métastatique [27].

Par ailleurs, à stade tumoral comparable, la sensibilité du dosage biolo-

gique de la CGA dépend également du siège de la tumeur neuroendocrine primitive. Les résultats comparés des données de la littérature concernant la sensibilité du dosage

Tableau I. Sensibilité et spécificité de la chromogranine A en fonction du siège de la tumeur neuroendocrine primitive.

Tumeur neuroendocrine	Méthode	Nombre de patients	Sensibilité	Spécificité	Référence
Phéochromocytome	ELISA	42	76 %	82 %	32
	RIA	15	80 %	100 %	21
	RIA	21	90 %		33
	ELISA	19	100 %		34
	RIA	9	89 %	90 %	29
	IRMA	6	77 %	68 %	20
	RIA	29	83 %	96 %	22
Paragangliome	RIA	25	8 %	90 %	29
Neuroblastome	RIA	34	91 %	100 %	24
	ELISA	11	73 %	82 %	32
Cancer médullaire de la thyroïde	RIA	13	100 %	100 %	21
	RIA	47	28 %		23
	IRMA	45	27 %		35
Adénome hypophysaire	ELISA	9	11 %		34
	RIA	31	10 %		36
Tumeur de Merkel	RIA	4	25 %	90 %	29
TNE dérivés de l'intestin antérieur**	RIA	19	79 %		37
	IRMA	59	64 %	68 %	20
CBPC***	RIA	12	75 %	100 %	21
	RIA	46	63 %		26
	RIA	15	45 %		38
	IRMA	121	52 %		39
	RIA	23	39 %	90 %	29
	IRMA	150	37 %		27
Gastrinome	RIA	9	100 %	90 %	29
	RIA	112	92 %	67 %	31
Insulinome	RIA	21	10 %	90 %	29
Pancréatique non fonctionnelle	RIA	13	69 %	90 %	29
	IRMA	23	52 %	68 %	20
TNE de l'iléon	RIA	86	87 %		37
	IRMA	24	58 %	68 %	20
TNE du rectum	IRMA	4	50 %	68 %	20
	RIA	3	100 %		37
Adénome parathyroïdien	ELISA	9	0 %		34

* La spécificité est calculée sur l'ensemble des TNE analysées dans chaque étude.

