

Le dosage de l'inuline : mise au point

Measurement of inulin: development

Pierre Delanaye¹
Marie Souvignet²
Laurence Dubourg³
Lise Thibaudin²
Nicolas Maillard²
Jean-Marie Krzesinski¹
Etienne Cavalier⁴
Christophe Mariat²

¹ Service de néphrologie-dialyse-transplantation rénale, Université de Liège, CHU Sart Tilman, Liège, Belgique
<pierre_delanaye@yahoo.fr>

² Laboratoire d'explorations rénales, Université Jean Monnet, Hôpital Nord, Saint-Etienne, France

³ Explorations rénales et métaboliques, Hospices Civils de Lyon, Université Lyon 1, Inserm U820, Lyon, France

⁴ Service de chimie médicale, Université de Liège, CHU Sart Tilman, Liège, Belgique

Résumé. L'inuline, polymère de fructose, reste le marqueur de référence du débit de filtration glomérulaire (DFG). Popularisé par les études de Smith et Shannon, son dosage n'en demeure pas moins complexe et sujet à des interférences dont celle du glucose est la plus importante. Il existe deux grands types de dosages de l'inuline : les méthodes de dosage « acide » et enzymatiques. Le dosage « acide » consiste en un dosage colorimétrique du fructose obtenu après hydrolyse de l'inuline en milieu très acide. Le dosage du fructose englobe différentes méthodes de dosage dont la plus utilisée est la réaction à l'anthrone. Toutes ces méthodes présentent des interférences au glucose. Différentes méthodes « enzymatiques » ont été décrites au cours du temps. Celles-ci apparaissent plus précises et sans doute moins sujettes aux interférences même si peu d'études comparatives sont disponibles. Plusieurs auteurs ont également développé des dosages de type CLHP. Cette méthode spécifique et précise demeure cependant moins adaptée à la routine. Ainsi, si l'utilisation de l'inuline comme marqueur de référence n'est pas remise en cause, son dosage reste délicat, sujet aux interférences et à une certaine interprétation. Des études supplémentaires restent nécessaires pour valider analytiquement et comparativement les techniques de dosage de l'inuline.

Mots clés : inuline, débit de filtration glomérulaire, interférences

Abstract. Inulin clearance is still considered as the gold standard method to measure glomerular filtration rate. This method has been proposed in thirties by Smith and Shannon but the inulin measurement method still remains complex. Interferences, notably with the glucose, must also be considered. Two main methods have been proposed to measure inulin both in urine and plasma: "acid" or enzymatic methods. "Acid" methods are colorimetric. Fructose is actually measured after inulin hydrolysis in acid milieu. Different methods have been described to measure fructose. Among these methods, the measurement using anthrone is the most popular. Several enzymatic methods have also been published. These have more precision and the interference with glucose is probably less even if relatively few studies are available. HPLC methods for inulin measurement have also been described. This method is specific and accurate. While inulin is an unquestioned reference method for glomerular filtration rate, its measurement in urine and plasma remains tricky and at risk of interferences. Additional trials seem necessary to analytically validate and compare all the methods available on the market.

Key words: inulin, glomerular filtration rate, interferences

Article reçu le 15 septembre 2010,
accepté le 26 novembre 2010

L'inuline est le marqueur considéré, encore aujourd'hui et par la plupart des scientifiques, comme la référence pour la détermination du débit de filtration glomérulaire

(DFG). En effet, ce polymère de fructose présente toutes les caractéristiques d'un marqueur exogène idéal du DFG :

1) libre au niveau plasmatique (non lié aux protéines) et entièrement filtré au niveau glomérulaire (masse moléculaire moyenne de 5 200 Da) ;

Tirés à part : P. Delanaye

2) ni sécrété, ni réabsorbé, ni métabolisé au niveau tubulaire ;
3) physiologiquement inerte et non toxique ;
4) excrétion exclusivement rénale ;
5) concentration mesurable dans le sang et les urines [1].
L'utilisation de l'inuline comme marqueur du DFG a été popularisée par les études de Smith et Shannon (ce dernier étant le premier humain chez qui le DFG a été mesuré par cette méthode en 1935 [2]). Les données collectées par ces pionniers de la physiologie rénale sont compilées dans le fameux livre de Smith publié en 1951 : « *The kidney: Structure and function in health and disease* ». Ces auteurs ont logiquement concentré leurs efforts sur les aspects les plus physiologiques de la mesure du DFG, laissant alors quelque peu de côté les difficultés inhérentes au dosage même de l'inuline. Smith ne fera qu'évoquer brièvement la mesure de l'inuline dans son livre (et pour arriver à la conclusion qu'aucun dosage n'est parfait !). Il est pourtant évident que la mesure de l'inuline dans le sang et les urines est loin d'être simple et est sujette à interférences dont la plus importante est celle concernant le glucose. Un dosage marqué a bien été proposé (inuline marquée au ^{51}Cr ou au ^{14}C , inuline-allyl marquée à l' ^{125}I et inuline marquée à l' ^3H) mais n'a jamais vraiment rencontré le succès en pratique [3-6]. La mesure du polymère de fructose qu'est l'inuline inclut au moins deux étapes successives. Tout d'abord, l'inuline doit être hydrolysée en fructose puis le fructose doit être mesuré. En méthode non isotopique, deux grands types de technologie ont été développés. Nous parlerons classiquement des méthodes de dosages dites « acide » et des méthodes dites « enzymatiques ». Pour les deux méthodes, la mesure d'un « blanc » est toujours conseillée d'une part, à cause des interférences possibles entre le dosage du fructose et du glucose (voir ci-dessous) et, d'autre part, pour prendre en compte le fructose « naturellement » présent dans le plasma [7]. Cependant, la concentration habituelle de fructose endogène dans le plasma est si faible (1 à 7 mg/L, données personnelles) qu'elle est négligée par certains auteurs [8, 9].
Relativement peu de données ont été publiées sur les différences éventuelles entre ces dosages. L'impact sur une mesure de DFG d'éventuelles différences de dosage est, sans doute réel, mais n'a que très rarement été estimé. Quoi qu'il en soit, nous allons décrire, dans cet article, les différentes méthodes de mesure existantes pour l'inuline. Sous le vocable inuline, nous comprendrons aussi le dosage d'un autre polymère de fructose, la sinistrine (Inutest) qui présente une masse moléculaire moins importante (3 500 Da) et qui apparaît plus soluble mais dont le dosage est identique à celui de l'inuline classique [10, 11].

Méthodes « acide »

Le dosage « acide » classique de l'inuline inclut un pré-traitement de l'échantillon pour précipiter les protéines (plusieurs méthodes de précipitations des protéines seront utilisées au cours du temps). En effet, comme son nom l'indique, ces dosages doivent ensuite être réalisés en milieu acide, or, ce milieu acide entraînera une dégradation des protéines qui risquent d'interférer lors du dosage en colorimétrie [12]. La première étape consiste donc en l'hydrolyse de l'inuline en fructose. Ensuite, le fructose sera dosé par colorimétrie selon différentes modalités. Plusieurs réactions « acide » sont proposées. Nous reprendrons ici les différentes méthodes de dosage décrites au cours du temps.

Cuivre et iode

C'est le dosage utilisé dans les premières études historiques de Smith et Richards, notamment [2, 13]. L'hydrolyse de l'inuline est obtenue par adjonction d'acide chlorhydrique [13] ou d'acide sulfurique [2]. Le dosage du fructose se basait sur la réaction connue alors sous le nom de réaction de Schaffer-Somogyi et qui inclut une réaction avec le cuivre et l'iode [14]. Ce dosage est peu sensible et nécessitait donc d'injecter de hautes doses d'inuline. Il sera rapidement abandonné [15]. Notons que ces deux auteurs proposaient déjà un pré-traitement de l'échantillon à base de levures pour éliminer le glucose de l'échantillon et éviter les interférences (voir ci-dessous) [2, 13].

