



**THÈSE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

Spécialité :  
**Biochimie Médicale**

Présentée par :  
**Karène SAINT-ALBIN**

Pour obtenir le grade de :  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

Sujet de la thèse :

**Fiabilité des analyses médicales : Démonstration et application au dosage du glucose**

Devant le jury composé de :

M. François-Xavier MAQUART	Président du jury
Mme Martine POTIN-GAUTIER	Rapporteur
M. Jacques DE GRAEVE	Rapporteur
M. Philippe GILLERY	Directeur de Thèse
Mme Béatrice LALERE	Examineur
M. Vincent DELATOUR	Examineur

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire - CNRS UMR 6198  
UFR Médecine – Université de Reims Champagne-Ardenne

Equipe de métrologie chimique organique et biomédicale  
Laboratoire national de métrologie et d'essais  
1 rue Gaston Boissier – 75724 Paris Cédex 15



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous mes encadrants au cours de cette thèse :

Monsieur le Professeur Philippe Gillery, directeur de thèse, pour son suivi et surtout sa disponibilité. J'ai pu bénéficier de ses connaissances et de sa grande compétence tout au long de ces trois années de thèse.

Madame Béatrice Lalere, mon encadrante au sein du LNE, pour sa disponibilité et ses bons conseils.

Monsieur Vincent Delatour, co-encadrant au sein du LNE, pour son aide qui a été précieuse surtout en fin de thèse. J'ai pu bénéficier de ses nombreux et précieux conseils. Je n'oublie pas bien sûr, la bonne ambiance dans le bureau que nous partageons et le travail en équipe qui fut efficace et toujours dans la bonne humeur.

Monsieur Stéphane Jaisson, pour son encadrement lors de mes déplacements au laboratoire du Professeur Gillery.

Monsieur Marc Priel, pour m'avoir fait confiance, et impliquée rapidement dans la vie et la pérennité de mon sujet de thèse dès le début.

Madame Sophie Vaslin-Reimann, pour sa présence et son importante implication dans mon projet de thèse.

Je tiens également à remercier ceux sans qui tout cela ne serait pas : mon père et ma mère. Ils m'ont toujours donné les moyens de mes ambitions. Ils m'ont appris la persévérance, le travail, le courage, la joie de vivre et la modestie... Merci d'avoir fait de moi qui je suis et permis de faire ce que je fais...

Je remercie ma famille, mes amis. Surtout, je remercie Odile et Régis, car leur soutien a été infaillible et très constructif pendant cette thèse.

Merci aux anciennes copines de fac qui ne rataient jamais une occasion de m'encourager : Chami, Kahina, Nathalie, Hélène... Leur soutien fut un réconfort.

Pour leur accompagnement au quotidien, je remercie l'ensemble du personnel de la Métrologie chimique et organique du LNE Paris :

Je tiens particulièrement à remercier mes supportrices de toujours, Mme Caroline Oster et Mme Maryline Peignaux, qui m'ont été d'un très grand soutien dans les bons et les mauvais moments de la vie de doctorante. Je n'oublierai pas nos instants de franche rigolade qui ont ramené une touche de fantaisie dans ce long parcours de thèse. Une mention supplémentaire est accordée à Mme Peignaux, pour son aide en laboratoire, ses formations et le fait que j'ai pu profiter de sa grande expérience et son sens de l'organisation et de la précision.

Sans oublier Rachel Champion qui fut également d'un grand soutien.

Je n'oublie pas Véronique Lediouren, Khadija El Mrabet, Carole Robcis, Sandrine Tome avec lesquelles j'ai pu partager de très bons moments durant ma thèse.

Merci à tous les autres pour la bonne entente au quotidien, il n'y a rien de mieux pour travailler ; Chantal, Marinette, Christelle, Julie, Pierre-Olivier, Petru, Daniella, Enrica, Sébastien, Adrien, Julien, Fabrice...et plein d'autres encore que je n'oublie pas et que je remercie chaleureusement.

Ma thèse étant le fruit d'une collaboration entre le LNE et le CHU de Reims, je remercie toute l'équipe du laboratoire de biologie et de recherche pédiatrique :

Merci à madame Roselyne Garnotel pour ses conseils avisés, son aide qui fut précieuse et sa gentillesse. Merci à madame Marcelle Tonye-libyh pour son aide. Je remercie également Marie-Alix, Dominique, pour leur accueil, leur aide et les séances de brainstorming...Merci à Adèle, mon ancienne compagne doctorante, pour sa bonne humeur.

Je tiens à remercier également toutes les techniciennes et les secrétaires de cette chaleureuse équipe : Nathalie, Elisabeth et bien d'autres...

*à mes grands parents, partis de rien...  
à Samuel, car il avait raison...*

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	12
<b>Partie A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	17
<b>I - Assurance qualité en biologie médicale</b> .....	18
I-1 Enjeux relatifs à la fiabilité des analyses médicales .....	18
I-2 Organisation des contrôles de qualité en France.....	19
I-2-1 Contrôles internes et contrôles externes de la qualité.....	19
I-2-1-1 <i>Les contrôles de qualité interne</i> .....	20
I-2-1-2 <i>Les évaluations externes de la qualité</i> .....	20
I-2-2 Accréditation des laboratoires de biologie médicale .....	22
I-3 Valeur ajoutée d'un apport métrologique en biologie médicale .....	26
<b>II - Diabète sucré et métabolisme du glucose en physiopathologie</b> .....	29
II-1 Les chiffres-clés.....	29
II-2 Définition du diabète sucré.....	30
II-3 Classification des diabètes sucrés.....	30
II-3-1- Diabète de type 1 .....	31
II-3-2 Diabète de type 2.....	31
II-4 Métabolisme glucidique physiologique et au cours du diabète sucré.....	32
II-4-1 Classification des glucides .....	32
II-4-1-1 <i>Les oses simples</i> .....	32
II-4-1-1-1 <i>Stéréoisomérisation et épimérisation : série D et L</i> .....	32
II-4-1-1-2 <i>Cyclisation, anomères et mutarotation</i> .....	35
II-4-1-1-3 <i>Conformations «chaise» et «bateau»</i> .....	36
II-4-1-2 <i>Les oligosides</i> .....	36
II-4-1-3 <i>Les polysides</i> .....	36
II-4-1-3-1 <i>Les polysides homogènes</i> .....	36
II-4-1-3-2 <i>Les polysides hétérogènes</i> .....	37
II-4-1-3-3 <i>Les glycoprotéines et les glycolipides</i> .....	37
II-4-2- Métabolisme du glucose .....	37
II-4-2-1 <i>La glycolyse</i> .....	37
II-4-2-2 <i>Néoglucogenèse et métabolisme du glycogène</i> .....	39
II-4-2-2-1 <i>La Néoglucogenèse</i> .....	39
II-4-2-2-2 <i>Le métabolisme du glycogène</i> .....	40
II-4-2-3 <i>Régulation coordonnée de la néoglucogenèse, de la glycolyse et du métabolisme du glycogène</i> .....	41
II-4-3- Glycation non enzymatique des protéines et hémoglobine glyquée .....	41
II-4-3-1 <i>Glycation des protéines</i> .....	41
II-4-3-1-1 <i>Etapas de la glycation</i> .....	42
Méthylglyoxal lysine dimère (MOLD).....	43
Carboxyméthyllysine (CML) .....	43
Pentosidine .....	43
II-4-3-1-2 <i>Glycation et oxydation</i> .....	44
II-4-3-1-3 <i>Récepteurs et des produits avancés de glycation</i> .....	46
II-4-3-2 <i>Hémoglobine glyquée et HbA<sub>1c</sub></i> .....	47
II-4-4-1 <i>Les complications macroangiopathiques</i> .....	52
II-4-4-2 <i>Les complications microangiopathiques</i> .....	52
II-4-4-2-1 <i>La rétinopathie diabétique</i> .....	52
II-4-4-2-2 <i>La néphropathie diabétique</i> .....	53
II-4-4-3 <i>Les complications neuropathiques</i> .....	53
<b>III – Méthodes de détermination du glucose</b> .....	54
III-1 Méthodes de référence pour la détermination du glucose .....	54
III-1-1 Méthode de référence reposant sur deux réactions enzymatiques avec détection finale par spectrophotométrie d'absorption .....	55

III-1-2 Méthodes de référence reposant sur la Dilution Isotopique associée à la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (DI/GC-MS).....	56
III-1-2-1 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de 1,2 :5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (DAG) [68] .....	59
III-1-2-2 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de $\alpha$ -D-glucofuranose cyclique 1,2 : 3,5-bis(butylboronate)-6-acétate (BBA) [68] .....	60
III-1-2-3 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de Glucose penta acétate aldonitrilé (GPA) [69] .....	62
III-1-2-4 Synthèse des différentes méthodes de référence reposant sur la DI-CG/SM.....	64
III-2 Les techniques et méthodes de quantification du glucose en routine.....	65
III-2-1- Méthodes utilisant l'hexokinase .....	65
III-2-2- Méthodes utilisant la glucose oxydase .....	66
III-2-2-1 Détection par spectrophotométrie d'absorption .....	66
III-2-2-2 Détection avec une électrode à oxygène .....	67
III-2-3- Traitement du signal.....	67
<b>B – PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>70</b>
<b>I - Détermination du glucose par DI-CG/SM</b> .....	<b>71</b>
I-1 Matériel et Méthodes .....	71
I-1-1 Sélection de la méthode de référence .....	71
I-1-2 Protocole de préparation des échantillons .....	72
I-1-2-1 Ajout de molécule marquée .....	72
I-1-2-2 Déprotéinisation des échantillons .....	72
I-1-2-3 Réactions de dérivation.....	72
I-1-2-3-1 Réaction d'aldonitration.....	73
I-1-2-3-2 Réaction d'acétylation .....	74
I-1-2-3-3 Changement de solvant .....	74
I-I- 3 Analyse en GC/MS.....	74
I-I- 3-1 Conditions en chromatographie gazeuse.....	74
I-I- 3-1-1 Choix de la colonne chromatographique .....	74
I-I-3-1-2 Injecteur.....	75
I-I- 3-1-3 Programmation de la température du four.....	75
I-1-3-2 Conditions en spectrométrie de masse .....	75
I-1-4 Produits et matériel.....	76
I-1-4-1 Produits purs .....	77
I-1-4-2 Solutions mères de glucose et de glucose marqué .....	77
I-1-4-3 Solutions étalons .....	77
I-1-4-4 Matériau de référence .....	78
I-1-4-5 Echantillons sériques .....	78
I-1-4-6 Réactifs .....	78
I-1-4-7 Matériel .....	79
I-2 Optimisation de la méthode .....	82
a) Préparation des échantillons .....	82
1 .....	82
Dilution isotopique .....	82
I- 2- 1 Optimisation de la séparation chromatographique .....	83
I-2-1-1 L'injection avec division (split).....	83
I-2-1-2 Programmation en température du four .....	87
I-2-2 Optimisation des paramètres d'acquisition du spectromètre de masse.....	91
I-2-3 Optimisation de la préparation des échantillons .....	93
I-2-3-1 Addition de [ $^{13}$ C <sub>6</sub> ]-glucose (dilution isotopique).....	93
I-2-3-2 Déprotéinisation des échantillons .....	94
I-2-3-3 La dérivation des échantillons .....	96
I-2-3-4 Effet fournisseur pour le D-glucose .....	98
I - 3 - Validation de la méthode.....	100
I-3-1 Spécificité et sélectivité.....	100
I-3-2 Linéarité.....	101

I-3-2-1 Gamme d'étalonnage et résultats .....	101
I-3-2-2 Test d'adéquation du modèle .....	102
I-3-3 Détermination des limites de détection $L_D$ et de quantification $L_Q$ .....	104
I-3-3-1 Limite de détection .....	104
I-3-3-2 Limite de quantification .....	106
I-3-4 Etude de la fidélité intermédiaire.....	107
I-3-5 Etude de justesse.....	108
I-3-6 Robustesse .....	109
I-3-7 Evaluation des incertitudes.....	110
I-3-7-1 Modélisation du processus de mesure.....	111
I-3-7-2 Evaluation des incertitudes-types sur les grandeurs d'entrée du modèle .....	111
I-3-7-3 Propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées.....	112
I-3-7-4 Expression de l'incertitude élargie : .....	113
<b>II- Participation à des essais inter laboratoires .....</b>	<b>116</b>
II-1 Informations relatives aux essais inter laboratoires.....	117
II-1-1 Echantillons reçus et laboratoires participants .....	117
II-1-2- Méthodes utilisées par les laboratoires participants.....	118
II-2 Résultats .....	121
II-3 Analyse des résultats et discussion .....	123
II-3-1 Mise en évidence d'un effet matrice (EIL du CTCB) .....	123
II-3-2 Analyse des résultats par méthode utilisée (EIL du CTCB).....	124
II-3-3 Analyse des résultats par méthode et par couple « appareil / fournisseur du réactif » (CNQ AFSSAPS).....	127
II-3-4 Effet de la concentration sur la justesse des résultats.....	131
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>134</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>149</b>

## Liste des abréviations et annotations

**AFSSAPS** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**AGE** : Advanced glycation end products

**Asqualab** : Assurance qualité des laboratoires d'analyses de biologie médicale

**AMP** : Adénosine monophosphate

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BBA** :  $\alpha$ -D-glucofuranose cyclique 1,2 : 3,5-bis(butylboronate)-6-acétate

**BIPM** : Bureau International des Poids et Mesures

**CCQM** : Comité consultatif pour la quantité de matière – métrologie en chimie

**CDC** : Center for disease control and prevention

**CIPM** : Comité International des Poids et Mesures

**CG/SM** : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**CML** : Carboxyméthyllysine

**Cofrac** : Comité français d'accréditation

**CQI** : Contrôle de la qualité interne

**CNQ** : Contrôle national de qualité

**CTCB** : Centre toulousain pour le contrôle qualité en biologie clinique

**CV** : Coefficient de variation

**DI-CG/SM** : Dilution isotopique associée à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**DAG** : 1,2 : 5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose

**EIL** : Essai inter laboratoires

**EEQ** : Evaluation externe de la qualité

**ENIVD** : European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases

**GBEA** : Guide de Bonne Exécution des Analyses

**GPA** : Glucose penta acétate aldonitrilé

**GPA\*** : Glucose penta acétate aldonitrilé marqué

**G6PDH** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

**GOD** : Glucose oxydase

**Glc** : Glucose

**Glc\*** : Glucose marqué

**GUM** : Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure

**HPST** : « Hôpital, patients, santé et territoires »

**HbA1c** : Hémoglobine glyquée A<sub>1c</sub>

**HHS** : Department of health and human services

**HGPO** : Hyperglycémie provoquée par voie orale

**IFCC** : International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

**ILAC** : International Laboratory Accreditation Cooperation

**JCTLM** : Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine

**LBM** : Laboratoire de biologie médicale

**LDL** : Lipoprotéine de faible densité

**LNM** : Laboratoire national de métrologie

**L<sub>D</sub>** : Limite de détection

**L<sub>Q</sub>** : Limite de quantification

**MR** : matériau de référence

**MRC** : matériau de référence certifié

**MOLD** : méthylglyoxal lysine dimère

**MGO** : méthylglyoxal

**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénosine dinucléoside

**NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénosine dinucléoside phosphate

**NIST** : National institute of standards and technology

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PIB** : Produit intérieur brut

**Pro Bio Qual** : Association pour la promotion du contrôle de qualité en biologie

**POD** : Péroxydase

**QCMD** : Quality Control for Molecular Diagnostics

**RAGE** : Récepteur des AGE

**SI** : système international d'unités

**SRM** : Standard Reference material

**UK Nequas** : United Kingdom National External Quality Assessment Service

**VIM** : Vocabulaire international de la métrologie

# INTRODUCTION

Dans un rapport récent « Rapport du Groupe de travail sur la métrologie du futur », l'Académie des technologies soulignait la croissance et l'importance des analyses de biologie. Elles représentent environ 2% des dépenses de santé en France, d'où l'intérêt de disposer de résultats fiables (justes et dont l'incertitude serait maîtrisée).

Actuellement, on constate que, contrairement aux autres domaines de la mesure, les résultats des analyses de biologie médicale ne sont pas toujours traçables à des références reconnues internationalement (comme par exemple des matériaux de référence certifiés ou des méthodes de référence) et que les incertitudes de mesure ne sont pas systématiquement évaluées, ce qui peut conduire à un manque de confiance dans les résultats.

Cette situation peut amener à répéter inutilement des analyses, à ne pas disposer de données fiables pour les études épidémiologiques et à n'avoir que peu de moyens de comparer des études cliniques entre elles faute de références communes et en l'absence d'une évaluation des incertitudes.

La qualité des résultats d'analyse est donc essentielle, à la fois pour des raisons thérapeutiques mais également pour l'utilisation de ces résultats dans des études épidémiologiques. Les dosages de glycémie utilisés pour le diagnostic du diabète et son suivi s'effectuent selon les cas par auto-surveillance ou au laboratoire. Il est donc indispensable de disposer de contrôles de la qualité des analyses pratiques. Aussi, **le premier chapitre de ce manuscrit de thèse aura pour objectif de décrire l'organisation des contrôles de la qualité en France.** Les laboratoires de biologie médicale doivent répondre aux exigences de différents référentiels internationaux, comme par exemple la norme internationale ISO 15189 « Laboratoire d'analyse de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence », la norme ISO 17511 « Mesurage des grandeurs dans des échantillons d'origine biologique – Traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux agents d'étalonnage et aux matériaux de contrôle » ou encore le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA). Les exigences de ces différents référentiels seront décrites en détail et une attention toute particulière sera portée à la norme ISO 15189. Les laboratoires de biologie médicale accrédités selon ce référentiel ne sont actuellement qu'une centaine en France (sur plus de 4000 laboratoires) mais la réforme de la biologie médicale qui entrera en application en 2010 prévoit de rendre obligatoire l'accréditation de l'ensemble des laboratoires selon ce référentiel, qu'ils soient privés ou hospitaliers. Nous verrons en quoi ce travail de thèse concourt à fournir à l'ensemble des professionnels de santé concernés des outils permettant d'améliorer la qualité des analyses pratiquées, une des principales exigences de la norme ISO 15189.

Il concerne en particulier le développement de matériaux de référence et la fourniture de valeurs de référence pour les échantillons utilisés dans le cadre des évaluations externes de la qualité. En effet, dans les essais d'aptitude organisés actuellement, la valeur de référence adoptée est très souvent la valeur moyenne de tous les participants. Cette façon de pratiquer est la conséquence de l'absence de valeurs de référence réellement traçables aux unités du Système International d'unités SI.

Actuellement, des démarches importantes sont entreprises à l'échelle internationale pour assurer la traçabilité des analyses à des références reconnues au plan international afin de permettre la comparabilité des résultats et donner des fondements scientifiques aux études épidémiologiques. En outre, de nombreuses réglementations telles que la directive IVD de l'Union européenne exigent que les produits de diagnostic *in vitro* soient traçables aux étalons de mesure d'ordre métrologique supérieur. Pour répondre à ces préoccupations, le JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine) a été créé en 2002 par le Comité International des Poids et Mesures (CIPM), l'International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) et l'International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Le JCTLM est constitué de deux groupes de travail visant, d'une part à l'élaboration de deux listes (méthodes de référence et matériaux de référence) et, d'autre part, à l'identification de laboratoires de référence au plan international. Actuellement, on dénombre environ 400 matériaux de référence et 150 méthodes de référence, pour des entités chimiques et biologiques dont le mesurande peut être clairement défini et dont les valeurs peuvent être traçables aux unités du système international. Cette liste comporte des électrolytes, des enzymes, des hormones, des acides nucléiques, des médicaments, des protéines et des métabolites.