** Comprend les TNE bronchiques, laryngées, thymiques, de l'estomac, du pancréas.

*** Cancer bronchique à petites cellules.

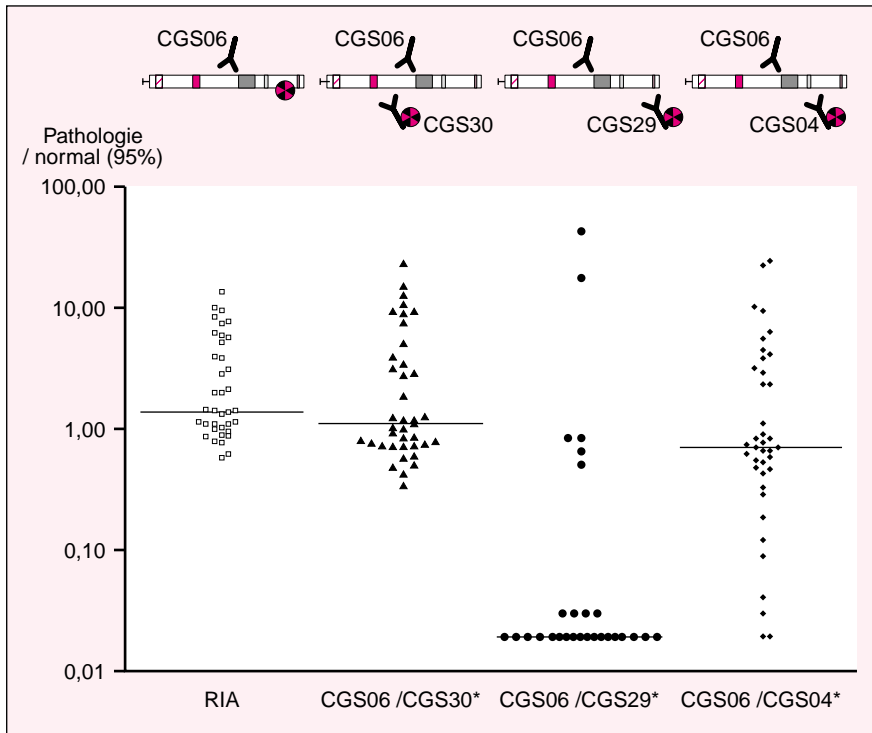


Figure 2. Comparaison de trois dosages radioimmunométriques de la CGA par rapport au dosage de référence par compétition. Le test a été réalisé en utilisant le même anticorps immobilisé, CGS06, reconnaissant la partie médiane (198-245) de la CGA. Trois anticorps d'épitopes distincts lui ont été combinés afin d'évaluer l'extension de la protéolyse de la CGA dans les prélèvements normaux et pathologiques. Les données sont exprimées en rapport de concentration d'échantillon pathologique sur le 95^e percentile de la population normale testée (n = 20). Les lignes indiquent la médiane de chaque série. La CGA n'est pratiquement plus détectable en cas de positionnement très éloigné des épitopes (système CGS06/CGS29*). On obtient une situation intermédiaire lorsque l'anticorps utilisé comme traceur se rapproche de CGS06, démontrant ainsi l'intensité de la dégradation dans le domaine C-terminal extrême (CGS06/CGS04*). Seul le système utilisant une combinaison d'anticorps médians permet un rapprochement significatif avec le système de référence par compétition.

de CGA en fonction du siège de la tumeur neuroendocrine peuvent être classés en trois groupes (Tableau I) :

- les tumeurs neuroendocrines « à forte sécrétion de CGA » : il s'agit avant tout du phéochromocytome dans lequel la sensibilité de la CGA varie entre 80 % et 100 %. Dans ce groupe, on peut également classer les neuroblastomes et certaines tumeurs neuroendocrines du pancréas, notamment les gastrinomes ;
- les tumeurs neuroendocrines « à sécrétion intermédiaire de CGA » : on peut inclure dans ce groupe les tumeurs neuroendocrines iléales et bronchiques (également appelées

tumeurs carcinoïdes), les tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles du pancréas pour lesquelles la sensibilité de la CGA varie entre moins de 60 % et 90 % en fonction des études ;

- les tumeurs neuroendocrines « à faible sécrétion de CGA » : il s'agit de tumeurs neuroendocrines pour lesquelles la sensibilité des résultats de CGA est située entre moins de 10 % et 60 %. On peut classer dans ce groupe, par ordre décroissant de sensibilité, le cancer bronchique à petites cellules, les cancers médullaires de la thyroïde, les tumeurs à cellules de Merkel, les paragangliomes, certaines tumeurs neuroendocrines du pancréas comme l'insuli-

nome, l'adénome parathyroïdien et l'adénome hypophysaire. Cette variation de sensibilité de la CGA en fonction du siège a des implications cliniques, notamment dans la prise en charge des tumeurs neuroendocrines au sein des néoplasies endocriniennes multiples de type I ou II. En effet, l'élévation significative de la CGA en cas de néoplasie endocrinienne multiple de type I doit faire évoquer une tumeur neuroendocrine fonctionnelle du pancréas, de type gastrinome, et en cas de type II la présence d'un phéochromocytome.

De plus, la sensibilité du dosage de CGA dépend de l'existence d'une sécrétion hormonale associée à la tumeur et de leur nature biochimique. Dans notre expérience, 73 % des patients chez lesquels une sécrétion hormonale de la tumeur est mise en évidence présentent une élévation des taux de CGA contre seulement 26 % en l'absence de sécrétions authentifiées [20]. De plus, il existe une corrélation positive entre la sécrétion de CGA et de certains peptides, comme la calcitonine [21, 29] et la gastrine [31], ou des dérivés amines comme la noradrénaline [22, 34] et le 5HIAA [20, 29]. Ces résultats sont cohérents avec le rôle physiologique supposé de la CGA dans la maturation des peptides intra-granulaires et dans le transport des amines biologiques. En revanche, plusieurs travaux ont montré l'absence de corrélation entre la sécrétion de CGA et la production de glycoprotéine [13, 20]. L'ensemble de ces données montre que la sensibilité du dosage biologique de la CGA, et donc son interprétation, doivent tenir compte du stade tumoral, du siège de la tumeur neuroendocrine et de l'existence de sécrétions hormonales associées. Une valeur élevée de CGA peut traduire tout aussi bien une tumeur neuroendocrine localisée sécrétante, comme dans le cas des phéochromocytomes, ou une tumeur neuroendocrine pauci-sécrétante métastatique. Dans un travail récent nous avons montré que ces deux paramètres étaient indépendamment corrélés à l'élévation de CGA [20].