Diphénylamine

Ce dosage, décrit en 1939 par deux auteurs indépendants, se révèle bien plus précis et sensible que le précédent [15, 16]. Il se base sur la réaction entre le fructose et la diphénylamine décrite en 1885 par Ihl et Pechamnn. Le fructose en réagissant avec la diphénylamine en milieu acide (acide chlorhydrique dissous dans de l'éthanol) et chaud (60 minutes à 100 °C) donne un composé bleu clair [15]. Ce dosage sera simplifié en 1942 (l'acide acétique, moins volatile, remplaçant l'éthanol) [17]. Pour diminuer l'interférence avec le glucose, ces deux auteurs proposent aussi de « traiter » préalablement le plasma avec une levure consommatrice de glucose (en fait, ils utilisent de la simple levure de boulangerie). Little, en 1949, remplace l'utilisation des levures par un pré-traitement en milieu alcalin censé oxyder une grande quantité de glucose [18]. Ce traitement semble néanmoins dégrader aussi l'inuline, surtout dans les urines [19]. Cette dégradation partielle d'inuline semble aussi varier selon l'origine de l'inuline utilisée, ce qui ne simplifie évidemment pas les choses [19-24].

L'interférence au glucose persistait et la nécessité d'une mesure « blanc » s'avérait toujours indispensable [25]. Notons que Rolf décrit une diminution de l'interférence entre dosage de fructose et de glucose si la réaction a lieu à 75 et non pas à 100 °C [26].

Résorcinol

Ce dosage se base sur la réaction de Seliwanoff décrite en 1887. En 1934, Roe propose un dosage basé sur la réaction avec le résorcinol en milieu acide (alcool éthylique et chlorhydrique) et chauffé à 80 °C pendant 8 minutes. La réaction donne un composé de couleur rouge [27]. Ce dosage sera repris, décrit plus en détail et légèrement modifié par Steinitz en 1938 et Hubbard en 1942 [28, 29]. En 1949, Roe améliore le dosage en remplaçant l'alcool éthylique par de l'acide acétique glacial [30]. Cette méthode sera validée par Schreiner en 1950 qui propose, par ailleurs, que la réaction se passe à 80 °C pendant 25 minutes [31]. Preedy, en 1954, propose un prétraitement avec une solution d'éthanol pour précipiter les dextrans [32]. Ullmann expérimente le prétraitement en milieu alcalin (méthode de Little) pour oxyder le glucose mais retrouve aussi une certaine dégradation de l'inuline variant selon les préparations [21]. L'interférence avec le glucose subsistant néanmoins, la proposition de Froesch, en 1957 apparaît novatrice et originale même si elle sera largement ignorée. Cet auteur suggère une oxydation préalable du glucose par traitement enzymatique purifié (dégradation du glucose en gluconate par la glucose oxydase). Les résultats de Froesch apparaissent excellents [33]. Cette étape pré-analytique peut être considérée comme « enzymatique » et sera, d'ailleurs, utilisée plus tard dans les méthodes de dosage enzymatiques (voir ci-dessous). Le dosage par résorcinol, en lui-même, nécessite un contrôle strict de la température de la réaction, ce qui n'est pas toujours évident et simple à réaliser en pratique. Un premier dosage semi-automatique (déprotéinisation manuelle préalable) sera publié en 1968 sur l'un des premiers automates de type Technicon (sans utiliser la fonction « dialyse » présente sur cet automate pour la déprotéinisation) [34]. D'autres méthodologies sur le Technicon seront proposées utilisant (ou non) la fonction « dialyse » telle qu'elle avait été développée avec la réaction de Heyrovsky (voir ci-dessous [35]) : traitement d'hydrolyse de l'inuline par l'acide chlorhydrique puis dialyse via passage à travers une membrane en cuprophane pour déprotéiniser le plasma puis réaction avec le résorcinol et l'acide éthylique [36-38]. À l'époque automatisée du Technicon, certains auteurs proposent encore un pré-traitement des échantillons à la levure de boulangerie pour diminuer au mieux les interférences avec le glucose [38]. Dans cette dernière publication, les auteurs décrivent par une régression la concentration apparente d'inuline due au glucose qui est

loin, malgré tous leurs efforts, d'être négligeable ($y = 195x - 10,1$ mg/L). De même, Erman attribue à l'interférence au glucose le fait qu'ils trouvent une différence significative de DFG entre 8 patients diabétiques glucosuriques et 7 patients diabétiques non glucosuriques lorsque le DFG est mesuré par clairance d'inuline, alors qu'aucune différence n'est observée si les clairances d'iothalamate ou de créatinine sont utilisées [39].

Anthrone

Le dosage de carbohydrates avec le réactif anthrone de Dreywood (réaction décrite en 1946) a été publié en 1948 par Morris [40]. C'est en 1952 que Young Jr l'adaptera pour la première fois au dosage de l'inuline [41]. C'est probablement la méthode « acide » qui est la plus utilisée de nos jours, du moins dans les pays anglo-saxons [7]. Young propose un traitement préalable du glucose de l'échantillon pour oxyder le glucose avec de l'hydroxyde de sodium [18]. L'anthrone est ajouté à une solution d'acide sulfurique puis le plasma est mélangé et chauffé pendant 15 minutes à 75 °C. Le produit de la réaction a une couleur jaune. Par rapport aux autres réactifs (diphénylamine et résorcinol), l'anthrone semble plus stable et plus facile à préparer. La réaction est également moins dépendante des conditions environnantes comme la température. La sensibilité et la reproductibilité apparaissent meilleures [41-43], ce qui permet d'ailleurs un dosage dans le sang capillaire [43]. Ces deux avantages sont retrouvés par White un an plus tard, même si cet auteur utilise le prétraitement à base de levures [44]. L'interférence avec le glucose diminuerait encore si la température de la réaction est fixée à 56 °C [19] ou à 38 °C [45] et si la concentration du réactif est réduite [45]. Une version automatisée de la mesure par anthrone sera proposée, dès 1965, dans laquelle l'inuline est hydrolysée par l'acide chlorhydrique sans déprotéinisation, les hydrolysats d'inuline passant ensuite par une membrane de dialyse pour réagir avec l'anthrone [23]. D'autres auteurs proposeront une version semi-automatisée (dans leur protocole, le plasma est déprotéinisé manuellement en utilisant l'acide trichloroacétique) sur le Technicon. L'intérêt réside dans le fait que le glucose soit mesuré systématiquement en même temps, ce qui permet de corriger le résultat du dosage d'inuline (sorte de « blanc » systématique). Les auteurs démontrent, par ailleurs, l'intérêt de l'automatisation sur les performances analytiques (CV intra-assay de 0,5 % et CV inter-assay de 5,8 % à 165 mg/L et de 2,7 % à 400 mg/L, recouvrement de 98 % et linéarité entre 0 et 2 500 mg/L). Ces auteurs ont étudié les interférences du glucose chez 36 patients diabétiques présentant des concentrations variables de glucose et n'ayant pas reçu d'inuline. Ils montrent que l'interférence du glucose sur le dosage de l'inuline est importante et linéaire avec une relation :

inuline (en mg/L) = $5,9 \times \text{glycémie (en mmol/L)} + 20,8$. Ainsi, en l'absence de la correction effectuée grâce à cette courbe, une concentration de glucose de 1,8 g/L donnera une valeur d'inuline de 59 mg/L [46]. Florijn illustrera, sur 3 patients diabétiques, l'interférence au glucose pour la mesure de l'inuline avec ce dernier dosage. L'injection de 50 mL de glucosé 50 % en 20 minutes chez 3 diabétiques non insulino-requérants induira une augmentation de la glycémie de $1,2 \pm 0,1$ g/L à $2,4 \pm 0,01$ g/L. Le dosage d'inuline passe de 122 ± 23 à 180 ± 27 mg/L et la clairance d'inuline passera de 29 ± 9 mL/min à 44 ± 3 mL/min selon que la correction pour le glucose est, ou non, effectuée [47].

Acide β -indole-acétique

Ce dosage est proposé, en 1956, par le Pragois Heyrovsky dans le premier volume de *Clinica Chimica Acta* [48]. En présence d'acide hydrochlorhydrique concentré pour hydrolyser l'inuline, l'auteur démontre que l'acide β -indole acétique est excellent pour le dosage colorimétrique du fructose en donnant un produit de couleur pourpre. L'interférence avec le glucose persiste mais semble limitée à 0,5-1 %. L'auteur recommande toujours néanmoins d'utiliser un « blanc » et de déprotéiniser le plasma. Cette réaction a lieu à température ambiante (réaction sur la nuit) et a le mérite d'être simple (en tout cas relativement pour une technique manuelle) [48]. Yatzidis, en 1976, montrera que l'acide acétique β -indolé peut être utilisé comme réactif sans déprotéinisation préalable et que le temps de réaction peut, de fait, être limité à 25 minutes [49]. La simplicité du dosage proposé par Heyrovsky explique que cette technique fut la première, en 1965, à être utilisée de façon automatisée. Dawborn décrit donc, sur le Technicon, la réaction qui comprend une déprotéinisation préalable automatique par dialyse (membrane en cuprophane imperméable à l'inuline et traitement d'hydrolyse de l'inuline avant cette dialyse par l'acide chlorhydrique) [35]. D'autres auteurs amélioreront encore les performances analytiques de ce dosage automatisé [50, 51].