La France est membre du JCTLM à travers son Laboratoire national de métrologie, mais était absente des activités techniques de ce comité international jusqu'à l'initiation du présent travail de thèse. Les contacts établis avec différents hôpitaux et avec les autorités de santé publique ont mis en évidence que le LNE avait très certainement un rôle fédérateur à jouer dans le développement et l'utilisation de méthodes de référence et le développement de matériaux de référence avec l'objectif d'améliorer la qualité des résultats.

Il est évident qu'il n'est pas possible de mettre en place rapidement des méthodes de référence pour l'ensemble des analyses biologiques (environ 500 analytes). Une étape en amont de la thèse a donc consisté à établir une première liste d'analytes pouvant être considérés comme prioritaires, c'est à dire ayant un intérêt élevé en biologie clinique et pour lesquels un apport métrologique constitue une réelle valeur ajoutée. Ce choix a également été effectué en prenant en compte la faisabilité technique, c'est à dire en considérant les compétences existant au LNE en matière d'analyse chimique et biologique. Il faut en effet garder présent à l'esprit que la métrologie

en biologie est une discipline relativement récente qui ne concerne actuellement qu'un nombre restreint de laboratoires nationaux de métrologie : les méthodes de référence développées jusqu'à présent dans les autres laboratoires nationaux de métrologie concernent essentiellement des petites molécules, dont le dosage est plus simple à mettre en œuvre que des composés complexes comme les protéines ou les acides nucléiques. Ainsi, dans le cadre du BIPM, des campagnes CCQM ont tout d'abord porté sur l'analyse du glucose, de la créatinine et du cholestérol dans le sérum humain. Ces analytes constituent d'une certaine manière les trois biomarqueurs incontournables sélectionnés par le CCQM pour évaluer la capacité d'un laboratoire à développer des méthodes de référence et des matériaux de référence pour d'autres biomarqueurs et en particulier des petites molécules.

Le choix du premier projet mené au LNE dans le domaine biomédical s'est finalement porté sur le dosage du glucose, le développement de méthodes de référence pour le dosage de la créatinine et du cholestérol ayant été initié par la suite. **Le second chapitre du manuscrit aura donc pour vocation de décrire en détail les enjeux liés à la mesure de la glycémie en biologie clinique et d'une manière plus générale les enjeux sanitaires relatifs au diagnostic du diabète et au suivi des patients.** Nous verrons notamment que le diabète de type 2 est une maladie chronique et évolutive, qui représente une véritable épidémie liée à la transformation du mode de vie et à l'allongement de l'espérance de vie. La morbidité et la mortalité cardiovasculaires des patients atteints de cette pathologie sont multipliées par un facteur 2 à 3. En outre, plus de 35 % des patients diabétiques de type 2 présentent une rétinopathie après 20 ans d'évolution. Cette maladie constitue aujourd'hui la première cause de mise en dialyse en France, pathologie dont le coût est estimé à 1,5 milliards d'euros par an. A l'heure actuelle, le diagnostic de diabète de type 2 est souvent trop tardif : 50 % des patients récemment diagnostiqués présentent déjà des complications micro ou macrovasculaires.

**Le troisième chapitre du manuscrit aura pour objectif de décrire d'une part les méthodes de référence existantes pour le dosage du glucose dans le sérum sanguin et d'autre part les méthodes les plus utilisées en routine.** Afin d'assurer la traçabilité des analyses à des références reconnues internationalement et de permettre la comparabilité des résultats, des accords internationaux sont intervenus très récemment sur le choix des méthodes de référence permettant d'atteindre les meilleures exactitudes. Celles-ci font appel à des méthodes métrologiques rarement disponibles dans les laboratoires de biologie médicale, même dans le milieu hospitalier, alors que ces moyens et ces compétences sont présents dans les Laboratoires Nationaux de Métrologie ayant développé une activité de métrologie chimique fondamentale. Les méthodes de référence pour le dosage du glucose ayant fait l'objet d'un consensus au plan international sont référencées par le JCTLM (*Tableau 1*).

**Tableau 1: Ensemble des méthodes en DI-CG/SM préconisées par le JCTLM**  
<http://www.bipm.org/jctlm/>



**Base de données de matériaux/méthodes  
de mesure/procédures et services de  
référence d'ordre supérieur**



<b>Méthodes de dilution isotopique / spectrométrie de masse pour le glucose dans le sérum sanguin</b>	
<b>➤ DGKL: Méthode de référence pour le glucose</b>	
Matrice(s) applicable(s)	lyophilisée, fraîche ou congelée
Description complète de technique(s)	DI/CG/SM
Quantité	Concentration en quantité de substance
Intervalles applicables	0,5 mmol/l à 20 mmol/l
Incertitude attendue (niveau de confiance 95%)	Jusqu'à 1% [dépende de la matrice et des propriétés spécifiques de l'analyte]
Références	<i>Biomedical Mass Spectrometry, 1982, 9 345-405</i>
Commentaires	L'incertitude étendue est relative
Numéro d'identification DB JCTLM	C3RMMP19
<b>➤ NIST: méthode définitive pour le glucose sérique</b>	
Matrice(s) applicable(s)	lyophilisée, fraîche ou congelée
Description complète de technique(s)	DI/CG/SM
Quantité	Concentration en quantité de substance
Intervalle applicable	2 mmol/l à 20 mmol/l
Incertitudes attendues (niveau de confiance 95%)	0.5 % à 1.5 %
Références	<i>Biomedical Mass Spectrometry, 1982, 9 345-405</i>
Etudes d'évaluation de la comparabilité	<i>Metrologia, 2003, 40, Tech.Suppl., 08003</i>
Commentaires	L'incertitude étendue est relative
Numéro d'identification DB JCTLM	NRMeth 80
<b>➤ Université de Gand : méthode de référence pour le glucose</b>	
Matrice(s) applicable(s)	lyophilisée, fraîche ou congelée
Description complète de technique(s)	DI/CG/SM
Quantité	Concentration en quantité de substance
Intervalle applicable	1 mmol/l à 20 mmol/l
Incertitudes attendues (niveau de confiance 95%)	1 % à 2 %
Références	<i>Clin. Chem., 1993, 39, 1001-1006</i> <i>Clin. Chem., 1993, 39, 993-1000</i> <i>Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1996, 34, 853-860</i>
Etudes d'évaluation de la comparabilité	EUROMET 563
Commentaires	L'incertitude étendue est relative
Numéro d'identification DB JCTLM	NRMeth 4

Ces trois techniques reposent sur la dilution isotopique, une méthode primaire de haute exactitude permettant de s'affranchir des effets de matrice et d'obtenir de très faibles incertitudes. Une première étape du travail de thèse a donc consisté à sélectionner l'une de ces méthodes.

**Un quatrième chapitre s'attachera à décrire le développement, l'optimisation et la validation de la méthode sélectionnée. Un cinquième chapitre concernera la participation à des essais interlaboratoires** pour lesquels des valeurs de référence seront établies par utilisation des méthodes de référence développées et validées.

Ces résultats seront ensuite discutés et mis en perspective, notamment en proposant des pistes à suivre pour le développement de méthodes de référence concernant d'autres analytes mesurés en Biologie Médicale.

## **Partie A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **I - Assurance qualité en biologie médicale**

## **I-1 Enjeux relatifs à la fiabilité des analyses médicales**

Dans le rapport « *The value of diagnostics : innovation, adoption and diffusion into health care* » publié en juillet 2005, le Lewin group souligne que 60 à 70% des prises de décisions médicales s'appuient sur le résultat de tests de diagnostic *in vitro* [1]. En France, la consommation de soins et de biens médicaux par les patients s'élevait en 2006 à 157 milliards d'euros, alors que les dépenses liées aux analyses médicales ne représentaient que 2,6 % de ce montant. Celles-ci constituent donc un levier potentiel. Ces données confirment des études antérieures menées à l'étranger. Ainsi, en 2001, les dépenses de santé aux États-Unis étaient estimées à 1 300 milliards de dollars par an, soit environ 14 % du PIB américain. On estime que 10 % à 15 % de ces dépenses étaient liées aux mesures. Le Washington Post et le Medical Laboratory Observer ont rapporté que 25% à 30% des mesures liées à la santé étaient effectuées pour des raisons autres que le diagnostic (répétition d'examens, prévention et détection des erreurs), ce qui correspond à 10 à 30 milliards de dollars d'économies réalisables chaque année. En Allemagne, le coût de la répétition des mesures est estimé à 1,5 milliard d'euros par an.

Ces données sont à mettre en regard de la situation inquiétante dans laquelle se trouve la Sécurité Sociale en France. Selon cet organisme, « *si l'on projette les dépenses d'assurance maladie à l'horizon 2015, sur la base des tendances observées sur la période 1998-2004, on estime qu'elles devraient atteindre 210 milliards d'euros contre 140 milliards actuellement soit une hausse de 50%. [...] L'analyse des principales dynamiques du système de santé permet d'identifier trois axes prioritaires pour faire évoluer notre système et répondre à ces enjeux-clés :*

- *Prévenir l'aggravation des pathologies chroniques*
- *Accroître l'efficience du système de soins*
- *Organiser le mode de recours aux soins en fonction des besoins des assurés »*

L'amélioration de la qualité des analyses médicales s'inscrit pleinement dans ce contexte de rationalisation des dépenses de santé. Or, en raison d'un manque de traçabilité et d'équivalence des méthodes cliniques en médecine, le nombre de patients victimes d'une erreur de diagnostic, aussi minime soit-il, est encore trop élevé.

En termes de **santé publique**, un manque de fiabilité des analyses médicales peut conduire à une prise de décision médicale inappropriée susceptible de compromettre la santé du patient : certains patients seront traités à tort, augmentant le risque de développer une maladie iatrogène. Inversement, certains patients ne seront pas traités alors que leur état de santé le nécessite.

D'un **point de vue scientifique**, le manque de données fiables pour les études épidémiologiques et les études cliniques constitue un frein à la compréhension de la pathologie et à sa prise en charge optimale par le corps médical.

D'un **point de vue économique**, le manque de fiabilité des analyses médicales conduit à une répétition inutile des analyses, ce qui génère des dépenses de santé publique évitables. A celles-ci viennent s'ajouter celles liées à la prise en charge inappropriée des patients.

Il est donc indispensable de réaliser des contrôles de la qualité pour les analyses pratiquées dans les laboratoires de biologie médicale. Les paragraphes qui suivent s'attacheront à décrire le principe de ces contrôles, qu'ils soient obligatoires ou adoptés dans le cadre d'une démarche volontaire.

## **I-2 Organisation des contrôles de qualité en France**

### **I-2-1 Contrôles internes et contrôles externes de la qualité**

Deux types d'approches qualité existent de façon complémentaire :

- les contrôles de la qualité interne (CQI) effectués par les laboratoires eux-mêmes, qui sont volontaires.
- les évaluations externes de la qualité (E.E.Q.), qui sont réalisées par des organismes extérieurs, dont certaines sont obligatoires [2].

### ***I-2-1-1 Les contrôles de qualité interne***

Les règles auxquelles doit se conformer un Laboratoire de biologie médicale sont énoncées dans le GBEA (Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale) [3]. Le GBEA est un texte réglementaire : « arrêté relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale » du 26 Novembre 1999 modifié le 26 avril 2002, s'appliquant à l'ensemble des laboratoires de biologie médicale de France, privés ou publics.

Les règles et recommandations contenues dans le guide n'ont pas pour objet d'imposer une méthode plutôt qu'une autre pour une analyse donnée : c'est au biologiste qu'incombe le choix de méthodes optimisées, utilisées dans un grand nombre de laboratoires et recommandées par les sociétés scientifiques nationales ou internationales de biologie ou, le cas échéant, validées par lui-même à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats. Ces règles et recommandations constituent le plus souvent un rappel de tout ce qu'il convient de se procurer, d'organiser, de vérifier, de respecter, d'étudier, de conserver pour obtenir l'exactitude et la précision des résultats. Selon ce guide, l'enregistrement écrit des procédures opératoires concerne toutes les étapes de l'analyse, depuis le prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats. Ces procédures opératoires associées au contrôle de qualité sont un élément du système d'assurance de qualité des laboratoires réalisant des analyses de biologie médicale. Leur mise en place peut être vérifiée par les autorités sanitaires. Les dispositions contenues dans le guide s'appliquent à l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses de biologie médicale, publics ou privés, quelle que soit la forme juridique d'exploitation.

### ***I-2-1-2 Les évaluations externes de la qualité***

Le GBEA préconise de mettre en place des contrôles externes de la qualité. L'évaluation externe de la qualité correspond au contrôle par un organisme extérieur de la qualité des résultats fournis par un laboratoire. Ce contrôle rétrospectif permet une confrontation entre les laboratoires en vue d'améliorer la qualité du travail de l'ensemble des participants. L'organisme extérieur adresse les mêmes échantillons aux différents laboratoires, collecte les résultats obtenus, en fait un traitement statistique dont le but est de définir une valeur consensuelle et sûre, puis transmet les résultats accompagnés de commentaires aux laboratoires participants.

Le principal contrôle externe est celui réalisé par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). Le contrôle national de qualité (CNQ) a pour vocation d'analyser les résultats obtenus dans l'ensemble des laboratoires de biologie médicale sur le plan national, en vue d'améliorer la qualité du service rendu par les biologistes. Tous les laboratoires sont tenus d'y participer. Tout refus ou toute insuffisance de participation peut entraîner des sanctions pénales [1, 2]. Les résultats obtenus par le laboratoire sont retournés à l'organisateur du programme, qui évalue le niveau de performance du laboratoire par rapport à ses pairs et selon les techniques et les appareils utilisés.

Parallèlement, les laboratoires ont la possibilité de participer à d'autres contrôles de qualité externes organisés par des organismes agréés. En pratique, chaque laboratoire participant reçoit des échantillons sur lesquels doivent être déterminés un ou plusieurs paramètres. Sur le plan national, il existe différents organismes ayant pour objectif de promouvoir et de coordonner des programmes de contrôle et d'assurance qualité destinés aux laboratoires d'analyses de biologie médicale :

- le CTCB (Centre toulousain pour le contrôle qualité en biologie clinique),
- Pro Bio Qual (Association pour la promotion du contrôle de qualité en biologie),
- L'association Asqualab (ASSurance QUALité des LABORatoires d'analyses de biologie médicale),
- L'association « Biologie Prospective ».

Des organismes internationaux organisent également des comparaisons interlaboratoires volontaires:

- UK Neqas (United Kingdom National External Quality Assessment Service);
- ENIVD (European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases);
- QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics);
- OMS (Organisation mondiale de la santé).

## **I-2-2 Accréditation des laboratoires de biologie médicale**

L'accréditation est une procédure visant à reconnaître la compétence technique d'un laboratoire pour effectuer des tâches spécifiques. C'est une démarche volontaire du laboratoire. En France, seul le **Cofrac** (comité français d'accréditation) est habilité à accréditer les LBM [4].

Actuellement, l'accréditation n'est pas délivrée pour l'ensemble des activités du laboratoire mais par champ d'activité (biochimie, hématologie...). C'est le biologiste qui choisit les analyses à accréditer, ainsi que la portée de l'accréditation, c'est-à-dire la description des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité (champ ou domaine, produit ou matrice, grandeur ou caractéristique, méthode, technique d'essai ou de mesure). Cette disposition est amenée à évoluer prochainement dans le cadre de la réforme de la Biologie prévue par la loi HPST, rendant l'accréditation de tous les secteurs de tous les laboratoires obligatoire.

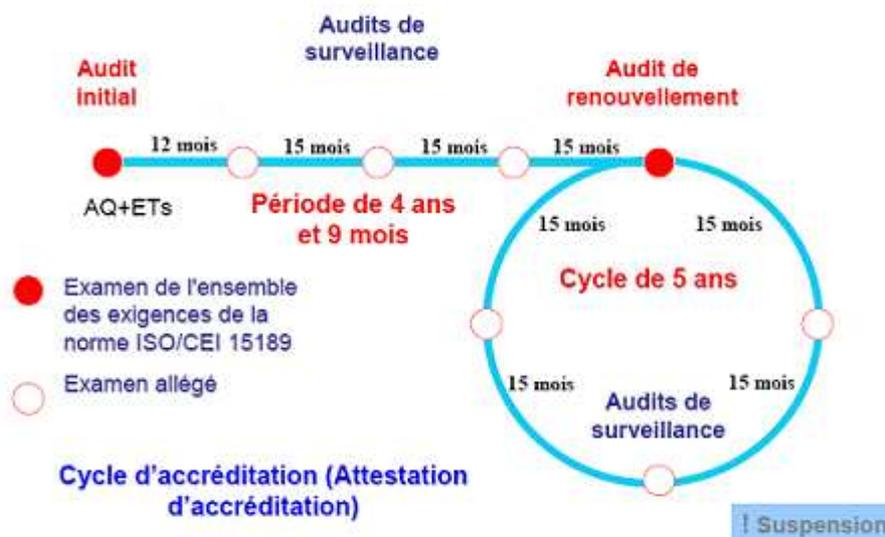
Le Cofrac met à disposition des laboratoires des guides techniques explicitant les exigences des référentiels d'accréditation, en l'occurrence les deux guides suivants:

- Guide de validation des méthodes en biologie médicale.  
Document LAB GTA 04  
Révision 00 – Juin 2004 [5]
- Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale.  
Document LAB GTA 06  
Révision 00 – Juillet 2005 [6]

Après soumission et acceptation du dossier, un audit initial est pratiqué pour s'assurer que les dispositions prises par le laboratoire sont conformes aux différentes exigences du référentiel d'accréditation. A l'issue de l'évaluation, les non-conformités sont relevées et le laboratoire doit proposer dans les jours qui suivent une action corrective aux différents écarts.

La décision d'accréditation est prise par une commission technique d'accréditation au sein du Cofrac santé, après examen du rapport d'audit. Le laboratoire récemment accrédité pour une période de 4 ans et 9 mois est soumis à des audits réguliers tous les douze ou quinze mois. Un audit

de renouvellement d'accréditation pour 5 ans est ensuite réalisé et suivi d'audits réguliers tous les quinze mois (*Figure 1*).



*Figure 1 : Périodicité des audits et cycles d'accréditation Cofrac, LAB REF 05 [5]*

Les laboratoires de biologie médicale ont le choix entre deux normes selon lesquelles ils peuvent se faire accréditer : la norme ISO 17025 : 2005 « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » [6], et la norme ISO 15189 : 2007 [7] « Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence » [8].

Ces deux normes sont assez proches, dans la mesure où chacune d'elles intègre les exigences de la certification ISO 9001 relatives au management de la qualité. Les démarches d'accréditation ont pour objectif la reconnaissance de la compétence tandis que les processus de certification visent à attester de la conformité aux exigences décrites par le référentiel.

La norme ISO 17025 : 2005 établit les exigences générales de compétence pour effectuer des essais et/ou des étalonnages, y compris l'échantillonnage. Elle couvre les essais et les étalonnages effectués au moyen de méthodes normalisées ou non et de méthodes élaborées par les laboratoires. Cette norme n'est donc pas spécifique aux laboratoires de biologie médicale.

La norme ISO 15189 : « Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence » spécifie les exigences de qualité et de

compétence spécifiques aux laboratoires d'analyses de biologie médicale. Il s'agit du premier référentiel normatif spécifique qui couvre la totalité de l'activité des laboratoires.

La norme ISO 15189 conjugue les exigences du système qualité de la norme ISO 9001 : 2000 et les exigences techniques propres aux analyses de biologie médicale. Avec une partie « Exigences relatives au management » et une partie « Exigences techniques » qui prend en compte l'ensemble de l'analyse y compris les phases pré et post analytiques, son sommaire est très voisin de celui de la norme ISO 17025. Les thèmes abordés dans la partie « Exigences relatives au management » sont déjà cités dans la norme ISO 9001 (actions préventives, actions correctives, revue de direction, audits, ...) (voir **Figure 2** ci-dessous).