Sensibilité comparée du dosage de chromogranine A et des autres sécrétions hormonales des tumeurs neuroendocrines

Les tumeurs neuroendocrines sont souvent multisécrétantes. Ainsi, l'intérêt clinique d'un nouveau marqueur biologique se définit par rapport aux sécrétions connues de chacune de ces tumeurs neuroendocrines [20, 35, 40]. Le dosage de CGA est plus sensible que celui de l'énolase spécifique du neurone (NSE), deuxième marqueur général des tumeurs neuroendocrines, dans la majorité des cas [3, 20, 28, 29]. Cependant, la NSE reste plus sensible dans le sous-groupe des tumeurs neuroendocrines à faible sensibilité en CGA, notamment les paragangliomes, les cancers bronchiques à petites cellules, les insulinomes et les tumeurs à cellules de Merkel [29]. Nos résultats montrent néanmoins que la NSE est un mauvais marqueur du suivi des tumeurs neuroendocrines bien différenciées. De plus, la NSE est un marqueur peu spécifique de tumeur neuroendocrine, libéré par nécrose cellulaire, et donc très indirectement corrélé au volume tumoral.

On peut distinguer trois groupes de tumeurs neuroendocrines en fonction de la prévalence respective de sécrétions hormonales eutopiques et/ou ectopiques.

- Les tumeurs neuroendocrines à forte prévalence de sécrétions hormonales : il s'agit notamment du phéochromocytome et du cancer médullaire de la thyroïde, dont la prévalence de sécrétion, respectivement du bloc mélanépine-normétanépine urinaire et de la calcitonine sanguine, avoisine les 100%. On peut classer dans ce groupe les tumeurs neuroendocrines pancréatiques fonctionnelles, notamment les gastrinomes. A un moindre degré, il s'agit également du cas des tumeurs neuroendocrines iléales (carcinoïdes iléaux), souvent révélées à un stade métastatique avec à ce stade 80% de tumeurs sécrétrices de sérotonine. Chez ces patients, les résultats comparés de la CGA montrent une sensibilité soit supérieure au dosage de la gastrine dans les gastrinomes [31], soit

discrètement inférieure aux marqueurs de référence, comme les mélanépine-normétanépine urinaires dosées par HPLC dans les phéochromocytomes [22, 35], soit enfin nettement inférieure en termes de sensibilité à la calcitonine dans le cas du cancer médullaire de la thyroïde [23, 35]. Enfin les résultats sont discordants en ce qui concerne la comparaison entre la CGA et le dosage de l'acide 5-hydroxyindol acétique [20, 37]. En ce qui concerne les phéochromocytomes, les gastrinomes et les tumeurs neuroendocrines iléales, le dosage biologique de CGA pourrait avoir un intérêt dans le suivi évolutif des patients.

- Les tumeurs neuroendocrines à prévalence intermédiaire de sécrétion : il s'agit des tumeurs neuroendocrines dérivées de l'intestin antérieur, notamment les tumeurs neuroendocrines bronchiques, laryngées, thymiques, pancréatiques cliniquement non fonctionnelles. Ces tumeurs sont fréquemment associées à des sécrétions multiples de sensibilités inférieures à 50% dans la plupart des cas [40]. Dans ce groupe de patients, le dosage de CGA est alors le plus sensible et est donc conseillé.

- Les tumeurs neuroendocrines à faible prévalence de sécrétion : il s'agit notamment des paragangliomes, des tumeurs neuroendocrines rectales ; dans ces cas, l'apport du dosage de CGA doit continuer à être évalué.