Autres dosages

D'autres dosages ont été proposés comme celui basé sur le fait que l'inuline réagisse avec la vanilline en milieu acide pour donner un composé rouge [52]. L'avantage est qu'aucune réaction d'hydrolyse préalable de l'inuline n'est nécessaire. La réaction doit cependant se réaliser à l'abri de la lumière et la survenue d'interférence est peu étudiée. Une réaction aboutissant à une coloration rosée est aussi décrite après réaction de l'inuline avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide (acide chlorhydrique) et différents auteurs proposent une méthode semi-automatisée avec ou sans déprotéinisation [53, 54]. L'interférence au glucose

est peu étudiée avec cette réaction mais est probablement présente.

Enfin, signalons encore que certains auteurs ont proposé d'autres méthodes de prétraitement de l'échantillon pour « enlever » le glucose du plasma, par exemple, en utilisant des colonnes de gel censées filtrer le glucose [55, 56]. Ceci rallonge bien entendu fortement la durée de la mesure.

Toutes ces réactions sont susceptibles d'interférences avec le glucose ou les autres carbohydrates et la mesure d'un plasma avant injection (blanc) reste donc systématiquement recommandée. Cette nécessité est affirmée dès la fin des années 1930 [15, 17, 18, 28, 30, 31]. L'utilisation d'un « blanc » ne règle cependant pas le problème si la glycémie varie pendant la détermination du DFG [18]. De plus, la première étape d'hydrolyse de l'inuline nécessite l'utilisation de produits corrosifs et acides ce qui rend la réaction, non seulement difficile et chronophage, mais également potentiellement dangereuse [46, 57].

Méthodes enzymatiques

Le premier dosage entièrement enzymatique est proposé par Day en 1984 [58]. Il s'effectue aussi en deux étapes. La première étape est, encore une fois, une hydrolyse de l'inuline en fructose qui est ici effectuée par un enzyme appelé la β -fructofuranosidase. Cette réaction a lieu à 50 °C et dure 20 minutes. La seconde étape est une quantification du fructose après transformation en sorbitol, via une réaction avec le NADH et la sorbitol déshydrogénase. La transformation du fructose en sorbitol entraîne une diminution d'absorbance à 340 nm qui permet de déduire la concentration de fructose. Day ne précise pas la performance analytique de son dosage ni les éventuelles interférences avec le glucose [58]. La sorbitol déshydrogénase s'avérera néanmoins par la suite spécifique du fructose (réactivité avec le glucose inférieure à 1 %) [7, 59]. Dalton, en 1987, propose une méthode « semi-enzymatique », à savoir une étape d'hydrolyse de l'inuline par l'acide perchlorhydrique (comme dans les méthodes « acide ») puis une étape enzymatique de dosage du fructose selon la proposition de Day. La reproductibilité est excellente (CV intra-assay, pour le plasma et les urines, de 1,8 et 1,3 %). Les auteurs évoquent (sans en détailler les résultats) l'absence d'interférence avec des concentrations de glucose de 45 grammes [60]. En fait, le problème de la réaction proposée par Day est que l'enzyme β -fructofuranosidase n'est pas facile à obtenir. Cette méthode ne sera donc jamais utilisée à grande échelle. En 1987, Degenaar, décrit l'utilisation de l'inulinase pour l'hydrolyse de l'inuline en fructose (réaction de 30 minutes à 50 °C avec un tampon citraté). Des enzymes de type hexokinase sont ensuite utilisés pour convertir, en présence d'ATP, les

hexoses, glucose et fructose, en glucose- et fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate est ensuite converti en glucose-6-phosphate par une phosphoglucose isomérase. Le glucose-6-phosphate obtenu des deux réactions précédentes, est, enfin, lui-même oxydé en présence de NADP et de glucose-6-phosphate déshydrogénase en acide 6-phosphogluconique et en NADPH. Cette dernière étape entraîne une augmentation d'absorbance qui permet de déterminer la concentration de fructose (*figure 1*). Cette technique a l'avantage de pouvoir être automatisée (sur Cobas Bio en l'occurrence). Son CV analytique (CV intra-assay) est meilleur que pour le dosage à base d'anthrone (1,2 % versus 3,4 %). Les deux méthodes sont, bien logiquement, corrélées ($r = 0,96$ pour le sang et $0,99$ pour les urines). Les auteurs reprennent, comme argument en faveur de la technique enzymatique, une concentration d'inuline lors de la perfusion continue qui apparaît plus constante [61]. Jung, en 1990, décrit une méthode semi-enzymatique (hydrolyse de l'inuline par l'acide chlorhydrique puis mesure du fructose par l'hexokinase). Il ne trouve pas de performance analytique supérieure à la méthode enzymatique par rapport à la technique à l'anthrone pour le dosage plasmatique de l'inuline que ce soit en terme de précision (CV intra-assay de 1,9 % et de 1 % pour les méthodes enzymatique et « acide » respectivement), de linéarité ou de limite de détection. Il insiste sur le prix nettement moins élevé de la méthode « acide ». La corrélation entre les méthodes est, heureusement, excellente ($r = 0,99$ sur 57 échantillons). Cet auteur n'a pas spécifiquement étudié les interférences avec le glucose mais il cite (sans développer) l'utilisation de la glucose oxydase comme prétraitement des échantillons pour éviter cette interférence. Ce prétraitement est utilisé pour la méthode enzymatique et la méthode à l'anthrone ce qui peut, peut-être, expliquer l'absence de supériorité de la première méthode sur la seconde dans cette étude [62]. En 1991, Delanghe confirme et insiste sur l'étape intéressante pour diminuer l'interférence du dosage avec le glucose. Cette étape implique donc une glucose oxydase qui transforme le glucose en gluconate et qui agit avant l'inulinase, c'est-à-dire en phase de préincubation (*figure 1*) [8]. Cette étape avait déjà été décrite et proposée par Froesch en 1957 (voir ci-dessus) mais avait, semble-t-il, rencontré alors peu de succès (à tel point que Delanghe, Jung et les autres auteurs utilisant cet enzyme semblent ignorer cette publication ; en tout cas, ils ne citent pas ce travail qu'il convient donc, en quelque sorte, de réhabiliter [8, 12, 62]) [33]. Le reste de la mesure est assuré par un traitement à l'inulinase puis une mesure du fructose avec hexokinase, phosphoglucose isomérase et glucose-6-phosphate déshydrogénase, tels que décrit par Degenaar (*figure 1*) [8, 61]. Les performances analytiques de cette méthode sur l'automate Hitachi 717 (mais la méthode peut être adaptée sur tout automate) sont excellentes (linéarité,

limite de détection, CV intra- et interassay à 0,9 % et 2,7 %, stabilité 1 mois à 4 °C). Des concentrations en glucose atteignant 3,6 g/L sont totalement éliminées par l'étape enzymatique préalable [8]. Kuehnle, en 1992, confirme les résultats de Delanghe concernant l'intérêt d'un traitement de l'échantillon avec la glucose oxydase. Cet auteur insiste sur le fait que de petits volumes plasmatiques suffisent pour l'analyse (100 µL) et que l'interférence au glucose est améliorée (jusqu'à une concentration de 7 g/L bien que les données « prouvant » cette affirmation ne sont pas données dans l'article). Les auteurs insistent aussi sur le gain de temps obtenu par le fait que, contrairement aux méthodes « acide », une déprotéinisation préalable du plasma n'est plus nécessaire vu le pH moins acide de ces réactions [12]. En 1993, Summerfield [7] propose un dosage automatisé (sur Cobas FARA II) combinant l'utilisation de l'inulinase et l'enzyme sorbitol déshydrogénase reprenant ainsi, pour le dosage du fructose, la réaction enzymatique proposée antérieurement par Day (*figure 2*) [58]. L'article de Summerfield est intéressant car il compare directement sa méthode enzymatique avec une méthode « acide » [7], en l'occurrence, la méthode à l'anthrone [44]. La méthode enzymatique se révèle précise, linéaire et son recouvrement est excellent (quasi 100 %). La comparaison entre méthode enzymatique et méthode « anthrone » démontre un biais systématique