- 4. Exigences relatives au management
  - 4.1 Organisation et mangement
  - 4.2 Système de mangement de la qualité
  - 4.3 Maîtrise des documents
  - 4.4 Revue de contrats
  - 4.5 Analyses transmises à des laboratoires sous-traitants
  - 4.6 Services externes et approvisionnements
  - 4.7 Prestations de conseils
  - 4.8 Traitement des réclamations
  - 4.9 Identification et maîtrise des non conformités
  - 4.10 Actions correctives
  - 4.11 Actions préventives
  - 4.12 Amélioration continue
  - 4.13 Enregistrements qualité et enregistrements techniques
  - 4.14 Audits internes
  - 4.15 Revue de direction
- 5. Exigences techniques
  - 5.1 Personnel
  - 5.2 Locaux et conditions environnementales
  - 5.3 Matériel de laboratoire
  - 5.4 Procédures pré analytiques
  - 5.5 Procédures analytiques
  - 5.6 Assurer la qualité des procédures analytiques
  - 5.7 Procédures post analytiques
  - 5.8 Compte rendu des résultats

*Figure 2 : Exigences de la norme ISO 15189[7]*

Les chapitres « Analyses transmises à des laboratoires sous-traitants », « Services externes et approvisionnement » et « Prestation de conseils » sont en revanche spécifiques de la norme ISO 15189. Les exigences techniques concernent quant à elles les procédures pré analytiques, analytiques, post analytiques et le compte-rendu des résultats, mais également le personnel, les locaux et conditions environnementales, le matériel de laboratoire [8].

Une adaptation de la norme ISO 15189 est dédiée aux laboratoires dits « de référence » (« *calibration laboratories* ») et aux instituts nationaux de métrologie : il s'agit de la norme ISO 15195 : 2003 « Médecine de laboratoire - Exigences pour les laboratoires réalisant des mesures de référence », qui décrit les exigences spécifiques requises à l'égard des laboratoires qui effectuent des mesures de référence dans le domaine de la biologie médicale.

L'ensemble de ces démarches qualité sont à l'heure actuelle volontaires. Néanmoins, la loi portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires, promulguée au Journal Officiel du 22 juillet 2009, prévoit de rendre obligatoire l'accréditation de tous les laboratoires de biologie médicale. En particulier, l'article 20 « Réforme du statut des laboratoires de biologie médicale » vise à « Mieux garantir la qualité des examens de biologie médicale, notamment en mettant en place une procédure d'accréditation des laboratoires » (publics et privés). La loi a pour objectif général de permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à juste prix dans un cadre européen [9-13]. Pour cela, il s'agit de développer la culture qualité dans le domaine de la santé et poursuivre l'effort de rationalisation des dépenses de santé qui a été initié pour préserver la pérennité du système de santé français. Afin de garantir une qualité prouvée pour les examens réalisés, l'accréditation selon la norme EN 15189 sera obligatoire pour tous les laboratoires, en ville comme à l'hôpital, et ce dans un délai de 5 ans. Les laboratoires devront faire la preuve de leur engagement dans ce processus dans les 2 ans. Ils devront non seulement être accrédités mais seront soumis à l'évaluation permanente de l'accréditation par le COFRAC avec une fréquence d'évaluation de 15 mois. Un laboratoire de biologie médicale non accrédité ou dont l'accréditation est suspendue ne pourra plus exercer son activité. Ceci se traduit par la participation des laboratoires de biologie médicale à des opérations d'évaluation externe de la qualité pour toutes les analyses réalisées.

En conclusion, les référentiels sur lesquels se basent le principe d'accréditation, les démarches de qualité interne et externe, conduisent les laboratoires d'analyses médicales à s'assurer de la fiabilité et de la traçabilité de leurs résultats. Pour cela, des méthodes de référence et des matériaux de référence seront nécessaires.

### **I-3 Valeur ajoutée d'un apport métrologique en biologie médicale**

Le 23 septembre 2008, le Dr Michel Ballereau, conseiller général des établissements de santé, a remis à Madame la Ministre de la Santé Roselyne Bachelot un rapport détaillant les réformes nécessaires au maintien de la compétitivité de la biologie médicale en France et à sa modernisation. Parmi les propositions figurant dans ce rapport, et dont certaines seront prises en compte dans l'ordonnance "Biologie" de la Loi HPST, il est indiqué que « *la réforme prévoit la définition de méthodes de références pour toutes les analyses, ce qui débute avec la définition du mètre étalon. Le laboratoire national d'essais (LNE) est désigné par les textes généraux pour cette mission* ».

Par ailleurs, le Professeur Didier Houssin (Directeur Général de la Santé) estime prioritaire « *la mise au point d'analyses de référence, couvrant pour l'instant le champ des analyses courantes pratiquées dans les laboratoires de biologie médicale, proposant pour un paramètre donné la technique de référence, permettant ensuite de définir, en accord avec les experts médicaux de la discipline, les valeurs normales* ».

Ainsi, les laboratoires peuvent fournir aux patients des résultats dont la **qualité** a été rigoureusement prouvée et dont l'incertitude est maîtrisée. Assurer la traçabilité des mesures par leur raccordement à une méthode de référence permet la comparaison des résultats d'analyses dans le temps, et ce quel que soit le laboratoire dans lequel elles ont été réalisées [14].

Disposer de méthodes et de matériaux de référence permet à la fois de réduire :

- les erreurs de diagnostic et les **prises de décisions médicales inappropriées**
- les **dépenses de santé inutiles** liées à la répétition d'analyses dont le manque de fiabilité conduit à une remise en question du résultat

Les techniques analytiques pouvant considérablement varier d'un laboratoire à un autre, il est nécessaire de disposer de références métrologiques clairement établies pour assurer la traçabilité des résultats au système international d'unités (SI). Les méthodes de référence et les matériaux de référence sont deux outils qui permettent d'atteindre cet objectif [15].

Dans le cadre des contrôles externes de la qualité, les méthodes de référence permettent de fournir des valeurs de référence traçables au SI à partir de processus analytiques présentant des qualités métrologiques élevées. Celles-ci sont démontrées par le biais d'essais inter laboratoires organisés par le Comité Consultatif pour la Quantité de Matière-Métrologie en Chimie (CCQM), auxquels participent exclusivement des instituts nationaux de métrologie [16].

Les méthodes de référence fournissent non seulement des valeurs de référence avec les incertitudes associées, mais permettent également d'assigner des valeurs aux matériaux de référence. Ces matériaux sont généralement des échantillons dont la matrice est proche de celle des échantillons du laboratoire.

On distingue les matériaux de référence (MR), qui servent à étalonner des appareils et évaluer une méthode de mesurage, et les matériaux de référence certifiés (MRC), pour lesquels des certificats sont fournis et attestent des valeurs et des incertitudes associées selon une procédure donnée. Les matériaux de référence permettent d'évaluer la justesse des méthodes d'analyse, au même titre que les essais inter laboratoires pour lesquels la valeur de référence a été déterminée en utilisant une méthode de référence [17, 18].

Dans les essais inter laboratoires actuels, la valeur de référence adoptée est le plus souvent une valeur consensuelle comme la valeur moyenne de tous les participants. Cette pratique est la conséquence de l'absence de valeurs de référence réellement traçables aux unités du système international d'unités. Or, l'évaluation des performances d'un laboratoire basée sur une comparaison dite « par groupe de pairs » peut être à l'origine d'un manque de capacité à déceler un biais systématique de l'ensemble des laboratoires ou des méthodes mises en œuvre. Elle peut aussi conduire à une conclusion erronée dans le cas où seul un faible nombre de laboratoires fournirait les résultats les plus justes : on pourrait conclure alors à un défaut de justesse de ces laboratoires en raison d'une valeur de référence elle-même biaisée.

En biologie médicale, le Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), qui réunit les métrologues, les biologistes médicaux et les organismes d'accréditation, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, a pour vocation de répertorier les différentes méthodes de référence et matériaux de référence existants [19].

Actuellement, on dénombre environ 400 matériaux de référence et 150 méthodes de référence, pour des entités chimiques et biologiques dont le mesurande peut être clairement défini et dont les valeurs peuvent être traçables aux unités du système international. Cette liste comporte des électrolytes, des enzymes, des hormones, des acides nucléiques, des médicaments, des protéines et des métabolites. Une seconde liste, en phase d'élaboration, devrait comprendre des analytes dont la traçabilité au SI n'est pas établie, mais qui font l'objet d'un consensus.

Dans ce projet de thèse, il s'agit de participer à cette volonté d'améliorer la fiabilité des analyses médicales dans le cas concret du diabète et notamment en proposant une application au dosage du glucose. Les raisons de ce choix seront explicités dans le chapitre suivant.

## **II - Diabète sucré et métabolisme du glucose en physiopathologie**

### **II-1 Les chiffres-clés**

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il y a plus de 180 millions de patients diabétiques dans le monde et qu'il y en aura plus du double en 2030.

Le diabète et ses complications ont d'importantes conséquences économiques pour les malades, leurs familles, les systèmes de santé et les économies nationales : par exemple, l'OMS estime qu'en Chine, les cardiopathies, les accidents vasculaires cérébraux et le diabète entraîneront à eux seuls une perte de 558 milliards de dollars de revenu national au cours de la période 2006-2015.

Selon les projections de l'OMS, le nombre de décès par diabète va doubler entre 2005 et 2030, si des mesures urgentes ne sont pas prises [85]. Les décès risquent d'augmenter de plus de 80 % dans les pays à revenu moyen entre 2006 et 2015.

Malgré l'ampleur de ce qui s'apparente à une épidémie, également en France (environ deux millions d'individus atteints), la prévalence du diabète traité est estimée à seulement 3,8 % de la population [20, 21].

Au vu de ces données, il apparaît donc que les enjeux sanitaires et économiques inhérents au diabète poussent à mieux comprendre la physiopathologie et à améliorer la prise en charge de cette maladie.

## **II-2 Définition du diabète sucré**

Le diabète sucré est caractérisé par une hyperglycémie chronique due soit à un défaut de sécrétion d'insuline, soit à un défaut d'action de l'insuline, soit à la combinaison des deux.

Cette hyperglycémie occasionne à long terme des complications touchant de nombreux organes : les yeux, les reins, ainsi que le système nerveux et l'appareil cardiovasculaire [22, 23].

Selon les recommandations de l'OMS, le diabète est défini par [24, 25] :

- une glycémie à jeun supérieure à 7 mmol/l (1,26 g/l) mesurée consécutivement à deux reprises,

ou

- une glycémie supérieure à 11,1 mmol/l (2 g/l) à n'importe quel moment de la journée.

La correspondance entre ces deux critères a été observée en terme de prévalence du diabète et de rétinopathie, lors d'études épidémiologiques [26-30]. En effet, le risque de rétinopathie diabétique augmente nettement pour des glycémies à jeun situées entre 6,66 mmol/l (1,20 g/l) et 7,16 mmol/l (1,29 g/l) et équivaut à celui occasionné par une glycémie à 11,1 mmol/l (2 g/l) à la deuxième heure d'une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). Par ailleurs, le taux de mortalité dû aux complications vasculaires du diabète associé à une glycémie à jeun supérieure à 7 mmol/l (1,26 g/l) est voisin de celui associé à une glycémie supérieure à 11,1 mmol/l (2 g/l) à n'importe quel moment de la journée.

## **II-3 Classification des diabètes sucrés**

La nomenclature internationale distingue deux principaux types de diabète [23]:

- le diabète de type 1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant
- le diabète de type 2, anciennement appelé diabète non insulino-dépendant

Outre ces deux formes majeures, il existe le diabète gestationnel, ainsi qu'une catégorie regroupant tous les autres cas de diabète ne pouvant pas être classés ni dans le type 1, ni dans le type 2 [23].

### **II-3-1- Diabète de type 1**

Le diabète de type 1 concerne environ 15% des sujets diabétiques en France. Cette maladie est liée à une destruction auto-immune des cellules insulino-sécrétrices, les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Le processus auto-immun responsable de la déficience pancréatique commence plusieurs années avant l'apparition de l'hyperglycémie, et les symptômes se manifestent lorsque environ 80% des cellules  $\beta$  ont été détruites [31].

Cette affection se développe chez des individus ayant une prédisposition génétique à laquelle viennent s'ajouter des facteurs environnementaux (infection virale, facteur diététique, facteur toxique).

Le diabète de type 1 touche plus particulièrement les individus jeunes. L'apparition des manifestations cliniques est brutale et est marquée par une série de symptômes spécifiques tels que polyurie, polydipsie, polyphagie, amaigrissement et asthénie, cétonurie accompagnée d'une glycosurie.

### **II-3-2 Diabète de type 2**

Contrairement au diabète de type 1, il est rare que le diabète de type 2 soit révélé par des symptômes classiques liés à l'hyperglycémie. Le diagnostic est souvent fait à l'issue d'un examen fortuit, sur la seule base d'une hyperglycémie. Cette dernière peut s'accompagner d'une glycosurie généralement modérée [31].

Le diabète de type 2 représente plus de 80% des cas de diabète, et est essentiellement rencontré chez l'adulte. Le risque d'en être atteint augmente avec l'âge. Il est causé à la fois par une résistance de l'organisme à l'action de l'insuline (insulinorésistance) et par une diminution de l'insulinosécrétion pancréatique. Ce diabète est associé à plusieurs gènes de susceptibilité dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, au premier rang desquels figurent la consommation de graisses saturées et de sucres rapides, ainsi que la sédentarité. L'insulino-déficience est précédée d'une phase d'hypersécrétion insulinique, secondaire à une insulinorésistance des tissus périphériques, pouvant durer de 10 à 20 ans. Les principaux facteurs cliniques associés à l'insulinorésistance sont l'obésité, la sédentarité, une prédisposition génétique, l'âge, l'hypertension artérielle, combinés à l'augmentation des triglycérides et la baisse du cholestérol-HDL.

## II-4 Métabolisme glucidique physiologique et au cours du diabète sucré

### II-4-1 Classification des glucides

Dans l'organisme, les glucides interviennent dans de nombreux métabolismes et constituent une source énergétique majeure. Ils sont présents dans un grand nombre d'aliments sous forme, par exemple, d'amidon ou de saccharose. Après absorption intestinale, ils sont distribués à toutes les cellules par l'intermédiaire du flux sanguin [32]. Ils existent sous forme de molécules simples, principalement de glucose, dont l'assemblage en chaînes complexes linéaires et/ou ramifiées peut conduire à des structures biologiques importantes, impliquées dans les phénomènes de reconnaissance intermoléculaire et intercellulaire [33]. Nous décrirons successivement ces différentes structures.

#### *II-4-1-1 Les oses simples*

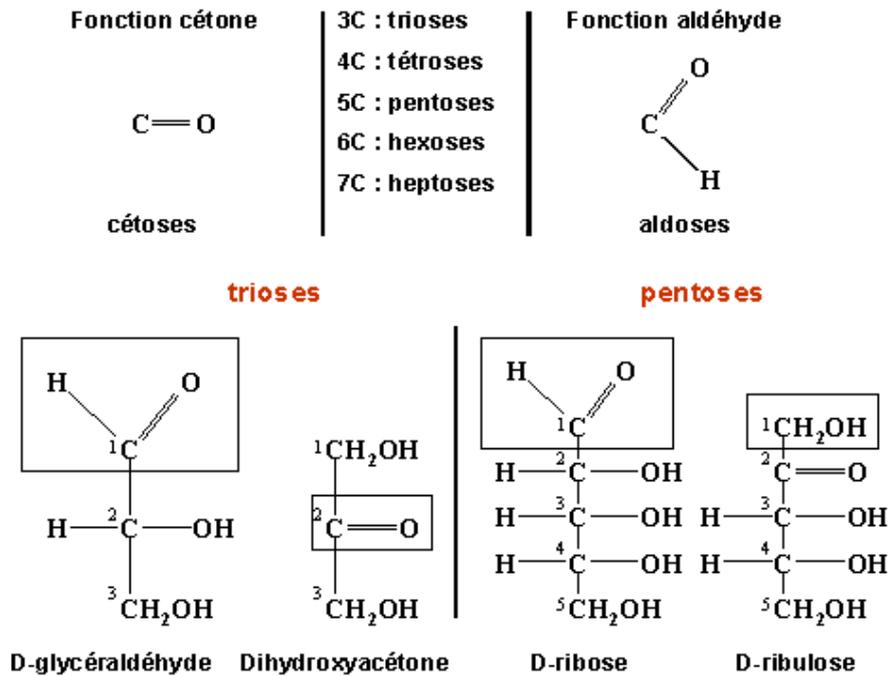
Les oses simples, également appelés « monosaccharides », sont des molécules dont la formule générale est  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , d'où l'ancienne appellation d'*hydrates de carbone*.

Ils sont caractérisés par la présence soit d'une fonction cétone, soit d'une fonction aldéhyde, ce qui définit deux sous-familles d'oses : les *cétoses* et les *aldoses*.

Les oses les plus simples sont les trioses, qui comportent trois carbones,. Ce sont le glycéraldéhyde (aldose) et la dihydroxyacétone (cétose) (**Figure 3**) [34].

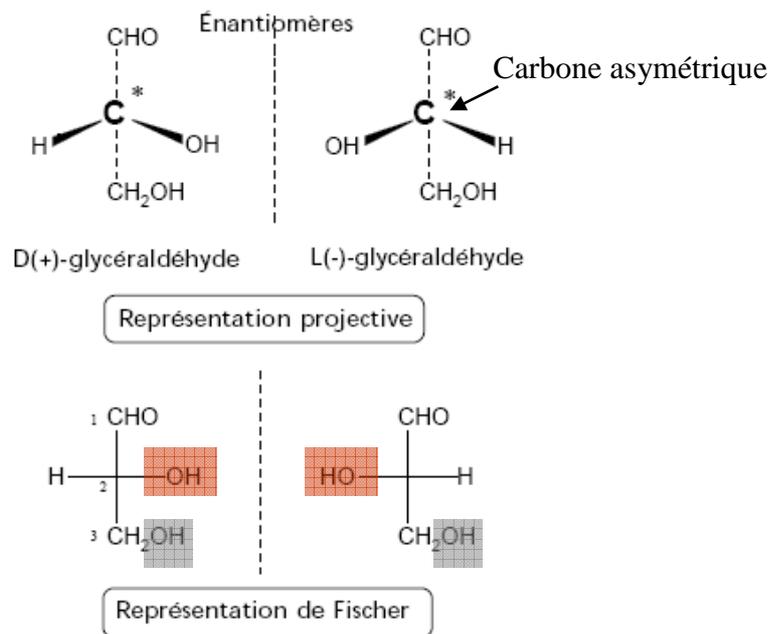
##### *II-4-1-1-1 Stéréoisomérisation et épimérisation : série D et L*

Le glycéraldéhyde comporte un carbone asymétrique, c'est-à-dire un carbone avec quatre substituants différents. En positionnant la fonction aldéhyde en haut, les trois autres substituants s'insèrent aux autres sommets d'un tétraèdre dont le carbone constitue le centre (**Figure 4**). L'image de cette molécule obtenue dans un miroir n'est pas superposable à l'original. Ces deux molécules (stéréoisomères) sont des « *énantiomères* », des molécules chimiquement semblables mais dont la configuration dans l'espace est différente.



**Figure 3 :** Classification des oses simples en aldoses et cétooses. Exemples des trioses et des pentoses [33].

Ces deux formes sont dénommées D-glycéraldéhyde et L-glycéraldéhyde. La projection linéaire en deux dimensions des deux molécules, dite projection de Fisher, permet de les distinguer par l'écriture. Par convention, la forme D est celle où la fonction hydroxyle est écrite à droite, la forme L est celle où la fonction hydroxyle est écrite à gauche.



