

DOSAGE AU LABORATOIRE DE CHIMIE CLINIQUE DES BIOMARQUEURS CIRCULANTS ONCOLOGIQUES : LIMITES ET PERSPECTIVES

SQALLI G (1), CAVALIER E (1), LADANG A (1)

RÉSUMÉ : Dans la pratique courante, le recours des cliniciens aux biomarqueurs circulants oncologiques est presque indissociable de la prise en charge des patients cancéreux. Cependant, l'interprétation des résultats n'est pas toujours aisée. Elle est, en effet, plus spécifique à la médecine de laboratoire faisant intervenir des notions d'ordres péri-analytiques ainsi que celles de sensibilité et spécificité analytiques. Comme il a été démontré par le passé, le développement de nouvelles techniques d'analyses a permis d'abaisser le seuil de sensibilité analytique, ou encore, l'implémentation de nouveaux biomarqueurs; cette observation se vérifierait encore aujourd'hui. La spectrométrie de masse, le dosage des microARN, ou encore le Single Molecule Array (SiMoA) sont des méthodes d'analyse récentes présentant de très bonnes performances analytiques qui pourraient contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients cancéreux.

MOTS-CLÉS : *Biomarqueurs tumoraux - Interprétation - Limites - Perspectives - Single molecule array*

CLINICAL CHEMISTRY LABORATORY ASSAY OF CIRCULATING ONCOLOGY BIOMARKERS : LIMITATIONS AND PERSPECTIVES

SUMMARY : In current practice, the use of circulating oncological biomarkers by clinicians is almost inseparable from cancer patients management. However, the interpretation of the results is not always easy because it is more specific to laboratory medicine and involves notions of peri-analytical orders as well as analytical sensitivity and specificity. In the past, the development of new analytical techniques improved the analytical sensitivity or allowed the implementation of new biomarkers; this observation would still be true today. Mass spectrometry, microRNA assay, or Single Molecule Array (SiMoA) are recent analytical developments with very good analytical performances that could contribute to the improvement of cancer patient management.

KEYWORDS : *Tumor biomarkers - Interpretation - Limitations - Perspectives - Single molecule array*

INTRODUCTION

En 1847, la précipitation de protéines à partir d'urine acidifiée et portée à ébullition a permis de mettre en évidence la protéine de Bence-Jones qui deviendra le premier marqueur tumoral utilisé en clinique (1). Un siècle plus tard, c'est l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) qui est mis en évidence par une technique d'immunodiffusion réalisée sur gel (2). Aujourd'hui, la quantification des biomarqueurs circulants au laboratoire de chimie clinique se réalise désormais par l'intermédiaire de dosages immunologiques, le plus souvent automatisés, et de la spectrométrie de masse pour les laboratoires les plus spécialisés.

Dans la pratique courante, les cliniciens font appel aux marqueurs tumoraux dans le cadre de screening, diagnostic, pronostic, monitoring thérapeutique, ou encore dans la détection de récidives. Dans ce contexte, différentes recommandations (guidelines) proposées par la «European Society for Medical Oncology»

(ESMO) ou la «National Comprehensive Cancer Network» (NCCN) peuvent être utilisées comme références.

Cependant, plusieurs considérations sont à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats des dosages de ces biomarqueurs. Dans cet article, nous ferons un rappel de différentes notions essentielles pour une interprétation correcte du résultat de ces biomarqueurs. Nous évoquerons également les nombreuses nouvelles approches qui sont en cours d'évaluation et qui pourraient être considérées comme un réel espoir dans l'implémentation de nouveaux biomarqueurs, y compris des marqueurs tumoraux. Ainsi, le laboratoire de chimie clinique pourrait contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients oncologiques.

SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET VALEURS PRÉDICTIVES

Le marqueur tumoral idéal devrait être détectable uniquement en cas de tumeur et absent de la population saine, c'est-à-dire qu'il devrait avoir une sensibilité et une spécificité atteignant les 100 %. Par ailleurs, il doit être facilement accessible, sur un prélèvement sanguin ou urinaire, et son dosage doit être réalisable de manière simple, reproductible et peu coûteuse (3).