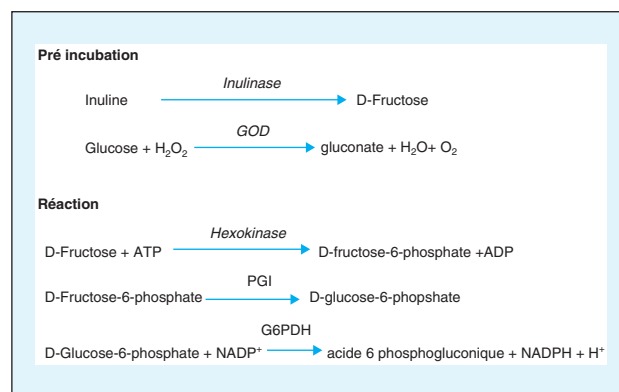


Figure 1. Méthode enzymatique de dosage de l'inuline utilisant hexokinase (selon [8], voir texte pour détails). GOD : glucose oxydase, PGI : phosphoglucose-isomérase, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

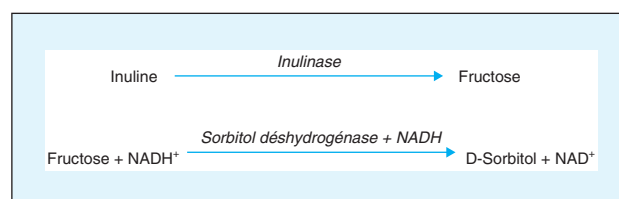


Figure 2. Méthode enzymatique de dosage de l'inuline utilisant la sorbitol déshydrogénase (selon [7], voir texte pour détails).

de 3,5 mg/L (l'anthrone donnant des résultats plus élevés) dans le sang et de 138 mg/L dans les urines. Ces différences sont jugées non significatives par les auteurs (pour les urines, les concentrations sont habituellement comprises dans des valeurs supérieures à 3 000 mg/L). L'adjonction d'une concentration connue de glucose (300 mg/L) à du plasma ne contenant pas d'inuline, entraîne une « apparition » d'inuline de 33 mg/L avec la méthode à l'anthrone, alors qu'elle ne sera que de 1,3 mg/L avec la méthode enzymatique. Les auteurs recommandent, pour les deux méthodes, la réalisation d'un « blanc » pour la prise en compte du fructose endogène. Par ailleurs, les auteurs ne retrouvent pas d'interférence avec le sorbitol, le mannitol et le xylitol pour la méthode enzymatique. Le CV analytique de la méthode enzymatique est meilleur que celui de la méthode « acide » (CV inter-assay de 1,4 % versus 2,8 %). Même si ces derniers CV ont été calculés à deux concentrations plasmatiques différentes, ce qui est quelque peu discutable, ces résultats sont en faveur de la méthode enzymatique, le CV étant meilleur alors que les concentrations testées sont plus basses (moyenne des concentrations à $160 \pm 2,3$ mg/L pour l'enzymatique et 645 ± 18 mg/L pour l'anthrone). Le CV inter-assay de la méthode enzymatique pour le dosage urinaire est lui de 4 % (pour une concentration moyenne de $2\,390 \pm 96$ mg/L) (résultats non donnés pour la méthode « acide » dans les urines) [7]. La nécessité d'une quantité relativement élevée de sorbitol déshydrogénase rend cependant le prix de cette réaction élevé. La même équipe a amélioré le dosage en utilisant une version « cinétique » (lecture 10 à 20 minutes après le début de la réaction), ce qui permet d'économiser les réactifs (diminution du prix d'un facteur 30). Les auteurs confirment également que l'inuline est stable à 2-8 °C et à -70 °C pendant 5 semaines. Enfin, les auteurs ne retrouvent pas d'interférence significative entre le dosage enzymatique d'inuline et la bilirubine ou l'hémoglobine, alors qu'une interférence modeste est décrite avec les triglycérides (6,8 mg/L d'inuline par 100 mg/dL de triglycérides) [63]. Cette dernière méthode de dosage sera aussi quelque peu adaptée par Soper (modification du temps d'incubation avec l'inulase et modification des tampons utilisés) pour la sinistrine [64]. Ces auteurs évoqueront également, assez discrètement, une hydrolyse potentiellement incomplète de sinistrine en fructose par l'inulase chez les patients insuffisants rénaux ou hépatiques [65]. Sugita a, lui-aussi, étudié les performances analytiques et les interférences au glucose d'une méthode enzymatique. Il reprend les réactions enzymatiques décrites par Degenaar [61], mais remplace l'hexokinase par une fructokinase, évidemment censée être plus spécifique du fructose, ce qui lui permettrait de ne pas prendre en compte la concentration de glucose [66]. Notons tout de même que la référence scientifique reportant à la caractérisation de cet enzyme (censé, d'après

la bibliographie, être « in press ») n'a, à notre connaissance, jamais été publiée. Le dosage est adapté à l'automate Cobas FARA (Roche). Sugita mène une étude comparative entre cette méthode et la méthode « acide » à l'anthrone [66]. Cette méthode de dosage enzymatique est analytiquement performante (CV intra-assay, respectivement, de 1,66 %, 2,32 % et 1,07 % pour 131, 254 et 986 mg/L, CV inter-assay de 2,15 % à 259 mg/L, recouvrement excellent). L'adjonction de glucose (jusqu'à 5 g/L), de fructose ou de mannose au sérum et à l'urine ne modifie pas les résultats de la méthode enzymatique et il n'y a pas non plus d'interférence significative avec les triglycérides, l'hémoglobine, la bilirubine, l'urée et la créatinine. Dans cette étude, les résultats de la méthode enzymatique sont évidemment bien corrélés aux résultats de la méthode à l'anthrone (résultats chez 64 sujets dont 4 diabétiques) ($r = 0,979$), mais l'analyse du graphe de Bland et Altman montre que la méthode à l'anthrone donne des résultats plus hauts en dessous de 500 mg/L et des résultats plus bas au-dessus de 500 mg/L (les chiffres précis ne sont pas donnés dans l'article mais, si la moyenne des différences semble acceptable (inférieure à 5 mg/L), l'écart type de la différence paraît supérieur à 50 mg/L, ce qui est énorme). Notons enfin que la différence est plus importante pour les 4 sujets diabétiques (même si leur glycémie au moment de la mesure n'est malheureusement pas connue) [66]. Enfin, très récemment, une nouvelle méthode enzymatique a été proposée qui se veut notamment plus rapide et plus (ou aussi) précise que les autres méthodes enzymatiques [67]. Notons que les auteurs proposent une déprotéinisation du plasma avec de l'acide perchlorique, notamment pour diminuer les interférences potentielles à la bilirubine. Cette réaction, effectuée apparemment manuellement avant centrifugation, doit durer 10 minutes à température ambiante (ce temps est-il pris en compte quand les auteurs affirment que leur méthode est entièrement automatisée et rapide ?). La première étape est classique et consiste en l'hydrolyse de l'inuline en fructose par l'inulase. La seconde étape fait réagir le fructose avec la D-fructose déshydrogénase en présence de la forme oxydée du 1-méthoxy-5-méthylphénazinium (1-m-PMS) pour donner la forme réduite du 1-m-PMA. Ce réactif agit sur l'oxygène pour produire de l'eau oxygénée qui, en réagissant avec une peroxydase, va transformer d'autres réactifs, à savoir le N-éthyl-N-(2-hydroxy-3-sufopropyl)-m-toluidine et le 4-aminoantipyrine en quinonéimine. Ce composé final sera quantifié par colorimétrie classique. Cette mesure est automatisée sur l'Hitachi 717. Les performances de ce dosage ont été comparées à celles d'un dosage à l'anthrone. Les deux méthodes s'avèrent linéaires. Le CV intra-assay est déterminé sur 3 échantillons de sérum à 50, 101 et 200 mg/L et sur 3 échantillons d'urines à 50, 101 et 160 mg/L (pour les urines, soit dit en passant, ces concentrations ne correspondent pas aux valeurs