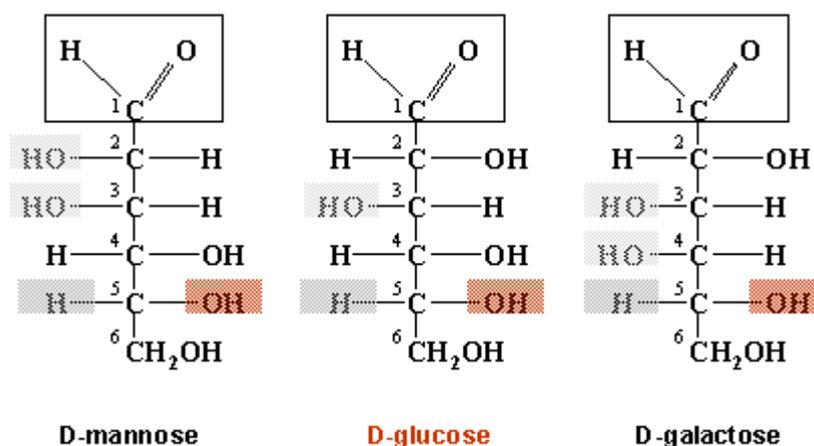
**Figure 4 :** Stéréoisomères D et L du glycéraldéhyde et projection de Fisher [33]

Les oses dont le nombre de carbones est supérieur à trois possèdent plusieurs carbones asymétriques, ce qui induit l'existence de plusieurs isomères possibles. Le carbone de référence est le carbone asymétrique le plus éloigné de la fonction aldéhyde ou cétone, il définit une forme D et une forme L pour chaque ose simple. Ainsi, le **glucose** peut exister sous forme de *D-glucose* et de *L-glucose*. Seul le D-glucose est retrouvé dans l'organisme, et la plupart des oses naturels appartiennent aussi à la série D (**Figure 5**). La classification sous le terme de « série D et L » est utilisée pour les sucres et les acides aminés seulement.

Le glucose contient trois autres carbones asymétriques. Pour chaque carbone asymétrique, la projection de Fisher permet d'écrire deux molécules différentes, dans lesquelles la fonction hydroxyle est positionnée à droite ou à gauche. Ces isomères sont appelés *épimères*.

Il existe sept épimères du glucose, dont certains sont particulièrement abondants dans l'alimentation ou dans l'organisme humain comme le D-galactose (épimère en 4) ou le D-mannose (épimère en 2).

### Série des D-aldohexoses



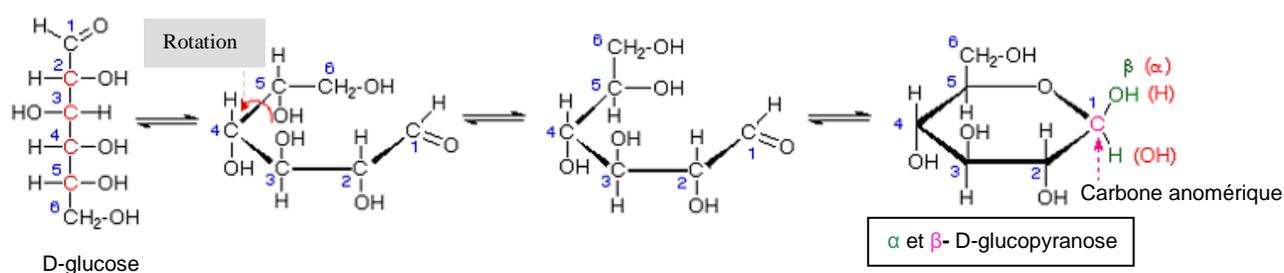
**Figure 5** : Trois épimères de la série des D-aldohexoses. La fonction hydroxyle marquant l'appartenance à la série D est portée par le carbone 5 [33].

#### II-4-1-1-2 Cyclisation, anomères et mutarotation

La molécule de D-glucose a la possibilité de se cycliser par réaction de la fonction aldéhyde portée par le carbone 1 avec la fonction hydroxyle portée par le carbone 5, ce qui donne un cycle à six côtés de type *pyrane*. Tous les aldohexoses forment des *pyranoses*.

En ce qui concerne les cétohexoses comme le fructose, la fonction cétone portée par le carbone 2 réagit avec la fonction hydroxyle portée par le carbone 5 pour former un cycle à cinq côtés de type *furane*. Les céto-hexoses forment donc des *furanoses*.

La projection de Haworth (**Figure 6**) permet d'écrire ces molécules cycliques dans un plan. La formation du cycle crée un carbone asymétrique supplémentaire qui est, pour le glucose (et les aldoses) le carbone 1 et pour le fructose (et les cétohexoses) le carbone 2. Ce carbone est dit anomérique et, par convention, dans l'*anomère*  $\alpha$ , la fonction OH hémiacétalique portée par le carbone anomérique est orientée en bas, alors que dans l'*anomère*  $\beta$ , elle est orientée en haut. Les deux formes peuvent être converties l'une en l'autre en passant transitoirement par la forme linéaire selon le phénomène dit de mutarotation.

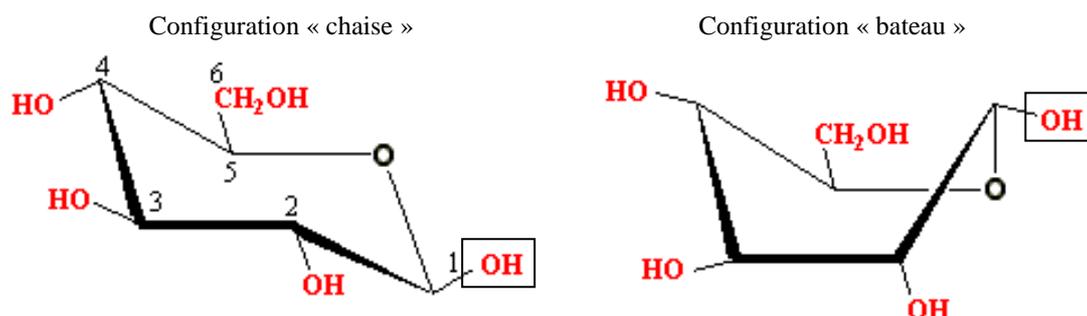


**Figure 6 :** Cyclisation du D-glucose et formation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du glucopyranose [36].

Le suffixe pyranose ou furanose est ajouté au nom de l'ose pour indiquer la structure cyclique formée. Les formes cycliques du D-glucose et le D-fructose sont désignées respectivement sous les dénominations de D-glucopyranose et de D-fructofuranose.

### II-4-1-1-3 Conformations «chaise» et «bateau»

Les molécules comportant des cycles pyranose ou furanose ne sont pas strictement planes. Elles peuvent adopter deux configurations spatiales dites « chaise » ou « bateau » (*Figure 7*). La configuration « chaise » est thermodynamiquement favorisée, étant une forme de plus basse énergie.



*Figure 7 : Formes « chaise » ou « bateau » du β-D-glucose [36]*

### II-4-1-2 Les oligosides

Ces molécules glucidiques résultent de la combinaison de deux ou plusieurs oses simples, après formation d'une liaison osidique par condensation de la fonction hémiacétalique portée par le carbone anomérique et d'une fonction hydroxyle du deuxième ose, avec libération d'une molécule d'eau.

### II-4-1-3 Les polysides

Ce sont des structures polycondensées d'oses. Leur assemblage, tout comme celui des oligosides, s'établit par des liaisons osidiques.

Il en existe de deux sortes :

#### II-4-1-3-1 Les polysides homogènes

Ce sont des polycondensés composés uniquement d'oses. L'**amidon** et le glycogène en sont des exemples. Le **glycogène** est formé de chaînes de plusieurs milliers de résidus d' $\alpha$ -D-glucose liés par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), portant des ramifications constituées de chaînes liées aux précédentes par

une liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Son importance réside dans le fait qu'il représente une réserve de glucose dans les cellules animales, alors que l'amidon est une réserve de glucose dans les cellules végétales.

#### *II-4-1-3-2 Les polyosides hétérogènes*

Les polyosides hétérogènes ou *hétéropolysaccharides* comportent plusieurs types d'oses et jouent un rôle important dans les tissus de soutien et la matrice extracellulaire de l'organisme. Ils constituent de longues chaînes d'oses, indépendantes ou liées à un noyau protéique (II-4-1-4). Dans ce dernier cas, le volume des chaînes osidiques plus important que celui de la partie protéique.

#### *II-4-1-3-3 Les glycoprotéines et les glycolipides*

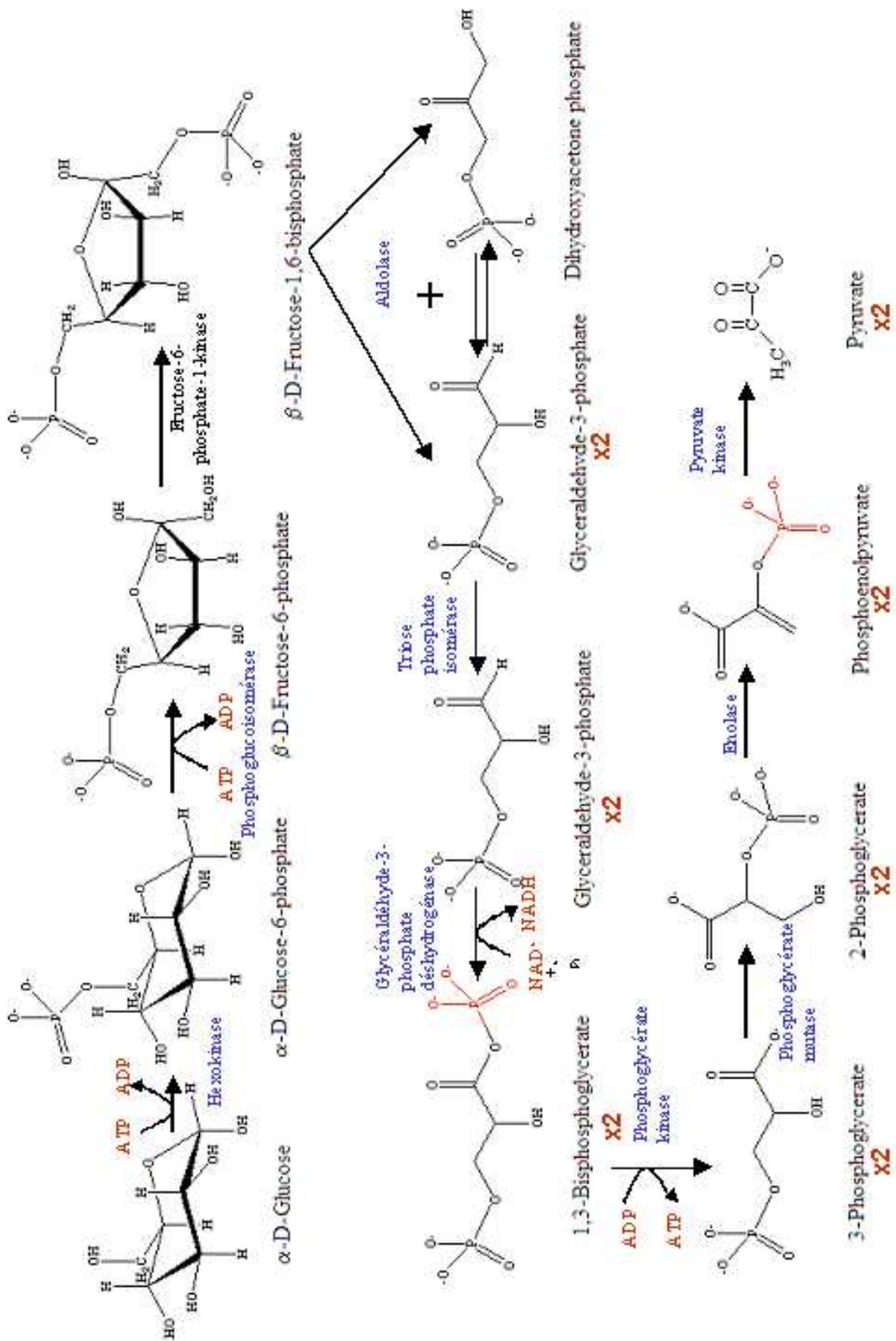
Certains oses simples constituent des chaînes qui s'associent avec les protéines et les lipides, formant des structures appelées "glycoconjugués". Ces chaînes glycaniques ou « glycannes » jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire [35]. La fixation des chaînes glycaniques est souvent étroitement liée à la fonction des protéines.

### **II-4-2- Métabolisme du glucose**

Le glucose est l'ose simple le plus abondant de l'organisme, fourni en majeure partie par les glucides alimentaires absorbés au niveau intestinal, et stockés dans le foie sous forme de glycogène. C'est à partir du glucose que sont formés les autres glucides de l'organisme [36]. Différentes voies métaboliques sont mises en jeu selon les circonstances, pour assurer une relative constance de la concentration sanguine de glucose. Des variations trop rapides et trop importantes de la glycémie perturberaient de façon aiguë l'activité métabolique des tissus avant que ne soit mise en jeu la production de métabolites de substitution (acides gras libres, glycérol, corps cétoniques).

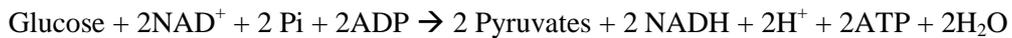
#### *II-4-2-1 La glycolyse*

La glycolyse est la voie principale d'utilisation du glucose (**Figure 8**) [33]. Cette voie métabolique cytoplasmique, présente dans toutes les cellules, permet la production d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). Elle conduit à la formation de deux molécules de pyruvate (composé à trois carbones) à partir d'une molécule de glucose, tout en produisant deux molécules d'ATP.



**Figure 8 :** Voie de la glycolyse conduisant du glucose au pyruvate. Chaque molécule de glucose étant clivée en deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate, son oxydation anaérobie en pyruvate fournit 4 ATP pour un investissement initial de 2 ATP [36].

Le bilan global de la transformation du glucose en pyruvate est le suivant :



Trois étapes de la glycolyse sont soumises à des mécanismes de régulation : les réactions catalysées par l'hexokinase, la fructose-6-phosphate-1-kinase, et la pyruvate kinase.

Elles sont régulées par le niveau énergétique de la cellule. Si le niveau énergétique est bas (concentration d'AMP élevée), l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP, qui est un activateur allostérique de la fructose-6-phosphate-1-kinase, entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de fructose-1,6-bisphosphate. L'élévation de ce dernier active la production de pyruvate, et donc du flux glycolytique. À l'inverse, si le niveau énergétique est élevé (concentration d'ATP élevée), l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP, inhibiteur de la pyruvate kinase et de la fructose-6-phosphate-1-kinase, entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du glucose-6-phosphate, inhibiteur de l'hexokinase ; cette dernière va donc bloquer l'utilisation du glucose. Il existe d'autres mécanismes de régulation, notamment hormonale, qui ne seront pas évoqués dans ce mémoire.

#### ***II-4-2-2 Néoglucogenèse et métabolisme du glycogène***

##### *II-4-2-2-1 La Néoglucogenèse*

La néoglucogenèse correspond à la transformation du pyruvate en glucose, à l'inverse de la glycolyse. Trois réactions de la glycolyse étant irréversibles, des enzymes spécifiques à la néoglucogenèse sont nécessaires pour transformer deux molécules de pyruvate en une molécule de glucose (**Figure 9**):

- la phosphoénolpyruvate carboxykinase, qui, en association avec la pyruvate carboxylase, catalyse la transformation du pyruvate en phosphoénolpyruvate ;
- la fructose-1,6-bisphosphate-1-phosphatase qui catalyse la transformation du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate ;
- la glucose-6-phosphatase, qui catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en glucose.

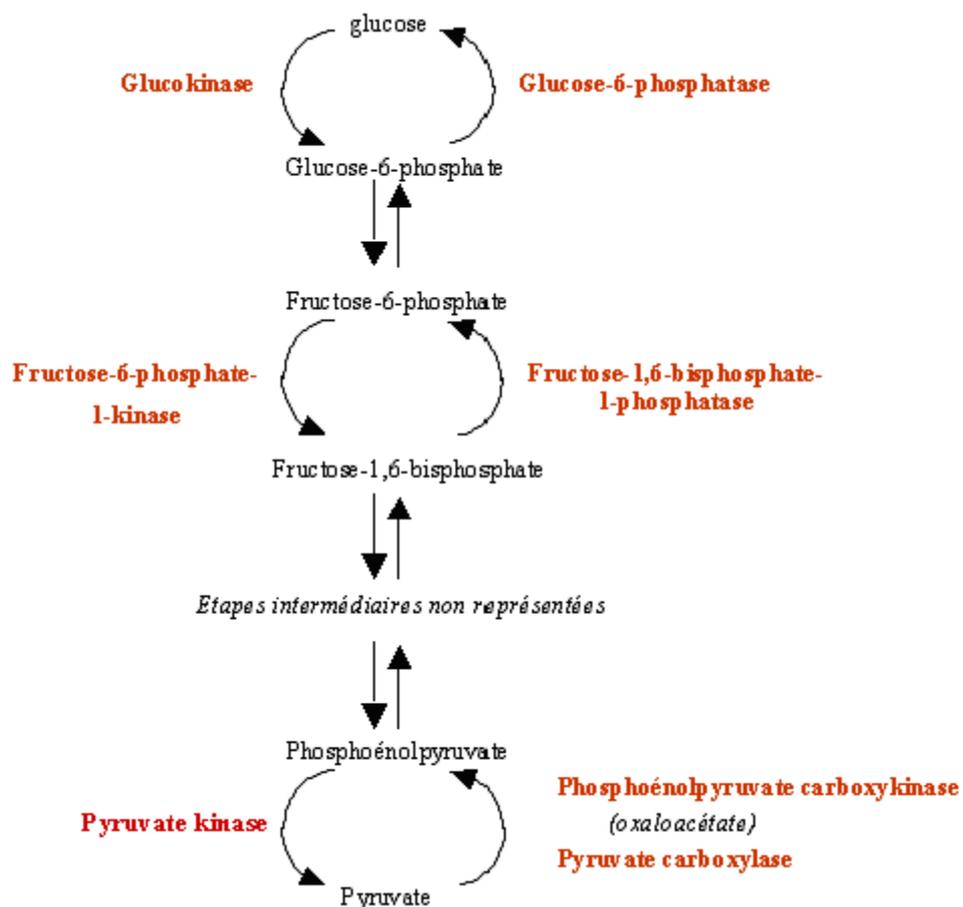
De plus, il faut également de l'énergie, sous forme d'ATP, et du NADH, pour assurer la réversibilité de la réaction catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

#### II-4-2-2-2 Le métabolisme du glycogène

Le glycogène est la forme principale de réserve du glucose chez l'homme dans le foie et le muscle.

#### Synthèse du glycogène

L'addition successive de glucose dans la molécule de glycogène permet de former des chaînes linéaires constituées de molécules de glucose reliées par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Le glycogène étant une molécule ramifiée, sa synthèse fait également intervenir une réaction permettant la formation de liaisons  $\alpha$ -1,6. L'enzyme-clé de la régulation de la synthèse du glycogène est la glycogène synthase.



**Figure 9 :** La néoglucogénèse (du pyruvate au glucose) par contournement des étapes irréversibles de la glycolyse (à gauche)[36].

### Dégradation du glycogène

La dégradation du glycogène, ou « glycogénolyse », n'est pas la voie inverse de sa synthèse. Un ensemble d'enzymes déstructure les ramifications du glycogène. La glycogène phosphorylase, en présence de phosphate inorganique, hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,4. Un autre système enzymatique appelé « enzyme débranchante » hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,6. Ce sont des molécules de glucose-1-phosphate qui sont directement formées. L'enzyme-clé de la régulation de la dégradation du glycogène est la glycogène phosphorylase.