Ainsi, la sécrétion de CGA pourra être dans certains cas le seul marqueur biologique de tumeur neuroendocrine. La signification d'une élévation isolée d'un taux sérique de CGA reste discutée : la CGA pourrait être un marqueur biologique de sécrétions hormonales non recherchées ou indétectables par les méthodes biologiques actuelles.

Alors que la CGA est un marqueur ubiquitaire de tumeur neuroendocrine en immunohistochimie, sa sécrétion est loin d'être constante. Les faux-négatifs du dosage de la CGA pourraient s'expliquer par une hétérogénéité tissulaire des concentrations de CGA au sein de chaque tumeur neuroendocrine, ou par un mécanisme de protéolyse précoce dont on sait qu'il intervient dès le stade intragranulaire [11].

La faible sensibilité de la CGA dans plusieurs tumeurs neuroendocrines, notamment à un stade précoce de leur développement, a conduit au développement d'études concernant la chromogranine B (CGB), mais aussi la sécrétogranine II et les peptides issus de la protéolyse de la CGA, notamment la pancréastatine. Concernant la chromogranine B, une étude fondée sur une approche couplée du dosage de la CGA et de la CGB montre une amélioration de la sensibilité du test. Cependant cette amélioration reste marginale, et est essentiellement expliquée par une meilleure sensibilité dans les tumeurs hypophysaires ou les insulinomes [33, 38]. L'intérêt clinique du dosage de sécrétogranine II est limité par sa faible sensibilité comparé au dosage de la CGA, tout comme celui de la pancrastatine [17, 41, 42].

Spécificité du dosage de la chromogranine A

La CGA est un marqueur spécifique du tissu neuroendocrine mais il ne s'agit ni d'un marqueur de malignité (il peut témoigner d'un hyperplasie cellulaire [30]), ni d'un marqueur du siège des tumeurs neuroendocrines. Dans les différents travaux, sa spécificité se situe entre 67% et 100%, dépendant à la fois des groupes contrôle étudiés, mais aussi des valeurs seuils de normalité.

Plusieurs circonstances physiologiques sont susceptibles de modifier les taux de CGA, notamment des variations de posture [1], le tabac ou la grossesse [43]. Ces variations s'inscrivent cependant dans les limites de la normale. De la même façon, les stress mineurs ne modifient pas les taux de CGA sériques, alors qu'à l'inverse les stress majeurs (arrêts cardiaques), associés à une sécrétion de catécholamines d'origine médullo-surrénalienne, modifient substantiellement ces taux. Il est à noter que, pour les mêmes raisons, des variations significatives de CGA peuvent être observées lors des tests dynamiques de type hypoglycémie insulinaire [44]. L'âge et le sexe en revanche ne semblent pas intervenir dans les variations des taux sériques de CGA.

Enfin en ce qui concerne les faux-positifs du dosage de CGA, ils s'observent au cours de l'insuffisance rénale [14] et des causes d'hypergastrinémie secondaire (gastrite chronique atrophique, inhibiteurs de la pompe à protons), mais aussi chez les patients atteints d'hypertension artérielle essentielle [22, 24] ou de maladie du colon inflammatoire. En revanche, le diabète, l'insuffisance hépatocellulaire ou la maladie de Parkinson ne sont pas des causes classiques de faux-positifs [13, 43]. De la même façon, les médicaments anti-hypertensives et les chimiothérapies ne modifient pas de façon majeure les taux de CGA [43]. On peut rappeler ici une cause également importante de faux-positifs du dosage de la CGA qui est la présence d'une tumeur mixte [29]. Ces tumeurs se caractérisent par l'existence d'un double contingent cellulaire tumoral comprenant des cellules neuroendocrines. Bien que cette situation ne puisse être totalement assimilée à une situation de faux-positifs, il nous semble logique de rappeler que cette hypothèse doit être formulée de façon systématique dès lors que le diagnostic de tumeur neuroendocrine n'a pas été porté sur une pièce opératoire. Cette situation, d'individualisation relativement récente, est maintenant considérée comme commune dans de multiples tumeurs solides, comme les tumeurs prostatiques, pulmonaires, coliques et mammaires. Cependant, l'impact pronostique de ce contingent de cellules neuroendocrines pourrait être variable d'une tumeur à l'autre, péjorative en cas de tumeur prostatique, ou au contraire de meilleur pronostic en cas de tumeur mammaire.