rencontrées en clinique). Le CV intra-assay de la méthode enzymatique est excellent (1 à 3,6 % pour le sang et 0,6 à 1,37 % pour les urines), de même que le CV inter-assay (0,96 à 3,33 % pour le sang et 1,68 à 2,2 % pour les urines). Les auteurs confirment l'absence d'interférences avec la bilirubine, les triglycérides, l'hémoglobine, l'acide ascorbique et l'albumine. L'adjonction, dans le sérum, de 1 et 2 g/L de glucose ne modifie pas la concentration d'inuline déterminée par méthode enzymatique. Par contre, si on utilise la méthode à l'anthrone, la concentration d'inuline augmente de 12,6 % à 1 g/L et de 38,7 % à 2 g/L. Le recouvrement est proche de 100 % pour les deux techniques mais la méthode à l'anthrone donne, en présence du glucose, un résultat d'inuline de 52 à 92 mg/L dans le plasma, alors qu'il ne contient pas d'inuline (nécessité d'un blanc) tandis que la méthode enzymatique donnera des résultats de 4 mg/L maximum. Enfin, les deux méthodes ont été comparées sur 46 échantillons urinaires (entre 100 et 11 000 mg/L) et sur 46 échantillons plasmatiques (entre 50 et 350 mg/L). La corrélation entre les deux méthodes est, évidemment et heureusement, excellente ($r = 0,99$). L'analyse de Bland et Altman démontre une différence entre les deux méthodes de $-2,5 \pm 9,3$ mg/L (anthrone-enzymatique). Cette différence n'est pas jugée significative par les auteurs. La différence entre les dosages urinaires est, elle, plus significative avec une tendance nette pour la méthode à l'anthrone à donner des résultats 5 % plus bas ($-139,7 \pm 141,8$ mg/L). L'avantage, du moins théorique, de cette réaction est que l'inulinase et la D-fructose déshydrogénase ont une activité optimale au même pH (ce qui n'est pas le cas de l'hexokinase et de la sorbitol déshydrogénase) [67].

Dans la méthode développée par Kuenhle [12], le glucose présent dans le sérum ou les urines est éliminé par l'adjonction de glucose-oxydase pendant la première étape d'hydrolyse du polyfructosan. Cependant, l'utilisation de cette méthode en pratique courante est limitée dans de nombreux échantillons par la présence de phosphoglucose isomérase libérée des globules rouges par hémolyse. La méthode a donc été améliorée en ajoutant une étape d'inactivation de la phosphoglucose isomérase endogène (figure 3) et a été reformatée pour un lecteur de plaques (96 puits) [68]. La technique est ainsi simple, reproductible (le CV intra-assay est excellent (0,3 % pour le sang et 0,7 % pour les urines), de même que le CV inter-assay (1,6 à 3,5 % pour le sang). Les auteurs confirment l'absence d'interférences avec la bilirubine, l'hémoglobine. L'adjonction de glucose (50 mmol/L dans le sérum, 100 mmol/L dans les urines) ne modifie pas la concentration d'inuline déterminée par méthode enzymatique (0,7 % et 1,0 % de variation, respectivement). La comparaison de cette technique avec une technique colorimétrique chez 52 patients retrouve une différence moyenne de

$-3,0 \pm 4,5$ mL/min/1,73 m², ce qui est tout à fait comparable aux résultats précédemment cités et n'est pas jugé cliniquement significative par les auteurs. Enfin, la technique est facilement utilisable par tout laboratoire disposant d'un spectrophotomètre (lecteur de plaque) et est bon marché (moins de 0,10 euro par échantillon).

Méthodes CLHP

À notre connaissance, 7 articles ont été publiés, provenant de 6 équipes différentes, sur le dosage de l'inuline par méthode CLHP. Dans ces méthodes, c'est soit le fructose (ou un dérivé, l'hydroxyméthylfuraldéhyde (HMF)) qui est dosé et cela implique donc que l'inuline soit préalablement hydrolysée (le plus souvent, manuellement et en utilisant un milieu acide, voir ci-dessus) [57, 69, 70], soit c'est l'inuline qui est directement dosée [71-73]. Les méthodes de détection dépendront également du composé à doser. Pour l'inuline, il s'agit soit de méthodes électrochimiques [71, 72] ou faisant appel à un détecteur à diffusion de la lumière [73]. Pour le fructose ou ses dérivés (HMF), des détecteurs UV sont généralement employés [57, 69]. La première étude publiée sur le dosage CLHP de l'inuline est celle de Ruo en 1991 [71]. Dans cette étude, c'est l'inuline, elle-même, que les auteurs se proposent de mesurer. La détermination électrochimique de l'inuline s'effectue après une étape assez exhaustive de purification de l'échantillon (passage sur une cartouche OnGuard-A, évaporation à sec à 40 °C et dissolution du résidu dans 600 µL d'eau bouillante). L'extraction de l'inuline du plasma et de l'urine est satisfaisante (respectivement $94,2 \pm 2,7$ % et $101,9 \pm 2,4$ %). Le glucose et le fructose n'interfèrent pas dans le dosage. Le dosage s'avère linéaire et précis : CV intra-assay inférieur à 5 % pour le plasma et à 3 % pour les urines à des concentrations entre 5 et 200 µg/L et CV de 12 % pour des concentrations aussi basses que 1 mg/L.

En 1995, Dall'Amico propose une méthode différente [57]. En effet, cet auteur recommande une hydrolyse de l'inuline en fructose puis en HMF (acidification par de l'acide perchlorique à 70 %, centrifugation et ébullition pendant 5 minutes) et c'est ce dernier composé qui est en fait dosé [57]. L'analyse du pic de chromatographie ne laisse pas suspecter d'interférences, mais le fructose endogène du patient doit probablement être mesuré par cette méthode, ce qui n'est pas abordé par les auteurs de l'article. Encore une fois, les performances analytiques du dosage CLHP sont excellentes. La mesure est linéaire et le recouvrement est excellent. Le CV intra-assay dans le plasma varie de 1,7 à 0,9 % pour des concentrations de 200 à 1 600 mg/L et, pour les urines, de 1,2 à 0,8 % pour des concentrations de 800 à 3 200 mg/L. Pour les mêmes concentrations, les CV

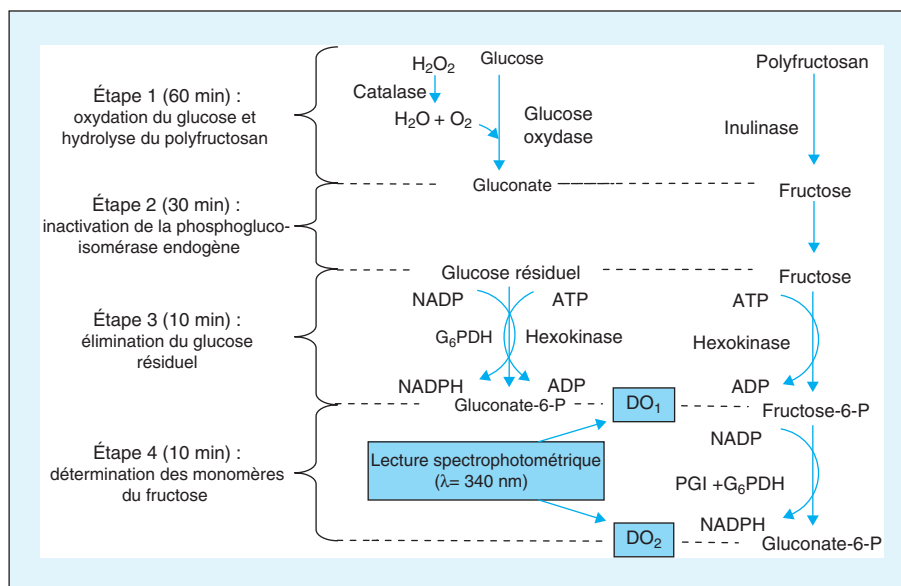


Figure 3. Méthode enzymatique de dosage de l'inuline selon Dubourg (selon [68] voir texte pour détails).

inter-assay pour le sang et les urines sont respectivement de 2,7 à 3,2 % et de 3,2 à 3 %. Les auteurs insistent sur la sensibilité de la méthode (mais ne donnent pas de chiffres) et sur sa simplicité (30 minutes pour un dosage) [57].