#### ***II-4-2-3 Régulation coordonnée de la néoglucogenèse, de la glycolyse et du métabolisme du glycogène***

Quel que soit l'état nutritionnel, il est nécessaire de maintenir un apport suffisant en glucose pour certains types de cellules qui l'utilisent de façon exclusive pour produire leur énergie [37]. C'est le cas par exemple des cellules cérébrales, du moins dans le cadre d'un jeûne de courte durée (inférieur à 24 heures).

Le foie joue donc un rôle central dans le maintien de la glycémie, soit en mobilisant son stock de glycogène (glycogénolyse), soit en synthétisant du glucose à partir d'autres substrats (néoglucogenèse).

Le signal initial est la concentration de glucose elle-même. En effet, la glycémie conditionne les flux de diffusion du glucose et le niveau de sécrétion des deux hormones du pancréas endocrine essentielles pour le métabolisme du glucose, l'insuline et le glucagon. Le glucagon, de même que les catécholamines produites par les corticosurrénales, assure la libération du glucose par le foie et le maintien de la glycémie en période de jeûne, en stimulant la néoglucogenèse, en inhibant la glycolyse, en stimulant la glycogénolyse et en inhibant la synthèse du glycogène par un jeu d'inhibitions ou d'activations d'enzymes-clés de ces voies métaboliques. L'insuline, quant à elle, assure l'utilisation métabolique du glucose en stimulant la glycolyse. Elle inhibe la néoglucogenèse, stimule la synthèse du glycogène et inhibe la glycogénolyse. Les mécanismes de régulation mis en jeu par ces deux hormones ne sont pas exposés dans ce manuscrit.

### **II-4-3- Glycation non enzymatique des protéines et hémoglobine glyquée**

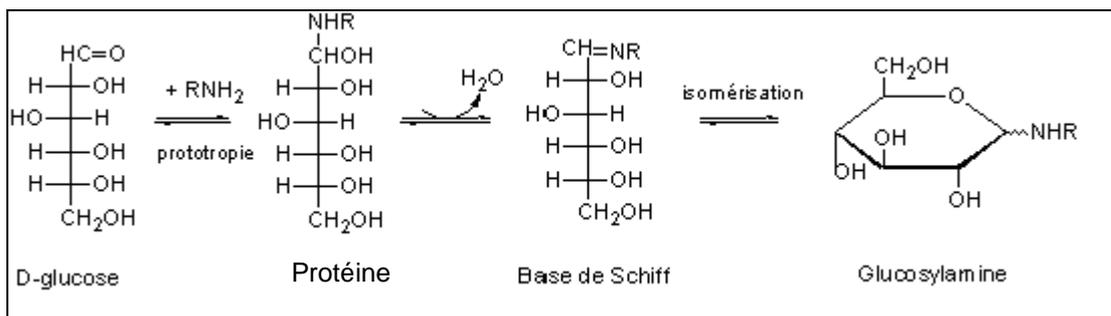
#### ***II-4-3-1 Glycation des protéines***

### II-4-3-1-1 Etapes de la glycation

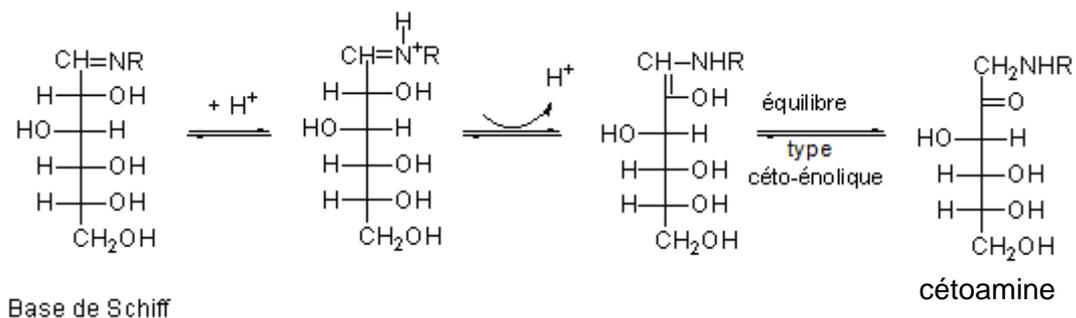
La glycation non enzymatique est l'une des modifications post-traductionnelles tardives des protéines. Il s'agit d'une réaction chimique spontanée entre le groupement aldéhyde ou cétonique d'un ose, ou d'un dérivé d'ose, et un groupement  $\alpha$ - ou  $\varepsilon$ -aminé d'une protéine [38, 39].

Le glucose est l'ose le plus abondant chez l'homme, mais demeure l'un des moins réactifs par comparaison à d'autres oses physiologiques (ribose, fructose, mannose) [40].

Le processus de glycation comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, une condensation réversible donne une base de Schiff instable (**Figure 10**). Celle-ci subit ensuite un réarrangement moléculaire, appelé réarrangement d'Amadori, qui aboutit à un composé stable caractérisé par une liaison cétoamine (ou fructosamine) (**Figure 11**).



**Figure 10** : Première étape de la glycation d'une protéine par le D-glucose. La fixation du glucose sur le groupement  $NH_2$  de la protéine forme une base de Schiff instable [41].

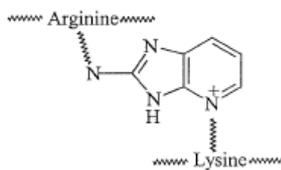


**Figure 11** : Réarrangement d'Amadori [41].

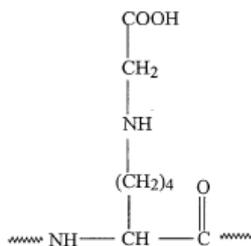
La glycation est une réaction cumulative et irréversible, qui, à long terme, occasionne la formation de composés complexes par oxydation ou par condensation de produits d'Amadori. Ces

composés peuvent être des hétérocycles azotés de couleur brune, parfois fluorescents, appelés produits de Maillard ou AGE (« advanced glycation end products », traduit littéralement par « produits de glycation avancés ») [41].

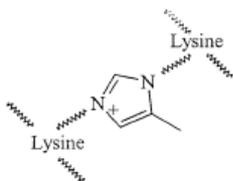
Différentes structures d'AGE ont été identifiées, telles que la pentosidine, le carboxyméthyl-lysine (CML), la pentosidine et le méthylglyoxal lysine dimère (MOLD) [42-44] (**Figure 12**).



**Pentosidine**



**Carboxyméthyllysine (CML)**



**Méthylglyoxal lysine dimère (MOLD)**

*Figure 12 : Structure de quelques AGE [27]*

La glycation est susceptible de modifier la structure des protéines, en générant notamment la formation de liaisons croisées avec d'autres protéines. Leur activité enzymatique ou biologique peut également être affectée, ainsi que leurs interactions, par exemple avec les cellules inflammatoires [45].

#### *II-4-3-1-2 Glycation et oxydation*

La formation des AGE est associée à de nombreux phénomènes oxydatifs, de sorte que les deux mécanismes sont souvent regroupés sous le seul terme de « glycoxydation » (ou "glyco-oxydation").

La production de radicaux libres oxygénés est observée aussi bien lors des étapes initiales qu'intermédiaires et avancées de la glycation. Ainsi, les protéines glyquées forment avec l'oxygène moléculaire l'ion superoxyde à pH physiologique [46], ainsi que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [47]. De même, le glucose peut former des radicaux libres oxygénés par autooxydation [48].

Ces réactions conduisent à la formation d'aldéhydes réactifs comme le méthylglyoxal (MGO) et assurent des liens étroits entre plusieurs voies métaboliques conduisant à la formation des AGE (*Figure 13*) [44].

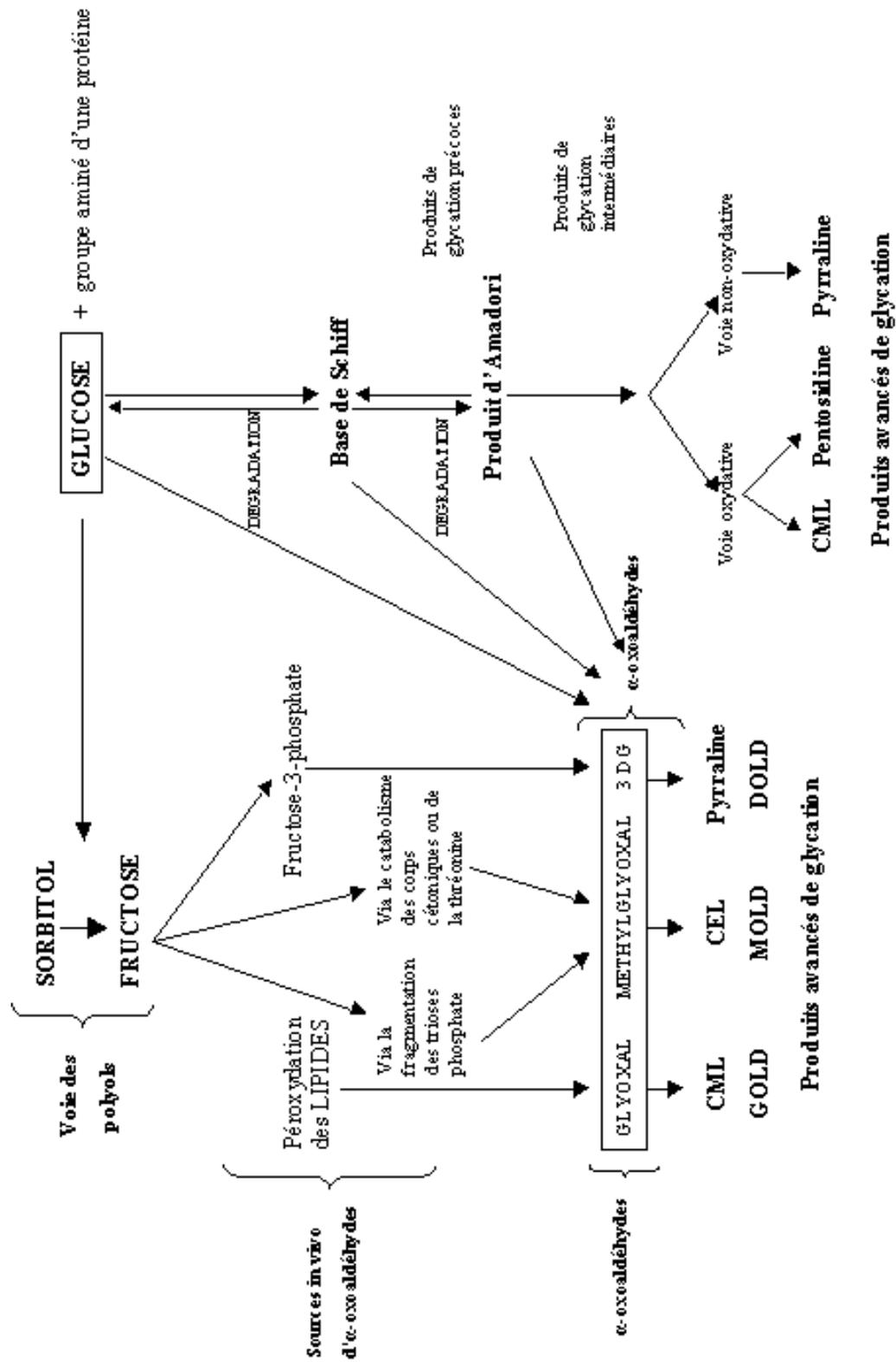
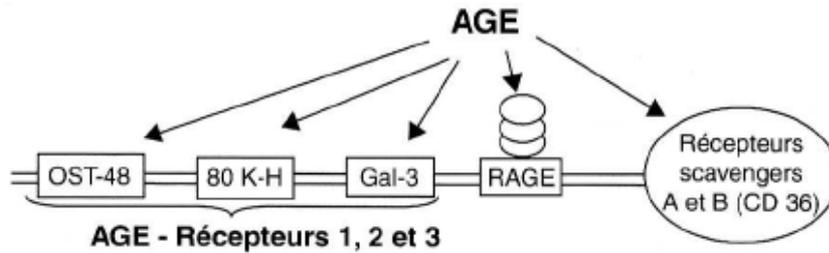


Figure 13 : La formation des AGE est possible par la voie de la glycation, mais aussi par la voie des polyols à partir de l'α-oxoaldéhyde, du méthylglyoxal (MGO) ou du 3-déoxyglucosone [44].

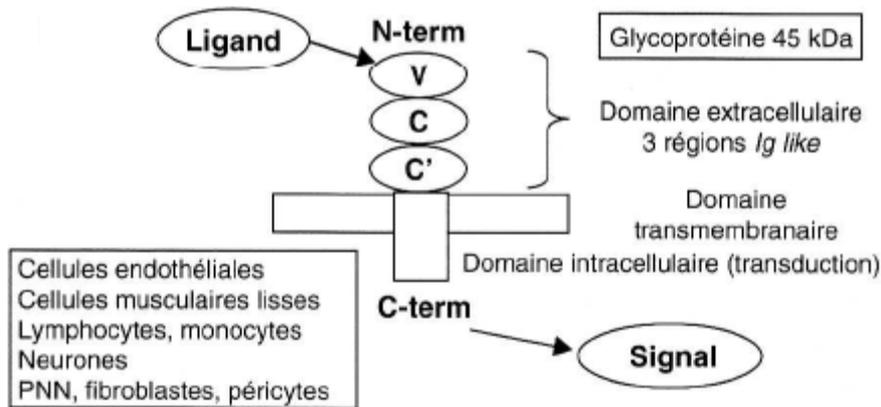
### II-4-3-1-3 Récepteurs et des produits avancés de glycation

Les AGE peuvent se fixer sur des protéines membranaires spécifiques : RAGE (récepteur des AGE), les AGE-récepteurs 1, 2 et 3 ou encore les récepteurs scavengers (**Figure 14**).



**Figure 14:** les différentes protéines membranaires capables de fixer les AGE. Le récepteur RAGE est le récepteur principal des AGE [45].

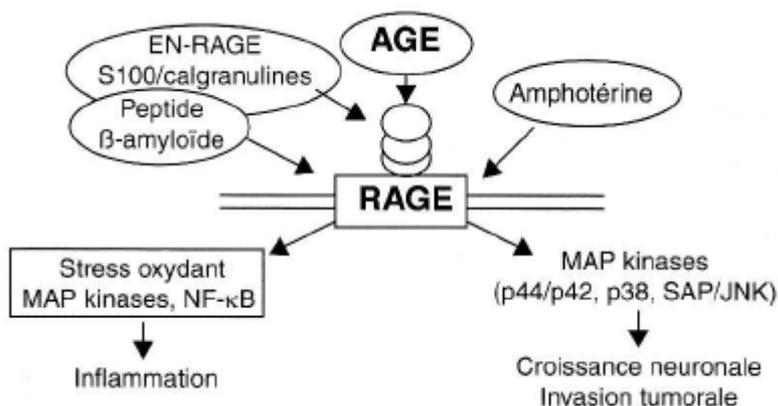
Le récepteur le mieux caractérisé est RAGE, glycoprotéine membranaire exprimée à la surface de très nombreuses cellules dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes, les polynucléaires et les neurones (**Figure 15**).



**Figure 15 :** RAGE : le récepteur des AGE [27]

La fixation des AGE sur les récepteurs RAGE entraîne une signalisation intracellulaire caractérisée par un stress oxydant et l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [49]. Toutefois, il faut noter que les AGE ne sont pas les seuls ligands de RAGE, car

d'autres composés peuvent se lier à ce récepteur et déclencher les mêmes voies de signalisation, ou d'autres, selon les facteurs [45] (**Figure 16**).



**Figure 16** : Le récepteur RAGE est capable de fixer plusieurs types de ligands conduisant à plusieurs types de réponses cellulaires [45]

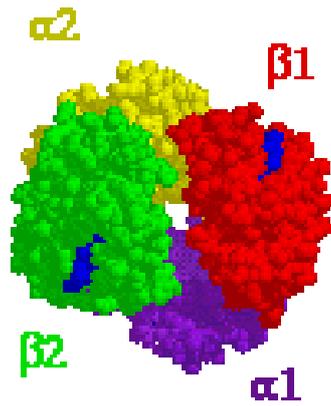
Les produits de glycation plus précoces comme les produits d'Amadori paraissent également capables de déclencher des réactions cellulaires inflammatoires [50].

#### **II-4-3-2 Hémoglobine glyquée et HbA<sub>1c</sub>**

L'hémoglobine est une protéine tétramérique composée de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux. L'hémoglobine A (HbA), forme majeure d'hémoglobine chez l'adulte, comporte deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). Elle représente environ 97% de l'hémoglobine humaine adulte. On trouve aussi environ 2,5% d'hémoglobine  $\alpha_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ ) et 0,5% d'hémoglobine F ( $\alpha_2\gamma_2$ )

Contenue dans les globules rouges, l'hémoglobine a pour rôle de transporter l'oxygène des poumons vers l'ensemble des cellules de l'organisme.

Structurellement, une sous-unité  $\alpha$  est en contact direct avec une sous-unité  $\beta$ , formant un seul bloc. Les « dimères » ainsi formés s'assemblent tête-bêche, par un jeu d'interactions électrostatiques entre les acides aminés qui les composent (**Figure 17**).

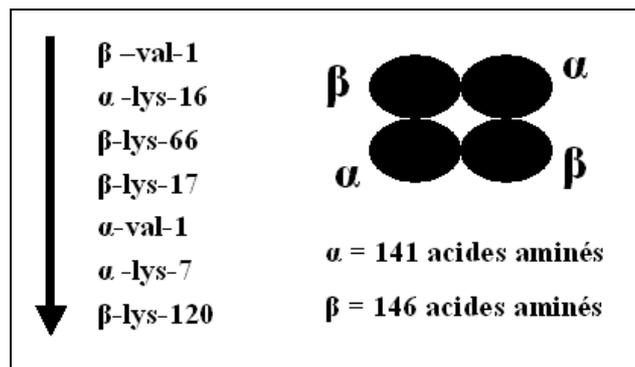


**Figure 17** : Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine (représentation en sphères)

L'hémoglobine est librement accessible au glucose, qui diffuse passivement à travers la membrane des globules rouges.

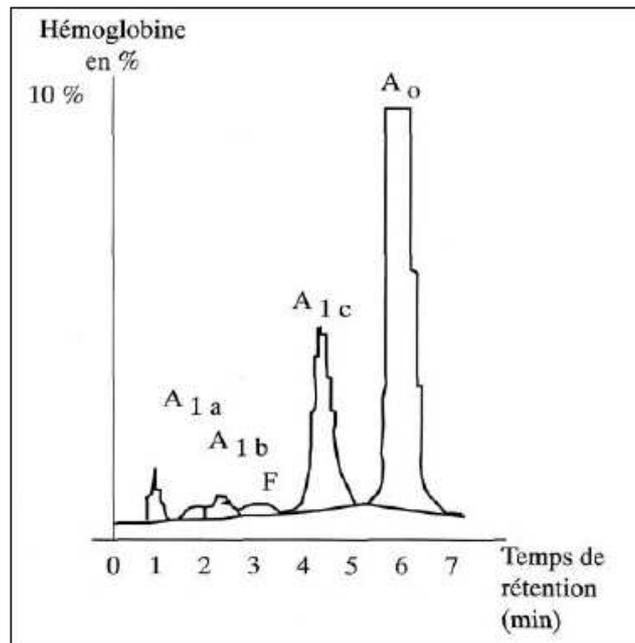
Les sites de fixation du glucose sur l'hémoglobine sont les fonctions ε-aminées des résidus de lysine et les extrémités N-terminales des chaînes α et β. Le nombre de sites de fixation possibles pour les oses génère la formation d'une multitude de formes d'hémoglobines glyquées [51].