Intérêt pronostique du dosage de la chromogranine A et suivi

Il existe un effet pronostique sur la survie des taux de CGA dans plusieurs études. Ceci a notamment été montré dans les neuroblastomes [24], les tumeurs neuroendocrines digestives et pancréatiques [37] et au sein des cancers bronchiques à petites cellules [27]. Ces résultats renforcent bien sûr l'intérêt potentiel de ce marqueur.

L'effet pronostique de la CGA pourrait être expliqué par sa corrélation au volume tumoral, mais il pourrait également s'agir d'un témoin d'agressivité. Une étude récente a en effet montré un rôle de cette glycoprotéine dans les phénomènes d'adhérence cellulaire. On peut également rappeler une étude mettant en évidence une corrélation entre le taux de CGA et un index de prolifération des tumeurs neuroendocrines [43].

Enfin, pour ce qui concerne son intérêt en tant que marqueur de suivi tumoral, les travaux ayant corrélié l'évolution des taux de CGA à l'évolution morphologique des patients restent peu nombreux [20, 25, 45]. La concordance entre l'évolution tumorale et l'évolution de CGA est bonne dans la plupart des études, notamment dans la corrélation entre la progression morphologique et les taux de CGA, sans atteindre 100 %. Ces résultats rappellent que la CGA n'est pas uniquement un marqueur de volume tumoral, mais également un marqueur de sécrétions hormonales qui peuvent évoluer indépendamment du volume tumoral notamment sous traitement par les

analogues de la somatostatine. La CGA pourrait être un marqueur de suivi plus performant que les peptides pancréatiques, et plus maniable que les dosages répétés urinaires des 24 heures dans le cas des phéochromocytomes ou des tumeurs neuroendocrines iléales. La *figure 3* illustre un cas de tumeur du pancréas dans laquelle l'évolution des taux de CGA montre une bonne corrélation avec l'évolution tumorale morphologique contrairement à celle de la NSE.

Conclusions

Le dosage biologique de la CGA a d'ores et déjà pris une place importante dans le bilan biologique de tumeurs neuroendocrines. Il s'agit du marqueur biologique qui présente le meilleur compromis sensibilité-spécificité dans la prise en charge de ces tumeurs. Nous recommandons actuellement le dosage systématique de CGA dans la prise en charge des tumeurs neuroendocrines dérivées de l'intestin antérieur (tumeurs neuroendocrines bronchiques, pancréatiques, laryngées, thymiques) mais aussi dans les tumeurs neuroen-

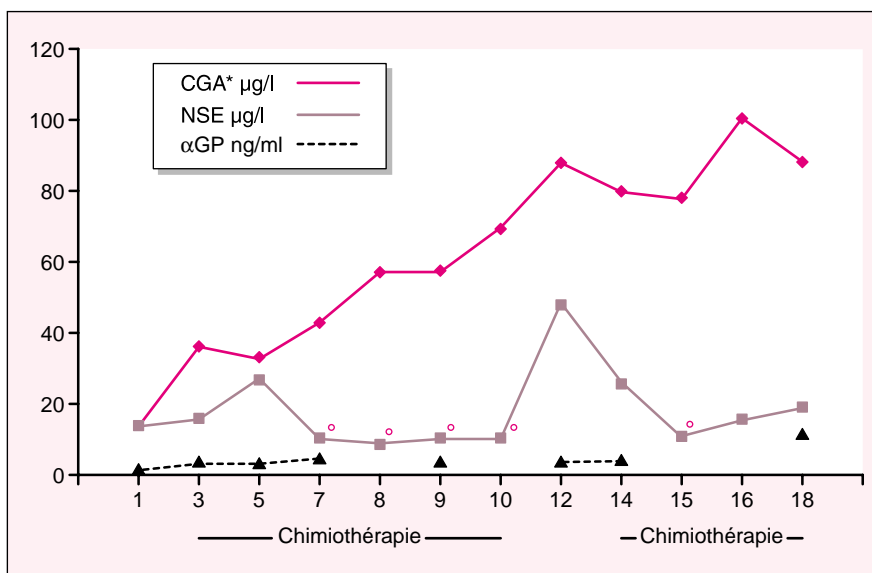


Figure 3. Évolution des taux sériques de CGA et de NSE chez une patiente présentant une tumeur neuroendocrine bien différenciée, cliniquement non fonctionnelle, du pancréas. La comparaison des résultats biologiques et du bilan morphologique montre pour la CGA une évolution comparable. En revanche le suivi des taux de NSE montre une fluctuation non corrélée à l'évolution morphologique tumorale. * Les taux de CGA sont divisés par un facteur dix. ° Valeur normale.