(1) Service de Chimie clinique, CHU Liège, Belgique.

Pour interpréter correctement les biomarqueurs circulants, la maîtrise des notions de sensibilité et de spécificité qui sous-tendent celles de valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) est essentielle.

Tout d'abord, il convient de distinguer la sensibilité «analytique» de la sensibilité «clinique». La sensibilité analytique correspond à la plus petite valeur quantifiable analytiquement avec une précision acceptable. La sensibilité analytique du dosage de la thyroglobuline a, par exemple, été améliorée au fil des années, passant d'un seuil de quantification d'une valeur < 1,0 µg/l pour les dosages «classiques» à une valeur < 0,05 µg/l pour les dosages dits ultrasensibles. Plus le seuil de sensibilité analytique de la thyroglobuline est bas (pour une spécificité donnée), plus élevée est la probabilité qu'une thyroglobuline indétectable témoigne de l'absence de tissu thyroïdien. Cette mesure de thyroglobuline ultrasensible est primordiale dans un contexte post-thyroïdectomie ou dans le cadre d'une récurrence de cancer thyroïdien (4, 5). Il faut cependant savoir qu'un test possédant une bonne sensibilité analytique ne possède pas nécessairement une bonne sensibilité diagnostique.

Dans le même ordre d'idée, il faut distinguer la spécificité analytique de la spécificité clinique. La spécificité analytique fait référence à la capacité d'un test à mesurer et discriminer dans un échantillon l'analyte recherché plutôt qu'un autre, alors que la spécificité diagnostique est la probabilité qu'un individu sain soit considéré comme négatif par le test utilisé (6). Autrement dit, un test possédant une spécificité diagnostique élevée identifiera rarement les sujets sains comme étant malades.

Les sensibilités et spécificités cliniques sont établies sur des populations définies cliniquement comme étant malades et saines, respectivement. Les VPP et VPN intègrent, en plus, la notion de prévalence de la pathologie au sein d'une population donnée, constituée d'individus malades et sains (Tableau I).

La VPP correspond à la probabilité qu'un patient pour qui un résultat positif est trouvé, soit réellement atteint de la pathologie (VP). La VPN indique, pour une spécificité et une sensibilité données, les chances qu'un test, lorsqu'il est négatif, soit réellement négatif (VN) (et non faussement négatif ou FN). Ainsi, plus la prévalence d'une maladie au sein d'une population sera importante, plus la VPP sera élevée; à l'inverse, plus la maladie est rare, plus la VPP sera petite, et donc, associée à plus de faux positifs (FP) (7).

En pratique clinique quotidienne, la sensibilité et la spécificité particulièrement faibles des biomarqueurs circulants, combinées à la relativement faible prévalence des pathologies tumorales au sein de la population, ne permettent pas leur utilisation comme outils de screening de ces pathologies à l'échelle de la population.

Afin d'illustrer le propos, prenons l'exemple du CA 19-9, considéré comme étant le marqueur tumoral de référence dans le cancer du pancréas. La sensibilité et la spécificité du CA 19-9 sont de 81 et 90 %, respectivement, à un seuil de 37 kU/l. Le nombre de nouveaux cas de cancers du pancréas en Belgique est estimé à 1.500 par an. Si l'on considère que la province de Liège compte 1 million d'habitants et la Belgique 11 millions, il devrait statistiquement «apparaître» 136 cas de cancer du pancréas par an dans notre province. Imaginons que nous procédions au screening de tous les individus de plus de 50 ans de la province, soit 500.000 personnes avec un dosage sérique de CA 19-9 pour identifier et traiter au plus vite ces 136 nouveaux cas. Nous avons donc 136 malades et 499.864 individus sains. Au vu de la sensibilité de notre kit (81 %), 110 malades présenteront un résultat positif (= VP) et donc 26 malades présenteront un résultat négatif (= FN). Au vu de la spécificité du kit (90 %), 449.878 sujets sains recevront un résultat négatif (= VN) alors que 49.986 sujets présenteront un résultat erronément positif (= FP). Pour un individu donné, la probabilité qu'il soit réellement malade si son résultat est positif (= VPP) sera donc $110/(110+49.986) \times 100$, soit 0,21 %.