L'affinité des sites pour les agents de glycation a été caractérisée. Le site le plus réactif est la valine N-terminale des chaînes β de globine (**Figure 18**) [52].



**Figure 18** : Sites préférentiels de glycation de l'hémoglobine [52]

La glycation de la valine en position N-terminale des chaînes β modifie significativement les propriétés physico-chimiques de l'hémoglobine, ce qui permet sa séparation par chromatographie d'échange ionique ou électrophorèse. Les hémoglobines éluées rapidement en chromatographie d'échange cationique ont été appelées hémoglobines A<sub>1</sub> (HbA<sub>1</sub>) (**Figure 19**).



**Figure 19** : Les différentes fractions de l'hémoglobine obtenues par chromatographie d'échange ionique [51]

L'hémoglobine **A<sub>1</sub>** est composée de plusieurs fractions qui ont été nommées en fonction de leur ordre d'élution : **HbA<sub>1a1</sub>**, **HbA<sub>1a2</sub>**, **HbA<sub>1b</sub>**, **HbA<sub>1c</sub>**.

- Les hémoglobines **A<sub>1a1</sub>** et **A<sub>1a2</sub>** résultent respectivement de la fixation de fructose-1,6-bisphosphate et de glucose-6-phosphate sur la valine N-terminale des chaînes β. Ces deux formes représentent environ 0,5 % de l'ensemble de l'hémoglobine. L'**HbA<sub>1b</sub>** est caractérisée par la fixation de pyruvate.
- L'hémoglobine **A<sub>1c</sub>**, fraction majeure, résulte de la fixation de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β. Elle représente environ 80% de l'HbA<sub>1</sub> et de 4 à 6% de l'hémoglobine totale.

Le **Tableau 2** résume les principales formes d'hémoglobines glyquées et leur nomenclature:

**Tableau 2 : les différentes formes d'hémoglobines glyquées et les différentes techniques de séparation/révélation [51]**

<b>HbA</b>	Tétramère $\alpha_2\beta_2$	Techniques de séparation
<b>HbA<sub>0</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Composant majeur de l'HbA</li> <li>- Comprend l'Hb non glyquée et l'Hb glyquée sur des sites autres que la valine N-terminale des chaînes <math>\beta</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie d'échange d'ions</li> <li>- Electrophorèse</li> </ul>
<b>HbA<sub>1</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hémoglobine(s) rapide(s) ou <i>fast hemoglobins</i></li> <li>- Hb glyquées sur des sites modifiant le pHi</li> <li>- HbA<sub>1a1</sub> + HbA<sub>1a2</sub> + HbA<sub>1b</sub> + HbA<sub>1c</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie d'échange d'ions</li> <li>- Electrophorèse</li> </ul>
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hb glyquée formée par fixation de glucose sur l'extrémité N-terminale des chaînes <math>\beta</math> de l'HbA</li> <li>- Fonction cétoamine stable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC)</li> <li>- Electrophorèse capillaire</li> </ul>
<b>Hb pré-A<sub>1c</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synonyme : HbA<sub>1c</sub> labile</li> <li>- Forme labile (instable) de l'HbA<sub>1c</sub>, caractérisée par une fonction aldimine (base de Schiff)</li> <li>- Ne doit pas être évaluée en même temps que l'HbA<sub>1c</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC)</li> <li>- Electrophorèse capillaire</li> </ul>
<b>Hb glyquée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synonyme : <b>glycohémoglobine</b></li> <li>- Caractérisée par toute fixation non enzymatique de glucose (ou d'autres oses) sur l'Hb</li> <li>- Fraction dosée par les méthodes de chromatographie d'affinité, souvent appelée « hémoglobine glyquée totale » ou HbG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie d'affinité</li> </ul>

La dénomination d'HbA<sub>1c</sub> ne préjuge pas de la glycation d'autres sites que l'extrémité N-terminale d'une ou des deux chaînes  $\beta$ . Il existe donc une hétérogénéité supplémentaire parmi les hémoglobines dénommées "HbA<sub>1c</sub>".

La formation de l'hémoglobine glyquée, et en particulier de l'HbA<sub>1c</sub>, est étroitement liée à la concentration du glucose dans le sang. La glycation de l'hémoglobine étant irréversible pendant les 120 jours de durée de vie des globules rouges dans l'organisme, le dosage de l'HbA<sub>1c</sub> permet une évaluation cumulative et rétrospective des variations de la glycémie sur une période représentant les

quatre à huit semaines précédentes. Le pourcentage d'HbA<sub>1c</sub> ne varie pas au cours de la journée, et ne dépend pas d'une récente modification de régime.

Le dosage d'HbA<sub>1c</sub> constitue un paramètre majeur de suivi du diabète sucré. Il permet une surveillance rétrospective de l'équilibre du diabète, en complément de la glycémie classique ou capillaire, qui permet une évaluation instantanée

#### ***II-4-4- Complications dégénératives et traitement du diabète sucré***

Les complications dégénératives du diabète sucré sont la résultante d'une hyperglycémie chronique liée à un diabète non traité ou à un mauvais contrôle thérapeutique, que le diabète soit de type 1 ou 2. Le traitement du diabète de type 1 repose sur des injections d'insuline (insulinothérapie) [53] Les schémas d'insulinothérapie visent à reproduire au mieux l'insulino-sécrétion physiologique. Des essais d'administration d'insuline par voie nasale sont en cours.

Ce traitement est purement palliatif, puisqu'il ne rétablit pas la sécrétion physiologique de l'hormone. Le caractère auto-immun de la maladie laisse l'espoir d'une thérapie utilisant des substances immunosuppressives pour freiner la destruction des cellules  $\beta$  et permettre d'éviter l'insulinothérapie chez certains sujets.

Le traitement du diabète de type 2 vise non seulement à faire baisser les valeurs glycémiques, mais aussi à corriger les facteurs de risque associés, surtout cardiovasculaires. Il est basé sur un régime alimentaire adapté (normoglycémique et modérément lipidique), combiné à une activité physique et à des prises de médicaments hypoglycémisants (metformine, insulinosécréteurs) [54].

Dans tous les cas, le traitement des patients diabétiques nécessite une éducation thérapeutique, permettant au malade de comprendre et d'assurer lui-même une partie de sa prise en charge.

Les principales complications dégénératives du diabète sont macroangiopathiques, microangiopathiques et neuropathiques. Certaines sont liées à l'augmentation de la glycation non enzymatique des protéines.

#### ***II-4-4-1 Les complications macroangiopathiques***

Le terme de macroangiopathie désigne l'atteinte des artères allant de l'aorte aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm [31]. La macroangiopathie artérielle associe artériosclérose et athérosclérose [55]. Ces deux mécanismes entraînent un dépôt progressif de lipides (cholestérol) dans les parois vasculaires, associé à un remaniement matriciel, créant un épaissement pariétal, voire une obstruction vasculaire [56-59].

Ces dépôts sont en relation avec la glycation de protéines circulantes comme les LDL (lipoprotéines de faible densité). En effet, leur glycation stimule la production de radicaux libres et de molécules d'adhésion des cellules épithéliales, et augmente leur captation par les macrophages résidents des parois artérielles, qui se transforment en cellules spumeuses [60, 61].

#### ***II-4-4-2 Les complications microangiopathiques***

##### ***II-4-4-2-1 La rétinopathie diabétique***

Cette pathologie correspond à une atteinte de la microcirculation rétinienne et choroïdienne due à l'hyperglycémie chronique. En effet, l'hyperosmolarité causée par l'hyperglycémie chronique du diabète occasionne une hyperhydratation cellulaire qui fragilise les cellules de la rétine et entraîne leur nécrose.

La rétinopathie diabétique est associée à deux types d'anomalies physiopathologiques principales :

- Modifications de la paroi des capillaires (plus épaisse, plus fragile, plus perméable)
- Augmentation de la viscosité sanguine (hyperagrégabilité plaquettaire et érythrocytaire)

Un certain nombre d'évènements, tels des exsudats, des microanévrismes, des hémorragies et un décollement rétinien, associés ou non à la cataracte, conduisent à une altération plus ou moins importante de la vision.

La rétinopathie diabétique se développe souvent sans aucun symptôme. La survenue d'une baisse de l'acuité visuelle témoigne de lésions oculaires très avancées.

#### *II-4-4-2-2 La néphropathie diabétique*

Le diabète mal équilibré peut conduire à une glomérulosclérose, dont la principale manifestation biologique initiale est l'augmentation de l'élimination d'albumine dans les urines. Ce dysfonctionnement entraîne à terme une insuffisance rénale.

La néphropathie diabétique est caractérisée par l'accumulation de produits de glycation avancés, comme la CML (carboxyméthyllsine) et la pentosidine, au niveau du glomérule. Aux premiers stades de la néphropathie, les AGE sont localisés dans l'espace mésangial et dans les parois des capillaires. A un stade plus tardif, ils s'accumulent dans les glomérules [62, 63].

#### *II-4-4-3 Les complications neuropathiques*

On distingue plusieurs types d'altérations nerveuses périphériques dues au diabète [31]. Les mononeuropathies représentent 10 à 15% des neuropathies diabétiques. Elles se traduisent essentiellement par des déficits moteurs (atteinte des nerfs oculomoteurs, amyotrophie) et des douleurs des membres inférieurs et supérieurs.

Les polyneuropathies diabétiques se traduisent par une abolition des réflexes achilléens et parfois rotuliens, une altération de la sensibilité profonde, des troubles de la sensibilité superficielle tactile, thermique et douloureuse.

La neuropathie végétative se caractérise par une atteinte des nerfs périphériques, et s'accompagne d'une dégénérescence avec inflammation et dégradation de la myéline [64].

### **III – Méthodes de détermination du glucose**

Les dosages de glycémie assurant le diagnostic du diabète et le suivi des patients diabétiques s'effectuent, selon les cas, par des analyses en laboratoire ou par auto-surveillance. Les techniques employées pour doser le glucose en laboratoire, dites « de routine », sont nombreuses. Le choix de celles-ci est dicté par des considérations scientifiques (performances et qualité des méthodes), pratiques (facilité d'utilisation), logistiques (rapidité, encombrement des appareils) ou financières (coût de l'analyse). Ces techniques nécessitent un déplacement du patient. Par ailleurs, elles ne permettent pas l'obtention du résultat instantanément.

Aussi, pour répondre à la nécessité pour certains patients diabétiques (type 1) de suivre leur glycémie à n'importe quel moment de la journée afin d'adapter le traitement, des techniques de dosage délocalisées ou à usage personnel ont été développées et sont disponibles [65]. Cette détermination permet l'obtention d'une glycémie en quelques minutes, mais peuvent être sujettes à plus d'interférences. Ces dernières peuvent être soit médicamenteuses ou iatrogènes, soit liées à l'état physiologique ou pathologique du patient [86].

Les analyses pratiquées en laboratoire se doivent d'être traçables, conformément aux référentiels [3, 6, 7]. Cette traçabilité peut être réalisée via des méthodes de référence définies par le JCTLM ou développées en interne par des laboratoires nationaux de métrologie.

#### **III-1 Méthodes de référence pour la détermination du glucose**

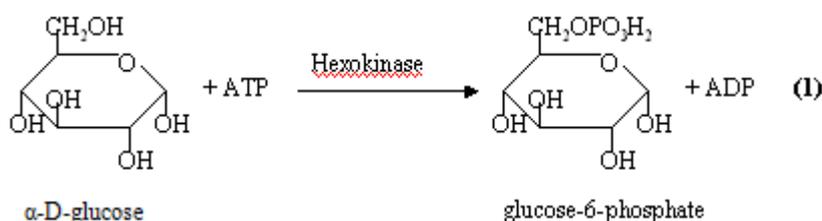
Pour la détermination du glucose, le JCTLM propose différentes méthodes analytiques basées sur deux principes différents : la spectrophotométrie UV-VIS et la dilution isotopique associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (DI-CG/SM).

Si la première méthode, basée sur la spectrophotométrie d'absorption, nécessite plusieurs réactions enzymatiques successives bien définies dans la littérature, les autres (DI-CG/SM), proposent plusieurs protocoles de préparation dont le but est identique : l'analyse du glucose en chromatographie en phase gazeuse nécessite sa dérivation pour le transformer en composé stable thermiquement. Les dérivés décrits dans les méthodes de référence du JCTLM sont : le DAG (1,2 : 5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose), le BBA ( $\alpha$ -D-glucofuranose cyclique 1,2 : 3,5-bis (butylboronate)-6-acétate) et le GPA (glucose pentaacétate aldonitrilé).

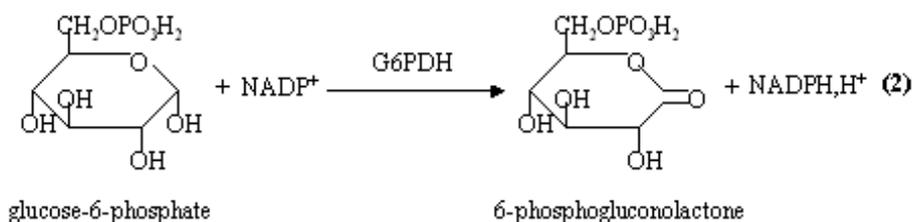
Avant de réaliser une synthèse sur les avantages et inconvénients de ces techniques, celles-ci seront décrites brièvement.

### III-1-1 Méthode de référence reposant sur deux réactions enzymatiques avec détection finale par spectrophotométrie d'absorption

Cette méthode a été décrite en 1976 par une équipe du « Center for Disease Control and Prevention » (CDC), qui est un organisme d'état faisant partie du « Department of Health and Human Services » (HHS) de l'agence gouvernementale des Etats- Unis [67]. Elle est basée sur deux réactions enzymatiques successives ; une réaction catalysée par l'hexokinase et une autre par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (**Figure 20** et **Figure 21**) :



**Figure 20** : Réaction de phosphorylation du  $\alpha$ -D-glucose en glucose-6-phosphate catalysée par l'hexokinase



**Figure 21** : Réaction d'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase

Lors de la première réaction (**Figure 20**), l'hexokinase catalyse la phosphorylation du glucose à partir d'adénosine triphosphate (ATP). C'est une réaction irréversible. Au cours de la seconde réaction (**Figure 21**), le glucose-6-phosphate formé est oxydé en 6-phosphogluconolactone en présence de nicotinamide adénosine dinucléoside phosphate ( $\text{NADP}^+$ ). Cette réaction est catalysée

par l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'oxydation du glucose-6-phosphate s'accompagne de la réduction du  $\text{NADP}^+$  en  $\text{NADPH},\text{H}^+$ . Le  $\text{NAD}^+$  (nicotinamide adénosine dinucléoside), réduit en  $\text{NADH},\text{H}^+$ , peut également être utilisé comme coenzyme de cette réaction si l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase provient d'une souche de levure particulière, *Leuconostoc mesenteroides*.

### Techniques de détection

La technique de détection couramment associée à la réaction enzymatique de l'hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase est la *spectrophotométrie UV-VIS*. Elle se base sur la propriété d'absorption du rayonnement UV-visible (340 nm) par les molécules de coenzymes réduits ( $\text{NADH},\text{H}^+$  ou  $\text{NADPH},\text{H}^+$ ).

Cette technique de détection permet de déterminer le glucose dans toute la gamme des concentrations habituellement rencontrées chez les patients (1,6 mmol/l à 22,2 mmol/l), avec un temps de réponse très court. Toutefois, sa principale limitation réside dans le fait qu'elle peut être sujette à des interférences liées aux conditions de dosage (pH, température, composition des réactifs).

En effet, il a été démontré que cette réaction pouvait souffrir de la présence d'interférents dans le milieu réactionnel comme [67] :

- les autres sucres, parmi lesquels le fructose ou le mannose, en tant que compétiteurs,
- l'eau : qui peut entraîner l'hydrolyse immédiate du 6-phosphogluconolactone, empêchant la réduction du  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ,
- les contaminants du réactif enzymatique.

### **III-1-2 Méthodes de référence reposant sur la Dilution Isotopique associée à la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (DI/GC-MS)**

La DI/GC-MS est reconnue par le BIPM comme étant une méthode primaire. Selon la définition du CIPM (comité international des poids et mesures), c'est une méthode qui possède les plus hautes qualités métrologiques, dont la mise en œuvre est parfaitement décrite et comprise, pour laquelle l'incertitude est établie en terme d'unités SI. Cette méthode comprend peu d'erreurs aléatoires et aucune erreur systématique.

La dilution isotopique (*Figure n°22*) consiste à déterminer la concentration d'un composé contenu dans un échantillon par ajout dans l'échantillon d'une quantité connue de ce même composé mais « marqué », c'est à dire dont un ou plusieurs atomes ont été remplacés par un isotope stable (H par  $^2\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$  par  $^{13}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  par  $^{18}\text{O}$  par exemple). Lors de la fragmentation des molécules dans le spectromètre de masse, la détermination du rapport de l'intensité de signal des fragments caractéristiques de la molécule non marquée et de la molécule marquée permet d'obtenir le rapport de quantité de matière entre le composé à doser et le composé marqué, et donc d'en déduire la concentration. Selon le nombre de composés à doser, leur niveau de concentration et la quantité d'échantillon disponible, il sera possible de réaliser soit :

– Un point unique d'étalonnage :

Quel que soit le nombre de composés à doser dans un échantillon, une quantification par un point unique de calibrage peut être réalisée si les concentrations de tous ces composés sont très proches. Si le nombre de composés est élevé, avec pour certains, des concentrations du même ordre de grandeur, il peut être réalisé plusieurs points uniques de calibrage dans la mesure où la quantité d'échantillon est suffisante.

– Une courbe d'étalonnage :

Si, dans un échantillon, le nombre de composés est important, avec, pour certains, des concentrations très différentes, il est réalisé pour chaque composé une courbe d'étalonnage. Il en est de même lorsque l'échantillon présente des concentrations très différentes malgré un nombre de composés faible et que la quantité d'échantillon n'est pas suffisante pour réaliser plusieurs points uniques d'étalonnage.