En 1996, Séchaud adapte le dosage à la sinistrine [72]. Le gros avantage de la sinistrine par rapport à l'inuline est sa haute solubilité dans l'eau à température ambiante. Ces auteurs ont développé une méthode de dosage qui permet de doser directement la sinistrine via une détection électrochimique. La préparation de l'échantillon nécessite une étape de purification par une petite colonne SPE (Sep-Pak Plus C18) qui enlève les protéines et les substances potentiellement interférentes comme le glucose. Le recouvrement est excellent mais dans cette méthode, la linéarité est perdue au-delà de 350 mg/L, ce qui implique une dilution de ces échantillons. Ceci peut poser problème car des dilutions importantes (et pas forcément prédictibles) pour les urines peuvent être nécessaires. La limite de quantification est calculée à 5 mg/L et la limite de détection est à 0,8 mg/L. Le CV intra-assay dans le plasma varie de 8,3 à 3,5 % pour des concentrations de 20 à 250 mg/L et le CV inter-assay de 9,7 à 6,3 %. Pour une méthode CLHP, ces CV peuvent être jugés comme relativement décevants. De plus, les CV des mesures dans les urines ne sont pas donnés. Les auteurs ont également étudié la stabilité de l'inuline et, pour une raison inexpliquée, dans les urines, les résultats ne sont pas bons lors des cycles de congélation-décongélation (augmentation des valeurs d'inuline de 9 à 21 %) [72].

Baccard, en 1999, propose un dosage de l'inuline par CLHP/UV qu'il est possible de combiner avec le dosage de l'acide para-aminohippurique (utilisé pour la détermination

du débit plasmatique rénal) [69]. Dans cette publication, le traitement de l'échantillon pour transformer l'inuline en HMF est identique à celui proposé par Dall'Amico (à l'exception du temps d'hydrolyse qui est plus long). Les conditions chromatographiques sont fort comparables. Le recouvrement et la linéarité de la méthode décrite sont excellents. Notons que les auteurs retrouvent, dans un échantillon sur 100, un pic interférent avec le HMF qu'ils ne peuvent éliminer. La limite de détection est à 0,5 mg/L. Le CV intra-assay dans le plasma varie de 7,6 à 3,8 % pour des concentrations de 12,5 à 100 mg/L et, pour les urines, de 3,6 à 3,3 % pour des concentrations de 12,5 à 100 mg/L. Pour les mêmes concentrations, les CV inter-assay pour le sang et les urines sont respectivement de 10,9 % à 6,1 % et de 7,6 à 0,9 %. Ici aussi, le dosage comprend certainement le fructose endogène.

Nous retrouvons, en 2000, une publication du groupe de Dall'Amico mais ici, c'est l'inuline qui est directement dosée, et non plus le fructose [73]. Après précipitation des protéines, et passage à travers un filtre de 0,2 μm , l'échantillon est injecté dans une CLHP couplée à un détecteur à diffusion de la lumière Varex MKIII ELSD. Les auteurs étudient spécifiquement et excluent les interférences avec le glucose et le fructose. Le recouvrement paraît excellent mais la linéarité, la limite de détection et de quantification ne sont pas été étudiées. Le CV intra-assay dans le plasma varie de 3,4 à 1,7 % pour des concentrations de 52 à 1 201 mg/L et, pour les urines, de 3,5 à 1,5 % pour des concentrations de 52 à 2 397 mg/L. Pour les mêmes concentrations, les CV inter-assay, pour le sang et les urines, sont respectivement de 4,3 % à 2 % et de 4,4 à 2 % [73].

En 2001, un autre groupe italien publie sa méthode qu'il propose de combiner également avec le dosage de l'acide para-aminohippurique [74]. La méthode proposée est très proche de la méthode proposée par Dall 'Amico en 1995 [74]. Ces auteurs confirment encore une fois la linéarité et le bon recouvrement de cette méthode. Ils ne décrivent pas de pics interférents. La limite de détection est estimée à 50 mg/L. Le CV intra-assay dans le plasma varie de 3,3 % pour une concentration de 0,3 mg/L et, pour les urines, de 6,1 % pour des concentrations de 0,13 mg/L. Pour les mêmes concentrations, les CV inter-assay pour le sang et les urines sont respectivement de 7,1 % et de 10 %. Les chiffres donnés par ces auteurs sont probablement entachés d'erreurs dans les unités [74].

Enfin, la dernière étude est publiée en 2004 [70] et concerne le dosage de la sinistrine. Ces auteurs combinent un peu des trois méthodes de dosage de l'inuline : hydrolyse acide de l'inuline (par l'acide trifluoroacétique), traitement enzymatique de l'échantillon en phase préanalytique pour éliminer les interférences au glucose (glucose oxydase, voir ci-dessus) et dosage du fructose par CLHP avec détection électrochimique. Contrairement aux deux études précédentes où l'inuline est préalablement hydrolysée [57, 69], ces auteurs insistent sur la nécessité d'oxyder le glucose endogène dont le pic risque d'interférer avec celui du fructose [70]. La méthode de dosage est linéaire et le recouvrement est bon. La limite de quantification est estimée à 2 mg/L et à cette concentration le CV est à 5,7 %. Ces auteurs sont les seuls, pour ce qui est des méthodes CLHP, à insister sur la nécessité d'un « blanc » pour compenser le fructose endogène. Cette étude est aussi la seule à comparer les résultats de la CLHP avec les résultats d'une méthode enzymatique (en l'occurrence celle de Delanghe [8]). Les deux méthodes sont bien corrélées, évidemment, ($r = 0,97$) mais l'analyse de Bland et Altman évoque une différence moyenne de 6,9 % entre méthode CLHP et enzymatique, résultat obtenu en comparant 59 échantillons (venant de deux patients) dont la concentration allait de 20 à 360 mg/L. Sur base de la figure présentée, on peut estimer l'écart type autour de la différence moyenne à ± 16 %, ce qui n'est pas tout à fait négligeable [70].

Une conclusion générale quant au dosage de l'inuline en méthode CLHP apparaît difficile à donner au jour d'aujourd'hui. En effet, les données apparaissent relativement limitées et ce, d'autant plus, que deux grandes méthodologies co-existent (hydrolyse ou non de l'inuline) et sont difficilement comparables. Une étude comparant ces deux méthodologies CLHP pourraient d'ailleurs être intéressantes. A priori, les méthodes CLHP ont l'avantage d'être sensibles et précises. Les méthodes dosant l'inuline *in extenso* apparaissent, sans doute, les plus sûres au niveau spécificité [73]. Cependant, les méthodes, notamment d'extraction sont aussi plus compliquées (il faut toujours

s'assurer que cette extraction d'inuline est complète et ne s'accompagne pas d'une hydrolyse partielle) et les méthodes de détection nécessaires (ampéromètres, détecteurs à diffusion de la lumière) sont très difficiles à utiliser en routine. Pour ce qui est des méthodes CLHP avec hydrolyse partielle, il existe un doute quant aux interférences avec le glucose (du moins en détection ampérométrique) [70] et avec le fructose endogène [57, 69]. Ces méthodes CLHP nécessitent, bien évidemment, un certain appareillage mais le dosage d'inuline, quel qu'il soit, est relativement compliqué et la majorité des centres (universitaires, pour la plupart) possèdent cet appareillage (à l'exception du détecteur à diffusion de la lumière). L'argument du coût et du temps de réaction est parfois avancé, notamment en faveur des méthodes enzymatiques, mais cela reste à prouver définitivement. Enfin, ces méthodes sont apparues historiquement (et logiquement) tardivement par rapport aux autres méthodes, ce qui explique, sans doute, qu'elles soient encore peu utilisées de nos jours. Nous pensons que des études complémentaires et notamment des études comparatives (incluant des comparaisons de prix et de temps de réaction) avec les méthodes « acide » et enzymatiques sont indispensables. Gardons aussi en mémoire que les méthodes CLHP sont considérées comme des méthodes de références pour de nombreux dosages, ceci compris le dosage d'autres marqueurs du DFG comme l'iohexol [75].