		Patients malades	Patients non malades	
Test diagnostique	Positif	Vrais positifs (VP)	Faux positifs (FP)	$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$
	Négatif	Faux négatifs (FN)	Vrais négatifs (VN)	$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$
		$Sensibilité = \frac{VP}{VP + FN}$	$Spécificité = \frac{VN}{VN + FP}$	

Tableau I. Formules de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives

Tableau II. Calcul du LSC (Least Significance Change) des marqueurs tumoraux les plus fréquemment utilisés en routine au CHU de Liège avec la méthode Abbott Alinity. Selon la formule $2,77 \times \text{RACINE}(CV_A^2 + CV_I^2)$

Marqueurs tumoraux CVA (%)	CV_A (%)	CV_I (%)	LSC (%)
Alpha-foetoprotéine	2,7	26,7	74,3
Cancer antigen 125	2,0	13,1	36,7
Cancer antigen 19-9	5,5	22,5	64,2
Cancer antigen 15-3	3,9	6,1	20,1
Antigène carcino-embryonnaire (CEA)	4,0	17,9	50,8
Prostate-Specific Antigen (PSA)	4,3	6,8	22,2
Thyroglobuline	3,8	15,1	43,1
Neuron Specific Enolase (NSE)	2,0	10,9	30,7
HE4	2,4	9,7	27,7

On pourrait, bien sûr, augmenter le cut-off à 100 kU/l. Ceci augmenterait la spécificité du test à 98 %, mais au détriment de la sensibilité, qui passerait à 68 %. En faisant cela, nous obtiendrions 92 VP, 44 FN, 489.867 VN et 9.997 FP. La VPP deviendrait donc $92/(92+9.997) \times 100$, soit 0,91 %, ce qui reste tout à fait inacceptable.

DIFFÉRENCE CRITIQUE

Si les biomarqueurs tumoraux circulants peuvent difficilement être utilisés comme outils de screening au sein d'une population, ils sont beaucoup plus utiles dans le suivi des patients. À cette fin, il faut, dès lors, faire appel à un autre élément important, bien que relativement méconnu, pour l'interprétation des résultats. Il s'agit de la différence critique, également appelée le «Least Significant Change» (LSC). Le concept de LSC permet de déterminer si la variation observée entre deux résultats chez un même patient est biologiquement significative, avec une probabilité donnée (souvent de 95 %). Le LSC tient compte de deux paramètres, le coefficient de variation analytique (CV_A) de l'analyse et le coefficient de variation intra-individuelle (CV_I) du paramètre; ce dernier correspond à la variabilité biologique «naturelle» de ce paramètre autour d'un «set-point» homéostatique chez un individu sain. Le LSC permet

de déterminer, au cours du suivi d'un patient, si un résultat est biologiquement significativement différent du résultat antérieur (8, 9).

La valeur du CV_I de la plupart des paramètres peut être trouvée sur internet dans la database de la «European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine» (<http://biologicalvariation.eu>). Le CV_A , quant à lui, est propre à la performance analytique de chaque analyte et de chaque laboratoire. La formule pour calculer la différence critique est la suivante :

$$LSC = \sqrt{2} \times 1,96 \times \sqrt{(CV_A^2 + CV_I^2)}$$

Le **Tableau II** présente, pour la plupart des biomarqueurs tumoraux utilisés en routine au CHU de Liège, les valeurs de CV_I , de CV_A et le LSC. Ainsi, par exemple, pour objectiver une diminution biologiquement significative du CA 15-3 utilisé dans le suivi après traitement du cancer du sein, il faudrait observer un décretement minimum de 20,1 %. Parfois, le CV_A n'est pas connu par le clinicien. De manière générale, il doit être largement inférieur au CV_I et il est possible de le négliger.