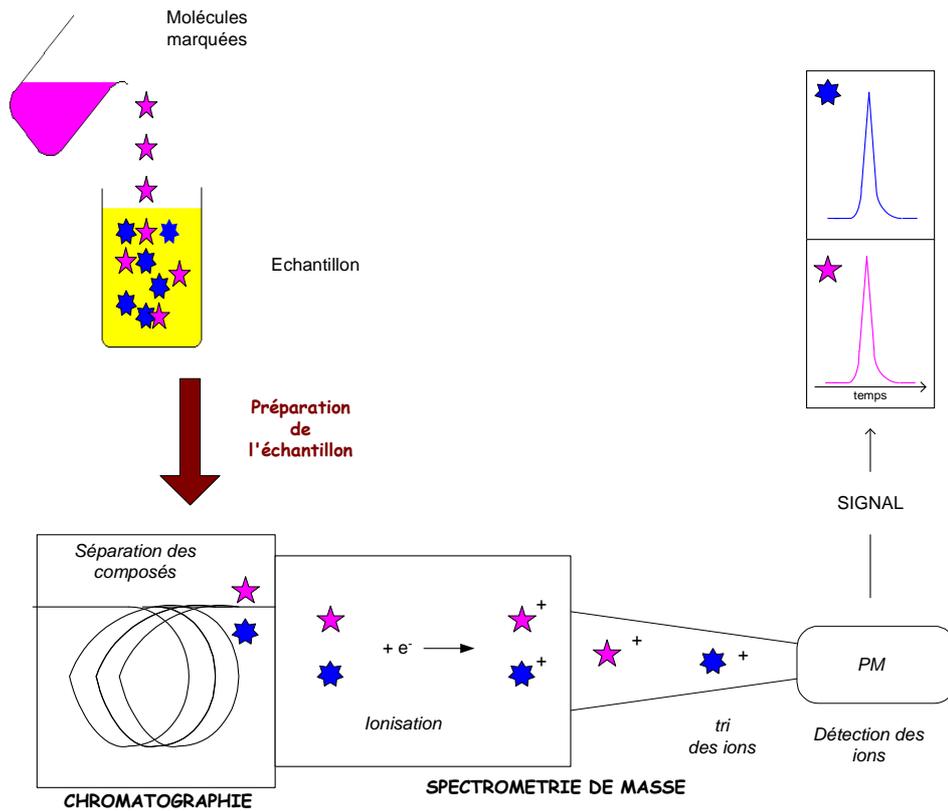


Figure 22 : Principe de la dilution isotopique

La détermination du glucose par DI-CG/SM peut être schématisée de la manière suivante :

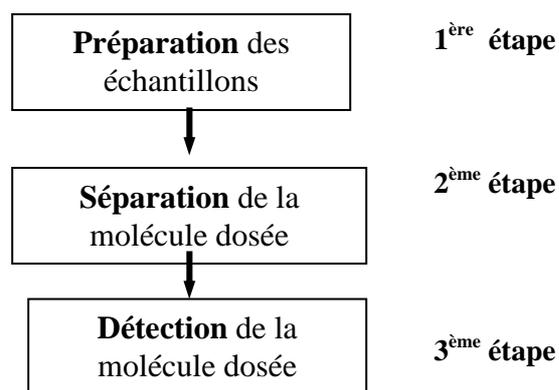


Figure 23 : Les grandes étapes de la détermination du glucose dans le sérum

**1<sup>ère</sup> étape :** Une préparation de l'échantillon consistant à ajouter en premier lieu la molécule marquée (dilution isotopique), puis à déprotéiniser et/ou purifier le sérum et enfin,

dériver le glucose afin d'obtenir une molécule stable thermiquement pouvant être analysée par chromatographie en phase gazeuse,

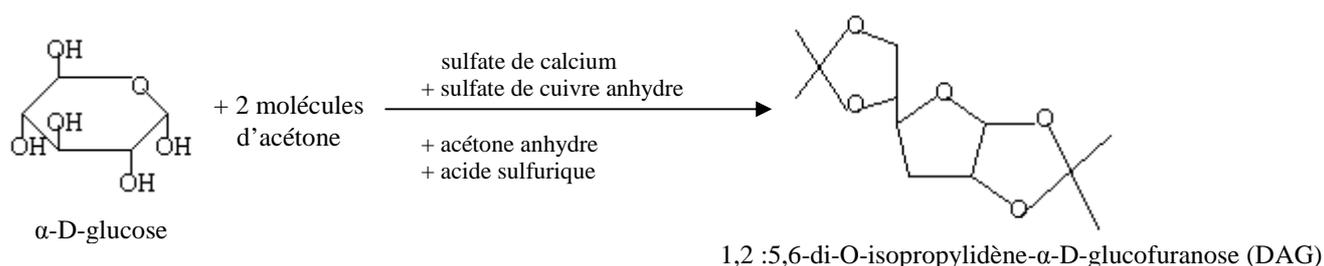
**2<sup>ème</sup> étape :** Une séparation des différents composés présents dans l'extrait,

**3<sup>ème</sup> étape :** Une identification et quantification par spectrométrie de masse.

Les méthodes référencées par le JCTLM diffèrent principalement par la première étape et plus particulièrement sur la manière de déprotéiniser et/ou purifier l'échantillon, et sur le produit final dérivé du glucose :

### ***III-1-2-1 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de 1,2 :5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (DAG) [68]***

La molécule de glucose subit deux réactions d'acétonation (**Figure 24**). Un mélange réactionnel contenant du sulfate de calcium anhydre, du sulfate de cuivre anhydre, de l'acétone anhydre et une faible quantité d'acide sulfurique est ajouté à un échantillon de sérum sanguin. Le bilan de la réaction est le suivant :



**Figure 24 :** Dérivation du D-glucose en DAG par double acétonation

Après 48h, la réaction est arrêtée par du carbonate de sodium. Le mélange est filtré. Les différents constituants du concentré obtenu sont séparés par chromatographie en couche mince. En effet, la molécule de 1,2 :5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**DAG**) attendue peut subir les interférences des diacétones des autres oses qui se forment. La purification est faite par une série de chromatographies successives sur couche mince et une filtration de l'échantillon.

Le DAG est ensuite extrait et récupéré dans du chloroforme avant analyse en CG/SM. Les informations de la détermination par CG/SM sont regroupées dans le **Tableau 3** :

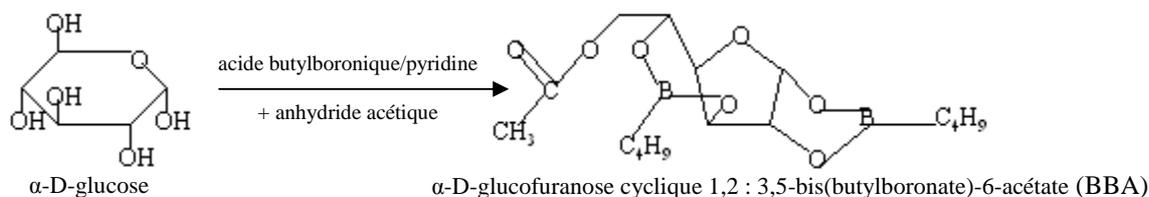
*Tableau 3 : Paramètres de CG/SM pour la détermination de DAG*

CG	Mode d'injection	Type de colonne	Dimensions de colonne	Température de colonne	Débit colonne	Temps de rétention (DAG)	Volume injecté ou quantité injectée µl ou µg
	Non indiqué	Colonne remplie en acier inoxydable	1,5m de long 3mm de diamètre Epaisseur de phase non indiquée	170°C (isotherme)	14ml/min	5,5 min	2 µg
SM	Mode d'ionisation	Température de la source	Ions caractéristiques	Mode d'ionisation	Température de la source	Ions caractéristiques	
	EI (impact électronique)	200°C	245 m/z (DAG) 250m/z (DAG marqué)	CI (ionisation chimique)	Entre 130°- 150°C	261 m/z (DAG) 266 m/z (DAG marqué)	

La suite de purifications par chromatographie sur couche mince et par chromatographie échangeuse d'ions permet d'obtenir une solution de produit DAG débarrassée de nombreux interférents. La séparation d'une faible quantité de composé (2 µg) est possible en 5,5 min. Une faible masse de composé peut-être injectée (2µg). Il est d'ailleurs facilement ionisable sous une température de source à 200°C en mode impact électronique et sous une température comprise entre 130°C et 150°C en ionisation chimique.

***III-1-2-2 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de α-D-glucofuranose cyclique 1,2 : 3,5-bis(butylboronate)-6-acétate (BBA) [68]***

Cette préparation, contrairement à la précédente, procède à la purification de l'échantillon avant toute réaction de dérivation. L'échantillon est déprotéinisé par neuf fois son volume d'éthanol à 80%. Après centrifugation à 2400 g pendant 15 min, le surnageant est récupéré et concentré par évaporation de l'éthanol puis passé sur résine échangeuse d'ions. Une fois cette purification réalisée, le α-D-glucose contenu dans l'échantillon est butylboronaté par ajout d'une solution d'acide butylboronique dans la pyridine à une température de 95°C pendant 35 min. Le dérivé dibutylboronate obtenu est ensuite acétylé à une température de 95°C par ajout d'anhydride acétique pour obtenir de l'α-D-glucofuranose cyclique 1,2 :3,5-bis(butylboronate)-6-acétate (**BBA**) (*Figure 25*). Le bilan de la réaction s'écrit comme suit :



**Figure 25 :** Dérivation du  $\alpha$ -D-glucose par butylboronation et acétylation

La pyridine est ensuite évaporée sous vide. L'échantillon ainsi débarrassé de la pyridine est repris dans de l'iso-octane contenant en volume 1% d'anhydride acétique. La solution résultante est analysée en CG/SM. Les informations décrivant la détermination par CG/SM sont regroupées dans le **Tableau 4** :

**Tableau 4 :** Paramètres de CG/SM pour la détermination de BBA

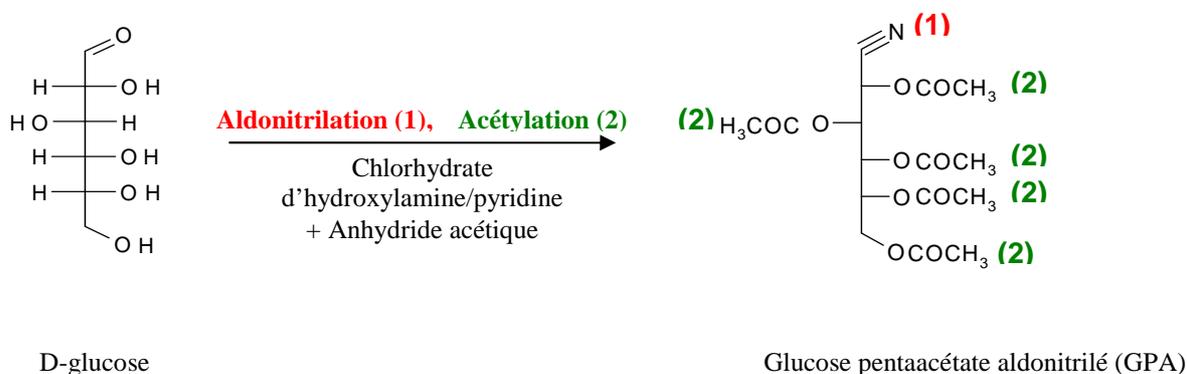
CG	Mode d'injection	Type de colonne	Dimensions de colonne	Température de colonne	Débit colonne	Temps de rétention (DAG)	Volume injecté ou quantité injectée $\mu$ l ou $\mu$ g
	Non indiqué	Colonne capillaire en verre (phase stationnaire = polymère siliconé)	100 m de long 0,8 mm de diamètre Epaisseur de phase non indiquée	196°C (isotherme)	4 ml/min	45 min	10 $\mu$ g
SM	Mode d'ionisation	Température de la source	Ions caractéristiques	Mode d'ionisation	Température de la source	Ions caractéristiques	
	EI (impact électronique)	Entre 230°-240°C	297 m/z (BBA) 302m/z (BBA marqué)	CI (ionisation chimique)	Entre 185°-195°C	355 m/z (BBA) 361 m/z (BBA marqué)	

La solution de produit BBA étant chargée en réactifs, une colonne capillaire de 100 m est utile pour effectuer une séparation chromatographique efficace. Le de débit est plus faible, la migration plus longue et le produit BBA nécessite une température plus élevée pour son ionisation par impact

électronique (entre 230-240°C) et par ionisation chimique (185°C-195°C). Malgré sa facilité d'excrétion, cette détermination du BBA est la plus longue.

### III-1-2-3 Méthode de référence où la réaction de dérivation conduit à la la formation de Glucose penta acétate aldonitrilé (GPA) [69]

Cette réaction de dérivation a été développée par une équipe de recherche de l'Université de Gand, en Belgique (Stöckl et Reinauer) [69-71]. Les échantillons sont déprotéinisés par ajout de méthanol puis centrifugation. Le méthanol déstabilise les interactions électrostatiques des protéines qui agrègent et précipitent. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant récupéré. Le glucose contenu dans l'extrait déprotéinisé est dérivé par deux réactions successives, une réaction d'aldonitrilation puis une réaction d'acétylation. L'aldonitrilation est réalisée par ajout d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la pyridine et chauffage à 90°C pendant 30 min (**Figure 26**). La réaction d'acétylation s'accomplit grâce à l'ajout d'anhydride acétique et chauffage à 90°C pendant 1 heure, et aboutit à la formation de glucose pentaacétate aldonitrilé (GPA). Le bilan de la réaction s'écrit comme suit :



**Figure 26 :** Dérivation du D-glucose en glucose pentaacétate aldonitrilé par aldonitrilation et acétylation

L'échantillon est évaporé sous flux d'azote afin d'éliminer la pyridine. Le résidu obtenu est repris dans du dichlorométhane avant analyse par CG/SM. La méthode développée par cette équipe a été adaptée de la méthode publiée par Magni et ses collaborateurs [72]. La méthode de l'Université de Gand en Belgique (Stöckl et Reinauer) [69] diffère sur deux points : la déprotéination se fait avec du méthanol plutôt que de l'acétonitrile et la réaction d'acétylation est prolongée en l'exécutant à 90°C pendant 60 min au lieu de 30 min initialement.

Une méthode publiée par une équipe de recherche suisse en 1997 [73], utilisée pour le dosage du glucose par d'autres LNM étrangers, comporte des informations complémentaires à la publication référencée dans le site du JCTLM [69]. Il y est indiqué que les étapes d'évaporation sous azote se font à des températures de l'ordre de 40°-50°C. Le premier temps de chauffage dure 40 min au lieu de 30 min.

Les informations de la détermination par CG/SM sont regroupées dans le **Tableau 5**:

**Tableau 5 : Paramètres de CG/SM pour la détermination de GPA**

<b>CG</b>	<b>Mode d'injection</b>	<b>Type de colonne</b>	<b>Dimensions de colonne</b>	<b>Température de colonne</b>	<b>Débit colonne</b>	<b>Temps de rétention (DAG)</b>	<b>Volume injecté ou quantité injectée <math>\mu\text{l}</math> ou <math>\mu\text{g}</math></b>
	Split 1 :180	Colonne capillaire en silice (phase stationnaire = polymère siliconé)	20 m de long 0,18 mm de diamètre 0,4 $\mu\text{m}$ épaisseur de phase	170°-230°C (gradient de températures)	Non indiqué	8,3 min	1-2 $\mu\text{l}$
<b>SM</b>	<b>Mode d'ionisation</b>	<b>Température de la source</b>	<b>Ions caractéristiques</b>	<b>Mode d'ionisation</b>	<b>Température de la source</b>	<b>Ions caractéristiques</b>	
	EI (impact électronique)	170°C	314 m/z (GPA) 242m/z (GPA*)	CI (ionisation chimique)	Entre 130°-150°C	261 m/z (GPA) 266 m/z (GPA marqué)	

Tout comme le BBA, la préparation de GPA peut engendrer beaucoup d'interférents à partir des réactifs. Une colonne capillaire plus courte est employée (20 m), puisqu'un split de 1/180 est appliqué. De plus petits volumes de solutions de GPA sont autorisés. Le temps de rétention est assez court (8,3 min). La température d'ionisation applicable est de 170°C. Bien que la préparation soit un peu longue, la détermination du GPA, est l'une des plus rapides et des moins coûteuses en produit.

### III-1-2-4 Synthèse des différentes méthodes de référence reposant sur la DI-CG/SM

Le **Tableau 6** résume les caractéristiques des différentes méthodes de référence du JCTLM :

**Tableau 6 :** Synthèse des performances de chacune des méthodes. La gamme de concentrations permises par chaque méthode est indiquée. Chaque temps de préparation est estimé. Les incertitudes associées à chacune des méthodes ont été évaluées. Pour la facilité de mise en œuvre, + : facilité moyenne, ++ : facilité élevée. Pour les interférences, - : pas d'interférence, +++ : interférence élevée. Pour le coût, + : coût moyennement élevé, ++ : coût élevé.

	<b>Hexokinase/G6PDH - Spectrophotométrie d'absorption</b>	<b>DI-CG/SM</b>		
Molécule analysée	<b><i>NADH,H<sup>+</sup>/NADPH,H<sup>+</sup></i></b>	<b><i>BBA</i></b>	<b><i>DAG</i></b>	<b><i>GPA</i></b>
Concentrations mmol/l	2,78 à 22,2 (0,5 g/l à 4 g/l)	2 à 20 (0,36 g/l à 3,6 g/l)		1 à 20 (0,18 g/l à 3,6g/l)
Temps de préparation	24h	48h	96h	6h
Incertitudes	0,3 - 1,7	0,24 - 0,53	0,21 - 0,39	0,4 - 1,4
Facilité de mise en oeuvre	+	++	++	+
Matrice	- sérum	- sérum - plasma - urine - sang total		- sérum
Interférences	+++	-	-	-
Coût	+	++	++	++

La première méthode (Hexokinase/G6PDH- Spectrophotométrie UV-VIS) référencée par le JCTLM, a pour avantage d'être la moins coûteuse et la plus facile à mettre en oeuvre. La méthode DI-CG/SM est la moins longue, ce qui constitue un avantage si on favorise l'économie de temps.

Les incertitudes associées à chaque méthode sont proches, mais la méthode DI-CG/SM/DAG permet de quantifier des concentrations plus basses (1 mmol/l).

En terme de milieux biologiques, un plus grand nombre de matrices ont été analysées avec la DI-CG/SM, alors que la méthode enzymatique de référence n'a été mise en œuvre que sur du sérum [67-73].

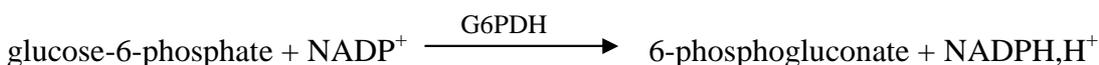
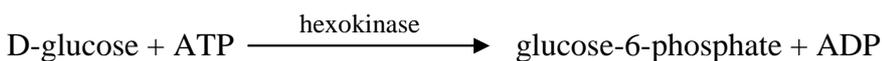
## **III-2 Les techniques et méthodes de quantification du glucose en routine**

Dans les laboratoires de biologie médicale, les méthodes utilisées pour quantifier le glucose font principalement appel à des réactions enzymatiques couplées à des techniques de détection majoritairement spectrophotométriques. Deux grandes méthodes enzymatiques dominent : celle à l'hexokinase et celle à la glucose oxydase.

Chacune d'elle sera explicitée et nous détaillerons les techniques de détection associées [74-77].

### **III-2-1- Méthodes utilisant l'hexokinase**

Le principe de cette réaction est le même que celui développé dans la méthode de référence préconisée par le JCTLM [67]. Il s'agit d'une succession de deux réactions enzymatiques. La transformation du D-glucose en glucose-6-phosphate par l'hexokinase est suivie d'une seconde réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), transformant le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate :



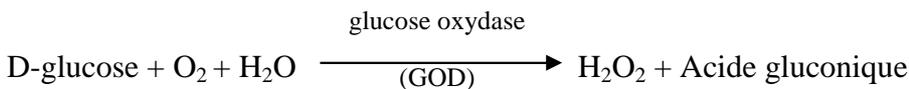
Comme dans la méthode de référence, les molécules de NADPH, H<sup>+</sup> sont quantifiées à la longueur d'onde de 340 nm. Sur le plan expérimental, cette méthode diffère par le temps de préparation des échantillons. En effet, l'utilisation d'automates, dans les laboratoires de biologie médicale réduit le temps d'analyse d'une journée à quelques minutes. Les échantillons sont traités directement, les réactifs et solvants étant déjà préparés.

La technique de détection employée est la même que celle utilisée dans la méthode de référence [67].

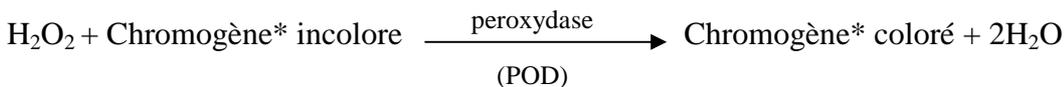
### III-2-2- Méthodes utilisant la glucose oxydase

Ce sont les méthodes les plus couramment utilisées dans les laboratoires de biologie médicale.