Conclusion

L'intérêt de l'inuline comme marqueur de référence (« gold standard ») est avérée depuis les années trente et ne s'est, à ce jour, jamais démentie. Le dosage, notamment « acide », de l'inuline reste néanmoins toujours délicat, sujet à interférences et à une certaine interprétation. À notre époque où une standardisation des données biologiques est souvent un but à atteindre (voir l'exemple de la créatinine pour rester dans la néphrologie [76]), on peut affirmer que nous sommes loin du compte pour ce qui est du dosage de l'inuline.

La supériorité des méthodes enzymatiques sur les méthodes « acide », en terme de précision, reste à démontrer clairement même si les études les plus récentes semblent aller dans ce sens. Encore une fois, les études les plus récentes insistent surtout sur la facilité d'emploi et même le coût limité des dernières méthodes enzymatiques par rapport aux méthodes « acide » [68]. Il apparaît aussi assez clairement que les méthodes enzymatiques permettent un gain en terme de spécificité, notamment vis-à-vis du glucose. Les méthodes « acide » les plus anciennes (mais qui sont toujours utilisées en 2010, notamment en France (tableau 1)) restent, bien évidemment, « manuelles » et chronophages [77]. Le facteur qui peut être le plus limitant

Tableau 1. Comparatif des méthodes utilisées en France par les différentes équipes qui utilisent l'inuline (non exhaustif).

Centre Hospitalier Français	Technique de dosage utilisée
CHU de Strasbourg	Hydrolyse « acide » et dosage enzymatique du fructose
CHU de Valenciennes	Méthode « acide » au résorcinol
CHU de Saint Etienne	Méthode « acide » au résorcinol
Hospices civils de Lyon	Méthode enzymatique
CHU de Ranguel	Méthode « acide » à l'anthrone
CHU de Clermont-Ferrand	Méthode « acide » au résorcinol
CHU de Besançon	Hydrolyse « acide » et dosage enzymatique du fructose
Paris, Hôpital Necker	Méthode « acide » au résorcinol
Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière	Méthode « acide » à l'anthrone

est la nécessité d'un technicien expérimenté. Quelques méthodes « acide » (anthrone et acide β -indole-acétique) [23, 35] et enzymatiques [61, 68] sont disponibles de manière automatisée et seraient, de fait, plus précises et plus reproductibles. Des études analytiques plus poussées, plus comparatives et utilisant les méthodologies statistiques les plus modernes (une simple corrélation étant largement insuffisante pour comparer deux méthodes surtout quand on est censé doser la même chose !) seraient encore les bienvenues. De même, les conséquences de l'imprécision (ou des interférences) du dosage d'inuline sur le résultat de DFG calculé sont mal connues. Ceci semble particulièrement important pour le dosage plasmatique de l'inuline qui nécessite une plus grande sensibilité (concentration plus basse que dans les urines qui concentrent l'inuline injectée), une plus grande spécificité (la matrice « plasma » comportant plus d'interférents potentiels que la matrice « urine ») et une plus grande précision (dans le calcul d'une clairance urinaire, la concentration plasmatique apparaît au dénominateur ce qui amplifie les imprécisions éventuelles). Le dosage, presque centenaire, de l'inuline n'a donc probablement pas fini d'éveiller la curiosité des biologistes et des néphrologues.

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

- Smith HW. The reliability of inulin as a measure of glomerular filtration. *The kidney : Structure and function in health and disease*. New York : Oxford University Press Inc, 1951 : 231-8.
- Shannon JA, Smith HW. The excretion of inulin, xylose, and urea by normal and phorized man. *J Clin Invest* 1935 ; 14 : 393-401.
- Materson BJ, Johnson AE, Perez-Stable EC. Inulin labeled with chromium 51 for determination of glomerular filtration rate. *JAMA* 1969 ; 207 : 94-6.
- Marlow CG, Sheppard G. (51Cr)EDTA, (hydroxymethyl-14C) inulin and inulin-T for the determination of glomerular filtration rate. *Clin Chim Acta* 1970 ; 28 : 479-88.

- Summers RE, Concannon JP, Weil C, Cole C. Determination of simultaneous effective renal plasma flow and glomerular filtration rate with 131-I-ortho-iodohippurate and 125-I-allyl inulin. *J Lab Clin Med* 1967 ; 69 : 919-26.
- Windfeld S, Jonassen TE, Christensen S. [3H]Inulin as a marker for glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 ; 285 : 575-6.
- Summerfield AL, Hortin GL, Smith CH, Wilhite TR, Landt M. Automated enzymatic analysis of inulin. *Clin Chem* 1993 ; 39 : 2333-7.
- Delanghe J, Bellon J, De Buyzere M, Van Daele G, Leroux-Roels G. Elimination of glucose interference in enzymatic determination of inulin. *Clin Chem* 1991 ; 37 : 2017-8.
- Aloia JF. Monosaccharides and polyols in diabetes mellitus and uremia. *J Lab Clin Med* 1973 ; 82 : 809-17.
- Buclin T, Pechere-Bertschi A, Sechaud R, Decosterd LA, Munafo A, Burnier M, et al. Sinistrin clearance for determination of glomerular filtration rate : a reappraisal of various approaches using a new analytical method. *J Clin Pharmacol* 1997 ; 37 : 679-92.
- Falbriard A, Favre H, Lucot G, Zender R. Le polyfructosan, nouvelle substance glomérulaire utilisable en clinique courante. Raisons de le préférer à l'inuline. *Schweiz Med Wochenschr* 1969 ; 99 : 121-5.
- Kuehnle HF, von Dahl K, Schmidt FH. Fully enzymatic inulin determination in small volume samples without deproteinization. *Nephron* 1992 ; 62 : 104-7.
- Richards AN, Westfall BB, Bott PA. Renal excretion of inulin, creatinine, and xylose in normal dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1934 ; 32 : 73.
- Shaffer PA, Somogyi M. Copper-iodometric reagents for sugar determination. *J Biol Chem* 1933 ; 100 : 695-713.
- Alving AS, Miller BF, Rubin J. A direct colorimetric method for the determination of inulin in blood and urine. *J Biol Chem* 1939 ; 127 : 609-16.
- Corcoran AC, Page IH. Applications of diphenylamine in the determination of levulose in biological media. *J Biol Chem* 1939 ; 127 : 601-8.
- Harisson HE. A modification of the diphenylamine method for determination of inulin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1942 ; 49 : 111.
- Little JM. A modified diphenylamine procedure for the determination of inulin. *J Biol Chem* 1949 ; 180 : 747-54.
- Handelsman MB, Drabkin J. Use of anthrone reagent to estimate inulin in the presence of glucose. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954 ; 86 : 356-60.