doctrines considérées comme peu sécrétantes, comme les paragangliomes ou les tumeurs neuroendocrines rectales, dans lesquelles cependant les évaluations doivent être poursuivies. En ce qui concerne l'impact du dosage biologique de la CGA dans les tumeurs neuroendocrines iléales et les phéochromocytomes, la CGA peut être considérée comme un dosage maniable, utile pour le suivi de ces patients, cependant d'autres travaux sont nécessaires pour valider une telle approche. Dans le cas du cancer médullaire de la thyroïde et des adénomes hypophysaires, des adénomes parathyroïdiens sporadiques, le dosage de CGA doit être abandonné. Les progrès méthodologiques du dosage biologique de la CGA ont permis d'obtenir des méthodes de dosage fiables, possédant à l'heure actuelle une bonne spécificité. Comme on l'a vu, la sensibilité du dosage de CGA est variable en fonction du siège de la tumeur neuroendocrine primitive, du volume tumoral, et de la présence de sécrétions associées. Des travaux de recherche concernant la protéolyse de la CGA pourraient dans le futur apporter des progrès sur ce plan. De la même façon, de nouveaux travaux sont souhaitables afin de valider l'apport de ce marqueur dans la prise en charge des tumeurs mixtes.

Ainsi, l'intérêt clinique du dosage biologique de CGA progresse, parallèlement à la compréhension de son rôle en physiopathologie, notamment dans la régulation autocrine et paracrine des sécrétions hormonales, et des mécanismes d'adhérence cellulaire ■