La formule simplifiée du LSC devient alors :

$$LSC = \sqrt{2} \times 1,96 \times CV_I, \text{ soit } LSC \sim 3 \times CV_I \text{ (10)}$$

BIOMARQUEURS CIRCULANTS : CONSIDÉRATIONS PÉRI-ANALYTIQUES

Le manque de standardisation des méthodes de dosage peut impacter significativement la prise en charge des patients. Si de nombreux efforts de standardisation sont promus par la «International Federation of Clinical Chemistry» (IFCC), ils ne concernent que très peu les biomarqueurs tumoraux circulants pour la plupart desquels il n'existe ni standard international, ni méthode de référence. L'adaptation des mêmes anticorps sur des plateformes analytiques différentes peut aussi entraîner des différences de résultats significatives, comme c'est, par exemple, le cas pour le CA 19-9. Dans ces conditions, il semble avisé de conseiller que les patients soient suivis par le même laboratoire ou, à tout le moins, par la même méthode de dosage. À cette fin, les laboratoires de biologie

clinique devraient signaler, sur leurs protocoles, la méthode de dosage utilisée.

Comme tous les autres dosages par immunoassay, le dosage des marqueurs tumoraux peut être affecté par des interférences analytiques. Les anticorps humains anti-animaux, également appelés anticorps hétérophiles ou «HAMA», peuvent donner des résultats faussement élevés et inquiéter les médecins et les patients à mauvais escient. Plusieurs méthodes permettent de mettre en évidence ce type d'interférences dont, notamment, la confirmation à l'aide d'une seconde méthode (quand c'est possible) ou bien la neutralisation de ces anticorps interférents par diverses méthodes (tubes HBT pour «Herophilic Blocking Tubes», précipitation au polyéthylène glycol,...). Le dialogue clinicien-biologiste est essentiel pour faire face à ce genre de situation.

Enfin, certains marqueurs, comme par exemple la NSE, seront particulièrement sensibles à l'hémolyse, même non perceptible à l'œil. Il conviendra donc de vérifier au spectrophotomètre la présence d'une hémolyse devant tout résultat élevé de NSE.

Actuellement, les immunodosages sont les tests les plus utilisés pour détecter les biomarqueurs dans le sang, malgré leur manque de sensibilité pour détecter des concentrations d'analytes dans des valeurs très basses. Moins de 10 % des 4.000 protéines sécrétées dans le sang sont mesurables de manière fiable par ce type de dosages (11). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle seule une partie des protéines est dosable nous laisse penser que d'autres biomarqueurs médicalement pertinents peuvent être présents, notamment à de très faibles concentrations. Aussi, en l'absence de volonté visant à améliorer la détection de biomarqueurs circulants dont les marqueurs tumoraux, le seuil de sensibilité analytique constitue alors, *de facto*, une limite dans les approches diagnostique et thérapeutique.

BIOMARQUEURS CIRCULANTS : PERSPECTIVES

Les publications sur Pubmed portant sur les «marqueurs tumoraux» étaient d'environ 6.000 en 1980, alors qu'elles atteignent désormais plus de 350.000 en 2021. Paradoxalement, le nombre de marqueurs tumoraux utilisés dans la pratique courante demeure stable. Seuls quelques nouveaux marqueurs ont été introduits en routine depuis les dernières décennies (1).

Les approches de screening de type «omic» sont en partie responsables de l'essor de la découverte de nouveaux biomarqueurs cancéreux. La protéomique, notamment, consiste à mesurer, à un temps t , l'ensemble des protéines dosables dans un échantillon de manière à établir le protéome. Le protéome n'est pas figé. Il dépend, entre autres, du patient, de sa pathologie, du type d'échantillon,... Si l'on compare des sujets sains et des patients atteints d'un cancer, on peut donc identifier des protéines différemment exprimées. Ces protéines peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs potentiels. De même, la métabolomique qui étudie l'ensemble des métabolites tels que les sucres, les acides gras ou les acides aminés, est également utilisée pour l'identification de nouveaux biomarqueurs.

Les études protéomiques et métabolomiques sont réalisées par des techniques de spectrométrie de masse à haute résolution et/ou de résonance magnétique nucléaire (RMN). De nos jours, ces techniques de screening fournissent de très grandes quantités de résultats et la difficulté de ce genre d'étude, ne réside parfois plus dans la génération des résultats, mais bien dans leur interprétation. C'est pourquoi ces approches de screening doivent toujours être couplées à des études ciblées qui confirment les observations par des dosages spécifiques de ces potentiels biomarqueurs. Ces dosages ciblés peuvent également être réalisés par spectrométrie de masse, mais les nombreuses étapes pré-analytiques et le manque d'automatisation limitent leur emploi à large échelle.