20. Walser M, Davidson DG, Orloff J. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J Clin Invest* 1955 ; 34 : 1520-3.
21. Ullmann TD, Ullmann L. The determination of inulin in the presence of high glucose concentrations by the resorcinolthiourea procedure, after alkali-oxidation of the glucose. *J Lab Clin Med* 1957 ; 49 : 793-5.
22. Diggins FW, Sanderson PH. The determination of inulin by Little's method. *J Clin Pathol* 1954 ; 7 : 261-3.
23. Wright HK, Gann D. An automatic anthrone method for the determination of inulin in plasma and urine. *J Lab Clin Med* 1966 ; 67 : 689.
24. Phelps CF. The physical properties of inulin solutions. *Biochem J* 1965 ; 95 : 41-7.
25. Little JM. Determination of inulin in the presence of high glucose concentrations by the glucose auto-oxidation procedure. *J Lab Clin Med* 1951 ; 38 : 481-2.
26. Rolf D, Surtshin A, White HL. A modified diphenylamine procedure for fructose or inulin determination. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949 ; 72 : 351-4.
27. Roe JH. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J Biol Chem* 1934 ; 107 : 15-21.
28. Steinitz K. A colorimetric method for the determination of inulin in blood plasma and urine. *J Biol Chem* 1938 ; 126 : 589-93.
29. Hubbard RS, Loomis TA. The determination of inuline. *J Biol Chem* 1942 ; 145 : 641-5.
30. Roe JH, Epstein JH, Goldstein NP. A photometric method for the determination of insulin in plasma and urine. *J Biol Chem* 1949 ; 178 : 839-45.
31. Schreiner GE. Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950 ; 74 : 117-20.
32. Preedy JR. A method for the estimation of inulin in plasma and urine containing dextran. *J Biol Chem* 1954 ; 210 : 651-5.
33. Froesch ER, Reardon JB, Renold AE. The determination of inulin in blood and urine using glucose oxidase for the removal of interfering glucose. *J Lab Clin Med* 1957 ; 50 : 918-21.
34. Fjeldbo W, Stamey TA. Adapted method for determination of inulin in serum and urine with an Auto Analyzer. *J Lab Clin Med* 1968 ; 72 : 353-8.
35. Dawborn JK. Application of Heyrovsky's inulin method to automatic analysis. *Clin Chim Acta* 1965 ; 12 : 63-6.
36. Wilson BW, Stacy BD, Thorburn GD. Automated determination of inulin in the estimation of glomerular filtration rate. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1969 ; 47 : 113-23.
37. Steele TH. A modified semi-automated resorcinol method for the determination of inulin. *Clin Chem* 1969 ; 15 : 1072-8.
38. Torelli JA, Middleton B, Stein RM. Elimination of glucose interference and improved precision in a continuous-flow analysis for inulin. *Clin Chem* 1977 ; 23 : 1324-5.
39. Erman A, van Dyk DJ, Pansky R, Wittenberg C, Boner G, Rosenfeld JB. Glucose interferes with inulin determination by the resorcinol method : overestimation of glomerular filtration rate in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1990 ; 190 : 115-7.
40. Morris DL. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science* 1948 ; 107 : 254-5.
41. Young MK, Jr., Raisz LG. An anthrone procedure for determination of inulin in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952 ; 80 : 771-4.
42. Young MK, Jr., Prudden JF. Simultaneous determination of sucrose and inulin in biologic fluids. *J Lab Clin Med* 1954 ; 44 : 160-5.
43. Handelsman MB, Sass M. The use of capillary blood for estimating renal clearance of inulin and glucose excretion by means of an anthrone procedure. *J Lab Clin Med* 1956 ; 48 : 759-68.
44. White RP, Samson FE, Kan L. Determination of inulin in plasma and urine by use of anthrone. *J Lab Clin Med* 1954 ; 43 : 475.
45. Davidson WD, Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 1963 ; 62 : 351-6.
46. Lentjes EG, Florijn KW, Chang PC, van Dam W. Inulin measurement in serum and urine with an autoanalyser, corrected for glucose interference. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994 ; 32 : 625-8.
47. Florijn KW, Barendregt JN, Lentjes EG, van Dam W, Prodjosudjadi W, van Saase JL, et al. Glomerular filtration rate measurement by "single-shot" injection of inulin. *Kidney Int* 1994 ; 46 : 252-9.
48. Heyrovsky A. A new method for determination of inulin in plasma and urine. *Clin Chim Acta* 1956 ; 1 : 470-4.
49. Yatzidis H. Letter : Simplified determination of plasma inulin in testing kidney function. *Clin Chem* 1976 ; 22 : 1239.
50. Rose GA. Measurement of glomerular filtration rate by inulin clearance without urine collection. *Br Med J* 1969 ; 2 : 91-3.
51. Looye A. Automated simultaneous determination of p-acetylaminohippurate and inulin in serum. *Clin Chem* 1970 ; 16 : 753-5.
52. Levine VE, Becker WW. The determination of inulin in blood and in urine by means of vanillin in acid medium. *Clin Chem* 1959 ; 5 : 142-8.
53. Galli A. Dosage colorimétrique de l'inuline dans le sang et les urines. *Pathol Biol* 1966 ; 14 : 991-3.
54. Krees SV, Baukal AJ, Wolff FW. A semiautomated method for the simultaneous colorimetric determination of inulin and p-aminohippuric acid in blood and urine. *Am J Clin Pathol* 1967 ; 48 : 95-9.
55. Davidson WD, Sackner MA, Davidson MH, Ause M, Lavine A. Use of gel filtration to remove chemically interfering glucose from blood and urine containing inulin. *J Lab Clin Med* 1963 ; 62 : 501-5.
56. Jacobsson L. Determination of inulin in diabetics and in subjects with advanced renal failure. *Clin Chim Acta* 1962 ; 7 : 180-2.
57. Dall'Amico R, Montini G, Pisanello L, Piovesan G, Bottaro S, Cracco AT, et al. Determination of inulin in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995 ; 672 : 155-9.
58. Day DF, Workman WE. A simple inulin assay for renal clearance determination using an immobilized beta-fructofuranosidase. *Ann N Y Acad Sci* 1984 ; 434 : 504-7.
59. Jeffery J, Jorvall H. Sorbitol dehydrogenase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1988 ; 61 : 47-106.

60. Dalton RN, Turner C. A sensitive and specific method for the measurement of inulin. *Ann Clin Biochem* 1987 ; 24 : S1.
61. Degenaar CP, Frenken LAM, van Hooff JP. Enzymatic method for determination of inulin. *Clin Chem* 1987 ; 33 : 1070-1c.
62. Jung K, Klotzek S, Schulze BD. Refinements of assays for low concentrations of inulin in serum. *Nephron* 1990 ; 54 : 360-1.
63. Wong EC, Wilhite TR, Miller R, Smith CH, Landt M. Less expensive enzymatic analysis for inulin with a kinetic assay. *Clin Chem* 1994 ; 40 : 1788-9.
64. Soper CP, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic inulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995 ; 33 : 497-501.
65. Soper CP, Xavier FR, Barron JL. Effect of pathological sera upon fully automated enzymatic inulin assay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996 ; 34 : 275.
66. Sugita O, Tomiyama Y, Matsuto T, Okada M, Gejyo F, Arakawa M, *et al.* A new enzymatic method for the determination of inulin. *Ann Clin Biochem* 1995 ; 32(Pt 6) : 561-5.
67. Kimata S, Mizuguchi K, Hattori S, Teshima S, Orita Y. Evaluation of a new automated, enzymatic inulin assay using D-fructose dehydrogenase. *Clin Exp Nephrol* 2009 ; 13 : 341-9.
68. Dubourg L, Hadj-Aissa A, Ferrier B. Adaptation of an enzymatic polyfructosan assay to clinical practice. *Anal Biochem* 2010 ; 405 : 266-8.
69. Baccard N, Hoizey G, Frances C, Lamiabie D, Trenque T, Millart H. Simultaneous determination of inulin and p-aminohippuric acid (PAH) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 1999 ; 124 : 833-6.
70. Oettl K, Payerl D, Zitta S, Muller T, Estelberger W, Reibnegger G. Quantitative analysis of sinistrin in serum with high-performance liquid chromatography for renal function testing. *Anal Biochem* 2004 ; 331 : 183-8.
71. Ruo TI, Wang Z, Dordal MS, Atkinson AJ, Jr. Assay of inulin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Clin Chim Acta* 1991 ; 204 : 217-22.
72. Sechaud R, Decosterd LA, Pechere-Bertschi A, Biollaz J, Kesselring UW. Determination of the polyfructosansinistrin in biological fluids by CLHP with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 1996 ; 14 : 483-90.
73. Marsilio R, Naturale M, Manghi P, Montini G, Murer L, Ros M, *et al.* Rapid and simple determination of inulin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000 ; 744 : 241-7.
74. Pastore A, Bernardini S, Dello SL, Rizzoni G, Cortese C, Federici G. Simultaneous determination of inulin and p-aminohippuric acid in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 ; 751 : 187-91.
75. Cavalier E, Rozet E, Dubois N, Charlier C, Hubert P, Chapelle JP, *et al.* Performance of iothexol determination in serum and urine by CLHP : Validation, risk and uncertainty assessment. *Clin Chim Acta* 2008 ; 396 : 80-5.
76. Seronie-Vivien S, Pieroni L, Galteau MM, Carlier MC, Hanser AM, Cristol JP. Evolution des modalités d'évaluation de la fonction rénale basée sur la créatinine entre 2005 et 2008 : conséquences pour les biologistes. *Ann Biol Clin (Paris)* 2008 ; 66 : 263-8.
77. Levey AS, Madaio MP, Perrone RD. Laboratory assessment of renal disease : clearance, urinalysis, and renal biopsy. In : Brenner BM, Rector FC, eds. *The kidney*. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1991 : 919-68.