RÉFÉRENCES

- O'Connor DT, Bernstein KN. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1984; 311 : 764-70.
- Wiedenmann B, Huttner WB. Synaptophysin and chromogranins/secretogranins – widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis? *Virch Arch B Cell Pathol* 1989; 58 : 95-121.
- Baudin E, Ducreux M, Sabourin JC, et al. Les tumeurs neuroendocrines gastro-entéropancréatiques. *Endocrinologie* 1999; 1 : 165-74.
- Smith AD, Winkler H. Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J* 1967; 103 : 483-92.
- O'Connor DT, Frigon RP, Sokoloff RP. Human chromogranin A. Purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma. *Hypertension* 1984; 6 : 2-12.
- Lloyd VD, Wilson BS. Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science* 1983; 222 : 628-30.
- Wilson BS, Lloyd RV. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1984; 115 : 458-68.
- Deftos LJ, Gazdar AF, Hogue-Angeletti R, Mullen PS, Burton DW. Distinct patterns of chromogranin A-related species can be demonstrated in endocrine cells. *Bone Miner* 1990; 9 : 169-78.
- Corti A, Gasparri A, Chen FX, et al. Characterisation of circulating chromogranin A in human cancer patients. *Br J Cancer* 1996; 73 : 924-32.
- Kirchmair R, Leitner B, Fischer-Colbrie R, Marksteiner J, Hogue-Angeletti R, Winkler H. Large variations in the proteolytic formation of a chromogranin A-derived peptide (GE-25) in neuroendocrine tissues. *Biochem J* 1995; 310 : 331-6.
- Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin-A-determination of cleavage sites. *Eur J Biochem* 1993; 217 : 247-57.
- Syversen U, Jacobsen MB, O'Connor DT, Ronning K, Waldum HL. Immunoassays for measurement of chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in humans: correspondence in patients with neuroendocrine neoplasia. *Neuropeptides* 1994; 26 : 201-6.
- O'Connor DT, Pandian MR, Carlton E, Cervanka JH, Hsiao RJ. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: *in vitro* stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. *Clin Chem* 1989; 35 : 1631-7.
- Bender H, Maier A, Wiedenmann B, O'Connor DT, Messner K, Schmidt-Gayk H. Immunoluminometric assay of chromogranin A in serum with commercially available reagents. *Clin Chem* 1992; 38 : 2267-72.
- Dillen L, De Block J, Van Lear L, De Potter W. Enzyme linked immunosorbent assay for chromogranin A. *Clin Chem* 1989; 35 : 1934-8.
- Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engstrom U, Lundqvist G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J Endocrinol* 1995; 144 : 49-59.
- Nagasawa S, Nishikawa Y, Jun L, et al. Simple enzyme immunoassay for the measurement of immunoreactive chromogranin A in human plasma, urine and saliva. *Biomed Res* 1998; 6 : 407-10.
- Degorce F, Goumon Y, Jacquemart L, et al. A new human chromogranin A (CGA) immunoradiometric assay involving monoclonal antibodies raised against the unprocessed central domain. *Br J Cancer* 1999; 79 : 65-71.
- Taupenot L, Remacle JE, Helle KB, Aunis D, Bader MF. Recombinant human chromogranin A: expression, purification and characterization of the N-terminal derived peptides. *Regul Pept* 1995; 56 : 71-88.
- Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, et al. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 1998; 78 : 1102-07.
- O'Connor DT, Deftos LJ. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N Engl J Med* 1986; 314 : 1145-51.
- Hsiao RJ, Parmer RJ, Takiyyuddin MA and O'Connor DT. Chromogranin A storage and secretion: sensitivity and specificity for the diagnosis of pheochromocytoma. *Medicine* 1991; 70 : 33-45.
- Blind E, Schmidt-Gayk H, Sinn HP, O'Connor DT, Raue F. Chromogranin A as tumor marker in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 1992; 2 : 5-10.
- Hsiao RJ, Seeger RC, Yu AL, O'Connor DT. Chromogranin A in children with neuroblastoma. *J Clin Invest* 1990; 85 : 1555-9.
- Wassberg E, Stridberg M, Christofferson R. Plasma levels of chromogranin A are directly proportional to tumour burden in neuroblastoma. *J Endocrinol* 1996; 151 : 225-30.
- Sobol RE, O'Connor DT, Addison J, et al. Elevated serum chromogranin A concentrations in small-cell lung carcinoma. *Ann Intern Med* 1986; 105 : 698-700.
- Drivsholm L, Paloheimo LI, Osterlind K. Chromogranin A, a significant prognostic factor in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999; 81 : 667-71.
- Giovanella L, La Rosa S, Ceriani L, Uccella S, Erba P, Garancini S. Chromogranin A as a serum marker for neuroendocrine tumors: comparison with neuron-specific enolase and correlation with immunohistochemical findings. *Int J Biol Markers* 1999; 14 : 160-6.
- Nobels FRE, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, et al. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the α -subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 : 2622-8.
- Stabile B, Howard TJ, Passaro E, O'Connor DT. Source of plasma chromogranin A, elevation in gastrinoma patients. *Arch Surg* 1990; 125 : 451-3.
- Goebel SU, Serrano J, Yu F, Gibril F, Venzon DJ, Jensen RT. Prospective study of the value of serum chromogranin A or serum gastrin levels in the assessment of the presence, extent, or growth of gastrinomas. *Cancer* 1999; 85 : 1470-83.
- Boosma F, Bhaggoo UM, Manin 't Veld AJ, Schalekamp MADH. Sensitivity and specificity of new ELISA method for determination of chromogranin A in the diagnosis of pheochromocytoma and neuroblastoma. *Clin Chim Acta* 1995; 239 : 57-63.