Dès lors, les technologies d'immunoassay automatisables ou semi-automatisables gardent toute leur place dans un laboratoire. Ainsi, de nouvelles approches innovantes à la sensibilité améliorée sont en cours d'évaluation. Tel est le cas de la technologie Single Molecule Array (SiMoA) de Quanterix, peut-être la plus prometteuse, qui a pu démontrer une sensibilité analytique 1.000x supérieure aux ELISA classiques, permettant ainsi de mesurer des concentrations subfemtomolaires (12). Son principe de fonctionnement repose sur une technique d'immunoassay, c'est-à-dire que cette technique utilise un anticorps de révélation couplé à une enzyme dont le substrat est un chromogène. Cependant, la singularité de cette technologie repose sur la détection du signal émis. En effet, la détection se fait par l'intermédiaire d'un système de puits de taille subfemtométrique pouvant contenir une (et une seule !) bille paramagnétique sur laquelle se fixent les complexes immuns. Pour les concentrations les plus faibles, c'est donc la fraction des micro-puits positifs (fluorescents)

qui est mesurée (et non plus la quantité de lumière diffusée dans le milieu). C'est ce signal qui sera mesuré et converti afin d'obtenir, *in fine*, la concentration de l'analyte mesuré (11). Cette technologie innovante dont s'est doté le service de chimie clinique du CHU de Liège, génère de grands espoirs quant à la possibilité de doser, en routine, les biomarqueurs jusqu'alors indosables au niveau sérique.

Comme discuté précédemment, une augmentation de sensibilité analytique n'est pas requise pour l'ensemble des biomarqueurs du cancer. Néanmoins, deux exemples concrets où la sensibilité analytique de la technologie SiMoA prend toute son importance peuvent être cités.

Premièrement, les biomarqueurs qui, pour le moment, sont utilisés au niveau histologique (via des biopsies tissulaires) pourraient devenir quantifiables au niveau sanguin (biopsies liquides). Dès lors, ces marqueurs deviendraient beaucoup moins invasifs. Prenons l'exemple de PD-L1 qui, pour le moment, est un marqueur histologique prédictif de la réponse aux immunothérapies anti-PD1 et anti-PD-L1 dans le cancer du poumon non à petites cellules (13). Il a été suggéré que son dosage plasmatique pourrait être prédictif de la réponse au traitement par nivolumab (14). Un dosage plasmatique par une méthode ultrasensible de PD-L1 prend, dès lors, tout son sens et ce, avec l'espoir de pouvoir réaliser un monitoring thérapeutique sans passer par la biopsie.

Un second exemple de l'intérêt que peuvent revêtir les technologies ultrasensibles pourrait être celui du PSA (Prostatic Specific Antigen). En effet, pour ce biomarqueur dont l'expression protéique disparaît lors de l'ablation totale de la glande prostatique, un abaissement du seuil de détection permet une détection plus précoce des rechutes, voire une adaptation du suivi de la pathologie en fonction du taux résiduel (15, 16).

Les protéines ne sont pas les seules molécules qui peuvent être envisagées comme biomarqueurs oncologiques. Ainsi, nous avons déjà évoqué les études métabolomiques qui cherchent à définir de nouvelles cibles à travers les métabolites générés par notre corps. Les ARN circulants suscitent également de grands espoirs. Les ARN circulants, et plus particulièrement les microARNs, présentent l'avantage d'avoir une stabilité acceptable dans les fluides biologiques grâce, notamment, à leur transport sous forme encapsulée. Leur seconde force est la possibilité de les mesurer en «panel» par les techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitatives. À l'heure actuelle, un seul panel de microARNs a été approuvé par la FDA

(Food and Drug Administration) américaine dans le cadre de l'identification des tumeurs thyroïdiennes. Malheureusement, ce panel n'est plus disponible car la société qui l'a développé a fait faillite. Ce panel a néanmoins prouvé qu'il était possible de développer des approches onco-diagnostiques basées sur les microARNs.