RÉFÉRENCES

33. Stidsberg M, Husebye ES. Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 67-73.
34. Kimura N, Miura W, Noshiro T, *et al.* Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary adenoma in comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones. *Endocr J* 1997; 44: 319-27.
35. Guignat L, Bidart JM, Nocera M, Comoy E, Schlumberger M, Baudin E. Chromogranin A and the α -subunit of glycoprotein hormones in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer* 2001 (in press).
36. Nobels FRE, Kwekkeboom W, Coopmans W, *et al.* A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, α -subunit, and chromogranin A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically nonfunctioning, α -subunit-secreting, and gonadotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 784-9.
37. Janson ET, Holmberg L, Stridsberg M, *et al.* Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. *Ann Oncol* 1997; 8: 685-90.
38. Eriksson B, Arnberg H, Öberg K, *et al.* Chromogranins-new sensitive markers for neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 1988; 7: 453-63.
39. Jonhson PWM, Joel SP, Love S, *et al.* Tumour markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 760-6.
40. Baudin E, Bidart JM, Rougier P, *et al.* Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 69-75.
41. Ischia R, Gasser RW, Fischer-Colbrie R, *et al.* Levels and molecular properties of secretoneurin-immunoreactivity in the serum and urine of control and neuroendo-

Summary

Methodological aspects and clinical value of chromogranin A assessment

Since the development of the first immunoassay for circulating chromogranin A in 1984, numbers of studies have been carried out to evaluate its clinical interest. Initially considered as a tumour marker for pheochromocytoma, Chromogranin A clinical value has been rapidly extended to most of the neuroendocrine tumours, sometimes in combination with other eutopic or ectopic secretions. These studies have also contributed to the methodological evolution of Chromogranin A assessment. First improvements were made possible by the generation of specific monoclonal antibodies anti-Chromogranin A, followed by the development of two-site immunometric assays. The aim of this review is to summarise the clinical status of Chromogranin A, particularly in terms of specificity and sensitivity for neuroendocrine tumours, and in comparison to other well-established clinical analytes. The methodological criteria related to the specificity of immunodetecting reagents for Chromogranin A and its degradation products, as well as the improvements brought to these analytical tools are also discussed in this review.

crine tumor patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 355-60.

42. Syversen U, Mignon M, Bonfils S, Kristensen A, Waldum HL. Chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in serum of gastrinoma patients. *Acta Oncologica* 1993; 32: 161-5.

43. Ferrari L, Seregni E, Martinetti A, *et al.* Chromogranin A measurement in neuroendocrine tumors. *Int J Biol Marqués* 1998; 13: 3-9.

44. Takiyuddin MA, Baron AD, Cervenka JH, *et al.* Suppression of chromogranin A release from neuroendocrine sources in man: pharmacological studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 616-22.

45. Schürmann G, Betzler M, Buhr HJ. Chromogranin A, neuron-specific enolase and synaptophysin as neuroendocrine cell markers in the diagnosis of tumours of the gastro-entero-pancreatic system. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 298-303.

E. Baudin

Institut Gustave-Roussy, 39, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

F. Degorce

CIS bio international, BP 84175, 30204 Bagnols-sur-Cèze, France.

TIRÉS À PART

F. Degorce.

5^e Colloque de la Société des Neurosciences TOULOUSE - 28-31 mai 2001

Conférences plénières

R. Hen (New York) - *Modèle génétique d'anxiété et de dépression*

F. Crépel (Paris) - *Contrôle pré-synaptique de la plasticité synaptique des synapses glutamatergiques*

P. Sokoloff (Paris) - *Du clonage vers la clinique : l'exemple du récepteur D3 de la dopamine*

M. Seagar (Marseille) - *Canaux calcium et couplage excitation/exocytose dans les terminaisons nerveuses*

Léon Tremblay (Paris) - *Rôle de la motivation dans l'action : bases neuronales et comportementales chez le primate*

F. Frackowiak (Londres) - *The anatomy of brain function or the function of brain anatomy - system level studies in humans*

J.A. Sahel (Strasbourg) - *Signification en physiopathologie des interactions entre bâtonnets et cônes rétiniens*

R. Dantzer (Bordeaux) - *Mécanismes des effets comportementaux des cytokines*

Lecture Alfred Fessard

N. Le Douarin (Nogent-sur-Marne) - *La crête neurale, clé de l'évolution des vertébrés*

12 Symposiums sur des thèmes divers - 6 séances de communications affichées...

Renseignements et inscriptions

Atout Organisation Science - 106, corniche Kennedy - 13007 Marseille

Téléphone : 04 91 52 71 24 - Télécopie : 04 91 52 93 73 - Messagerie : atoutsci@atout-org.com