CONCLUSION

Le dosage du biomarqueur tumoral est incontournable dans la prise en charge du patient cancéreux. Son interprétation requiert la bonne compréhension des notions de sensibilité et spécificité analytiques et diagnostiques, ainsi que la notion, moins connue, de différence critique. Cependant, les marqueurs tumoraux actuels, bien qu'ils présentent une utilité certaine, sont souvent limités dans leur interprétation à cause de leur manque de spécificité et/ou de sensibilité diagnostique, mais également, parfois, par manque de sensibilité analytique. Le développement de nouvelles techniques de dosage, plus sensibles du point de vue analytique, devrait participer à l'implémentation de nouveaux biomarqueurs, avec comme objectif d'améliorer la prise en charge du patient grâce à une médecine toujours plus personnalisée. En se dotant du SiMoA, le service de chimie clinique du CHU de Liège se positionne sur l'avenir des biomarqueurs tumoraux, mais également sur les nouveaux biomarqueurs au sens large, comme par exemple pour la détection précoce de la maladie d'Alzheimer au travers du dosage de marqueurs sériques (17).

BIBLIOGRAPHIE

1. Nader Rifai. Tumor Markers. In : Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics 6th Edition. 2017;436-78.
2. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*. 1965;122:467-81.
3. Duffy MJ, Sturgeon CM, Söletormos G, et al. Validation of new cancer biomarkers : a position statement from the European Group on Tumor Markers. *Clin Chem* 2015;61:809-20.
4. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167-214.
5. Nakabashi CCD, Kasamatsu TS, Crispim F, et al. Basal serum thyroglobulin measured by a second-generation assay is equivalent to stimulated thyroglobulin in identifying metastases in patients with differentiated thyroid cancer with low or intermediate risk of recurrence. *Eur Thyroid J* 2014;3:43-50.
6. Saah AJ, Hoover DR. "Sensitivity" and "specificity" reconsidered : the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Ann Intern Med* 1997;126:91-4.

7. Nendaz MR, Perrier A. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique. *Rev Mal Respir* 2004;**21**:390-3.
8. Cavalier E. Approche globale et personnalisée des biomarqueurs. *Rev Med Liege* 2015;**70**:257-61.
9. Cielniaszek N, Chapelle JP, Collette J, et al. Des résultats d'analyses à prendre avec des "pincettes" : quelques pièges de l'interprétation en biologie clinique. *Rev Med Liege* 2002;**57**:343-51.
10. European Federation of clinical chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) [Internet]. Available from: <https://biological-variation.eu/>
11. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, et al. The SiMoA HD-1 analyzer : a novel fully automated digital immunoassay analyzer with single-molecule sensitivity and multiplexing. *J Lab Autom* 2016;**21**:533-47.
12. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*, 2010;**28**:595-9.
13. Ilie M, Hofman V, Dietel M, et al. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry : challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch* 2016;**468**:511-25.
14. Costantini A, Julie C, Dumenil C, et al. Rôle pronostique et prédictif du PD-L1 plasmatique dans les cancers bronchiques non à petites cellules de stade avancé traités par nivolumab. *Rev Mal Respir* [Internet]. 2018;**35**:A62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmr.2017.10.127>
15. Lepor H, Cheli CD, Thiel RP, et al. Clinical evaluation of a novel method for the measurement of prostate-specific antigen, AccuPSATM, as a predictor of 5-year biochemical recurrence-free survival after radical prostatectomy : results of a pilot study. *BJU Int* 2012;**109**:1770-5.
16. Cookson MS, Aus G, Burnett AL, et al. Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer : the American Urological Association Prostate Guidelines for localized prostate cancer update panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *J Urol* 2007;**177**:540-5.
17. Li D, Mielke MM. An Update on Blood-Based Markers of Alzheimer's Disease Using the SiMoA Platform. *Neuro Ther* [Internet]. 2019;**8**:73-82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40120-019-00164-5>.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr G. Sqalli, Service de Chimie clinique, CHU Liège, Belgique.
Email : gsqalli@chuliege.be