La glucose oxydase (GOD) est une enzyme spécifique du D-glucose ; elle catalyse l'oxydation du glucose selon la réaction suivante :



En fonction de la technique de détection employée par la suite, une deuxième réaction peut être associée. Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formé est alors dégradé par une peroxydase (POD), en présence d'un chromogène:



\* Chromogène : substance incolore réagissant avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  en se colorant. Le chromogène le plus couramment utilisé est la 4-amino phénazone qui se colore en rouge.

On parle donc de méthode « glucose oxydase-POD-chromogène ». L'intensité de coloration du chromogène est proportionnelle à la concentration de glucose.

Différentes techniques permettent de quantifier le produit issu de la réaction à la glucose oxydase :

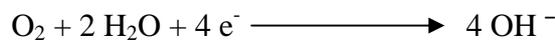
#### ***III-2-2-1 Détection par spectrophotométrie d'absorption***

L'absorbance du chromogène, liée à la concentration de glucose, est mesurée à une longueur d'onde donnée (souvent 505 nm). Les avantages et les inconvénients de cette technique, sont les mêmes que ceux de la méthode à l'hexokinase : bonne sensibilité, interférences.

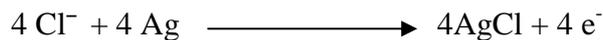
### ***III-2-2-2 Détection avec une électrode à oxygène***

Cette technique consiste à mesurer la concentration de glucose d'un échantillon à l'aide d'une électrode permettant de mesurer la consommation d'oxygène. La seule réaction prise en compte est l'oxydation du glucose par la glucose oxydase (GOD). Le dioxygène ayant réagi sert de substrat à l'électrode à oxygène, encore appelée électrode de Clark, plongée dans le milieu réactionnel. Cette électrode est formée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent entre lesquelles on maintient une différence de potentiel de 0,7 V.

L'oxygène dissous dans le milieu est ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant la réaction:



Au contact de l'anode a lieu une autre réaction :



Il en résulte un courant très faible, proportionnel à la concentration en dioxygène du milieu dans lequel baigne l'électrode. Il est amplifié avant d'être mesuré. L'électrode à oxygène détecte donc dans le milieu la baisse de la teneur en oxygène dissous, due à la consommation de dioxygène par la réaction d'oxydation du glucose. L'électrode nécessite une maintenance adaptée, et cette technique est consommatrice de temps.

### **III-2-3- Traitement du signal**

Quelle que soit la cinétique de la réaction enzymatique, la mesure peut s'effectuer selon différents procédés :

- par le suivi de la cinétique : cette approche consiste à effectuer la mesure à intervalles réguliers pendant le temps de réaction. La multiplication des points expérimentaux permet d'atteindre le résultat avec une précision maximale.
- par la mesure en point final avec blanc : la mesure est réalisée uniquement au niveau du plateau de la courbe après la fin de la réaction. La procédure est plus simple, mais le résultat est moins sûr qu'en mode cinétique. Un blanc réalisé avant le dosage est soustrait du signal de réaction spécifique.

- par la mesure en point final sans blanc : comme précédemment, la mesure est réalisée à la fin de la réaction, mais aucun blanc n'est réalisé. Ce procédé est moins satisfaisant que la mesure en point final avec blanc et est moins utilisé que les précédents.

## **Conclusion**

Les méthodes de dosage du glucose au sein des laboratoires de biologie médicale sont nombreuses. Elles doivent être traçables à une méthode de référence.

Comme il a été décrit au paragraphe III-1 de l'étude bibliographique, les méthodes de référence du JCTLM sont basées sur deux techniques d'analyse dont le principe est différent : la spectrophotométrie d'absorption [67] et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) [68-71]. La première technique peut être sujette à des interférences liées aux produits utilisés lors de la réaction de coloration ou à d'autres composés présents dans la matrice de l'échantillon [67]. Ces interférences peuvent induire un biais sur les résultats.

Il a donc été décidé de développer une méthode de référence basée sur la CG/SM associée à la dilution isotopique (DI-CG/SM). Cette méthode, plus sélective, accompagnée d'un protocole métrologique (par gravimétrie, répétition de mesure) présente les plus hautes qualités métrologiques. La dilution isotopique employée dans ce protocole métrologique fait partie des méthodes primaires.



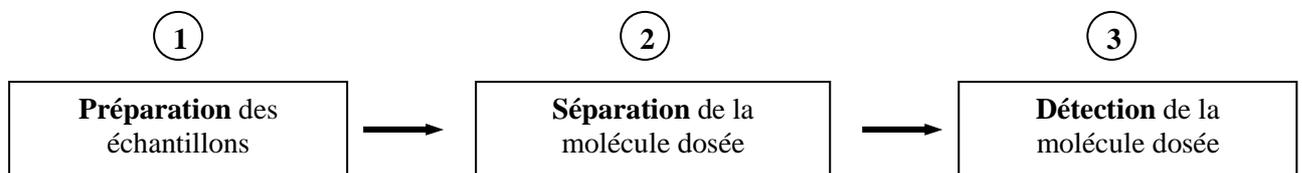
## **B – PARTIE EXPERIMENTALE**

# I - Détermination du glucose par DI-CG/SM

## I -1 Matériel et Méthodes

### I-1-1 Sélection de la méthode de référence

Le JCTLM propose actuellement trois méthodes de référence par DI-CG/SM pour la détermination du glucose dans le sérum, qui comportent trois étapes distinctes (*Figure 27*):



*Figure 27 : Les étapes d'une méthode de référence par DI-CG/SM pour la détermination du glucose dans le sérum*

**1<sup>ère</sup> étape :** Une préparation de l'échantillon consistant à ajouter en premier lieu la molécule marquée (dilution isotopique), puis à déprotéiniser et/ou à purifier le sérum, et enfin à dériver le glucose afin d'obtenir une molécule stable thermiquement pouvant être analysée par chromatographie en phase gazeuse.

**2<sup>ème</sup> étape :** Une séparation des différents composés présents dans l'extrait.

**3<sup>ème</sup> étape :** Une identification et une quantification par spectrométrie de masse.

Les étapes de purification par chromatographie sur couche mince ou par déionisation sur résine échangeuse d'ions décrites pour les produits **BBA** et **DAG** peuvent entraîner des pertes de l'analyte ; elles sont longues et peuvent allonger le protocole. Aussi, nous avons décidé de développer le mode de préparation des échantillons, décrit par l'équipe de Stockl et Reinauer en 1993 [69].

Quel que soit le mode de préparation de l'échantillon, toutes les méthodes de dosage par DI-GC/MS, nécessitent un « pré-dosage » du glucose dans le sérum afin de permettre l'ajout équimolaire du glucose marqué. Cette étape est nécessaire à la mise en œuvre de la dilution isotopique et à l'obtention d'incertitudes faibles.

## **I-1-2 Protocole de préparation des échantillons**

### ***I-1-2-1 Ajout de molécule marquée***

La dilution isotopique nécessite l'ajout à l'échantillon de la molécule marquée correspondant à l'analyte d'intérêt. Une quantité de solution étalon [ $^{13}\text{C}_6$ ]-glucose est ajoutée à une aliquote de sérum en fonction de la concentration estimée en D-glucose de l'échantillon (sur automate, chromatographie liquide à haute pression [HPLC]), afin de respecter un rapport de concentration équimolaire D-glucose/ [ $^{13}\text{C}_6$ ]-D-glucose.

### ***I-1-2-2 Déprotéinisation des échantillons***

Le sérum contient des concentrations élevées de protéines (plus de 70 g/l). Ces dernières peuvent être source d'interférence lors de l'analyse en CG/SM [78]. Il est donc nécessaire de les éliminer des échantillons (purification) tout en préservant l'intégrité de la molécule dosée. Le protocole sélectionné propose de réaliser cette étape de déprotéinisation par précipitation à l'aide de méthanol. Ce dernier sert à déstabiliser les liaisons électrostatiques de la protéine et crée de nouvelles interactions entre les protéines, qui s'agrègent entre elles et précipitent.

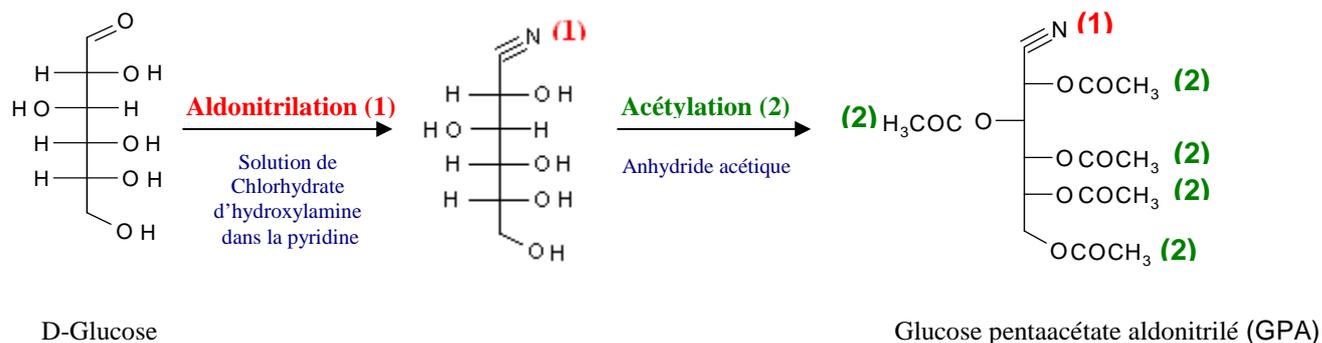
Suite à cette déprotéinisation, l'agrégat est séparé de l'extrait par centrifugation, et le surnageant est récupéré.

### ***I-1-2-3 Réactions de dérivation***

Il n'est pas possible d'analyser directement la molécule de D-glucose en CG/SM. Ce composé n'est pas volatil et est instable aux températures élevées appliquées lors de l'analyse chromatographique. Pour permettre son analyse, la molécule est modifiée en substituant sa fonction aldéhyde par une fonction imine et en ajoutant à ses groupements polaires d'autres groupements qui lui confèrent une stabilité thermique. Cette réaction est une dérivation. Elle comporte deux étapes successives, à la suite desquelles le D-glucose contenu dans les échantillons sanguins purifiés est dérivé en glucose pentaacétate aldonitrilé (GPA). Ce composé, stable thermiquement, peut alors

être vaporisé dans la chambre d'injection du chromatographe en phase gazeuse et être analysé (**Figure 28**).

Au cours de cette réaction, la molécule de D-glucose subit une aldonitrilation suivie d'une acétylation. La fonction aldéhyde est substituée par une fonction nitrile grâce à une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la pyridine (aldonitrilation) et les fonctions alcools sont acétylées grâce à une solution d'anhydride acétique (acétylation).



**Figure 28** : Réaction de dérivation du glucose en glucose penta acétate aldonitrilé: aldonitrilation puis acétylation

Lors de ces deux réactions, il est nécessaire de s'affranchir de toute trace d'eau par déshydratation sous flux d'azote afin d'éviter toute hydrolyse des différents groupements de substitution.

#### I-1-2-3-1 Réaction d'aldonitrilation

En fonction de la concentration de glucose présent dans l'échantillon, 20 à 50 µl de sérum déprotéiné sont prélevés et déshydratés sous flux réduit d'azote à 40°C pendant 15-20 min. Un dépôt blanchâtre se forme. 150 µl de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (0,19 M) dans la pyridine sont ajoutés dans le but d'effectuer la substitution du groupement aldéhyde du D-glucose par un groupement nitrile. Après agitation au vortex, le tube bouché est mis à chauffer à 90°C dans un bain-marie pendant 30 min, afin de catalyser la réaction. Ce temps de chauffage diffère (30 min ou 40 min) selon les sources bibliographiques [69, 73], et il a fait l'objet d'une optimisation dans cette étude. L'arrêt de la réaction est réalisé en retirant le tube du bain-marie et en le laissant à température ambiante.

### *I-1-2-3-2 Réaction d'acétylation*

Au milieu réactionnel précédent, 200 µl d'anhydride acétique sont ensuite ajoutés. L'anhydride acétique permet d'assurer l'acétylation des groupements polaires restants, les groupements alcool. Le milieu réactionnel est homogénéisé au vortex puis la réaction catalysée par chauffage au bain-marie à 90°C pendant 1 heure. Le tube à essais est récupéré et porté à température ambiante. Afin d'étudier la robustesse de la réaction d'acétylation en fonction du temps de chauffage, cette étape a fait également l'objet d'une optimisation dans cette étude.

### *I-1-2-3-3 Changement de solvant*

Après les réactions de dérivation, le GPA est repris dans un solvant qui permet de le solubiliser tout en étant compatible avec la phase méthylpolysiloxanée de la colonne chromatographique. Auparavant, le milieu réactionnel final est mis à évaporer à sec sous flux réduit d'azote à 40°C pendant 80 min. Le résidu obtenu est repris et dissous dans 500µl de dichlorométhane. L'échantillon est prêt à être analysé mais, s'il n'est pas possible de réaliser l'analyse immédiatement, celui-ci peut être conservé à 4°C pendant 1 mois ou à – 80°C pendant 4 mois maximum, conformément à la vérification expérimentale effectuée au cours de cette étude. Les solutions étalons subissent exactement le même protocole que les échantillons sanguins, y compris l'étape de déprotéinisation.

## **I-I- 3 Analyse en GC/MS**

Nous décrivons succinctement les conditions chromatographiques et spectrométriques répertoriées dans les différentes publications correspondant à la méthode de référence sélectionnée.

### *I-I- 3-1 Conditions en chromatographie gazeuse*

#### *I-I- 3-1-1 Choix de la colonne chromatographique*

Afin de mieux orienter le choix de colonne, les conditions révélées dans les trois publications mettant en œuvre la méthode qui a été sélectionnée [69-71], ont été prises en compte. Les longueurs des colonnes de chromatographie varient de 20 à 25 mètres avec des diamètres de 0,18 à 0,20 mm et des épaisseurs de phase stationnaire de 0,33 à 0,40 µm. Toutes les publications s'accordent sur une phase constituée à 100% de diméthylpolysiloxane, soit une colonne apolaire. Nous avons donc décidé de travailler dans un premier temps sur une colonne apolaire de faible

longueur et disponible au laboratoire : 5MS (95 % méthylpolysiloxane, 5 % phényl), de dimensions 30m x 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de phase.

#### *I-I-3-1-2 Injecteur*

Les différentes publications font référence à un injecteur programmable en température (de 60 à 280°C à 12°C/s [69, 71]) avec un split variant de 1/100 [71] à 1/180 [69]. Une seule étude utilise une injection en mode split. Le volume injecté varie de 1 à 2 µl. Nous avons fait le choix d'injecter en mode split ; notre injecteur étant alors à 270°C.

#### *I-I- 3-I-3 Programmation de la température du four*

Comme les paramètres d'injection, la programmation de la température du four est variable selon les auteurs : 60°C à 120°C à 20°C/min [71], 170°C à 230°C à 10°C/min [69, 72]. Si elle n'apparaît pas comme un paramètre critique, elle doit toutefois être optimisée afin d'éviter toute coélution entre les différents oses pouvant être présents dans l'échantillon.

Les paramètres chromatographiques ont donc été optimisés au cours de ce travail, afin d'obtenir la meilleure séparation possible entre les différents constituants de l'échantillon tout en assurant des temps d'analyses les plus courts possibles.

#### *I-I-3-2 Conditions en spectrométrie de masse*

La ligne de transfert qui assure la liaison entre la colonne chromatographique et la source du spectromètre de masse doit être à une température suffisante pour éviter toute recondensation de l'échantillon. Les ions caractéristiques du GPA (dérivé du D-glucose) et du GPA marqué (dérivé du [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-D-glucose) produits suite à leur fragmentation et sélectionnés sont les suivants :

- pour le D-glucose : les ions 314 m/z et 242 m/z :

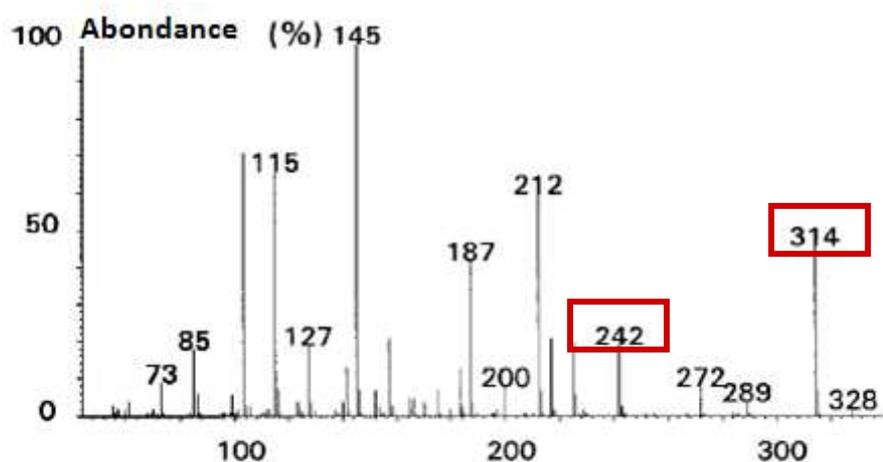


Figure 29 : Spectre de masse du glucose pentaacétate aldonitrilé issu du D-glucose [69]

- pour le D- $^{13}\text{C}_6$ -glucose : les ions 319 m/z et 246 m/z

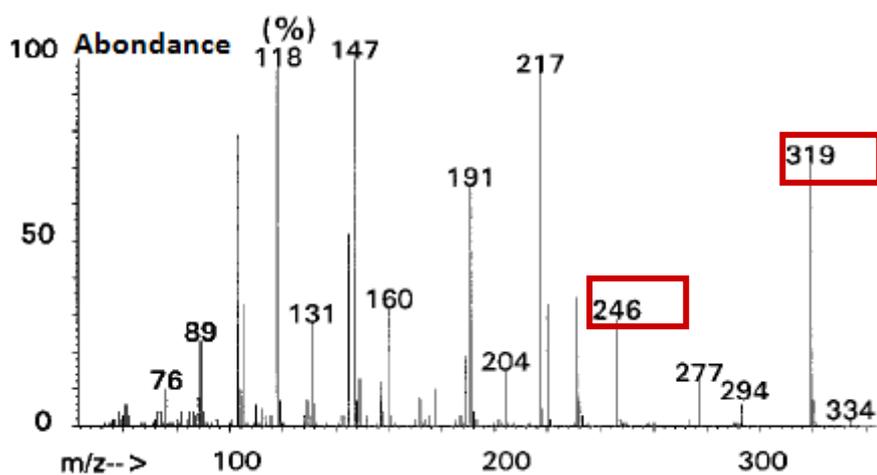


Figure 30 : Spectre de masse du glucose pentaacétate aldonitrilé marqué au  $^{13}\text{C}_6$  issu du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose [69]

#### I-1-4 Produits et matériel

Les produits peuvent être divisés en trois catégories :

- Les produits purs nécessaires à l'étalonnage et la dilution isotopique,

- Les réactifs nécessaires aux réactions de déprotéinisation, de dérivation et les solvants,
- Les matériaux de référence qui permettent de s'assurer de la justesse de la méthode.

Dans ce paragraphe, la préparation des solutions étalons ou des réactifs sera également décrite. Toutes les préparations des solutions étalons et des échantillons sont réalisées par gravimétrie.

#### ***I-1-4-1 Produits purs***

- D-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose, pureté minimale de 99 %, Cambridge Isotope Laboratories (C.I.L.). Conservation dans un endroit sec à température ambiante
- D-(+)-glucose (ACS reagent), pureté minimale 99,9%, Sigma. Conservation dans un endroit sec à température ambiante.

#### ***I-1-4-2 Solutions mères de glucose et de glucose marqué***

Les deux composés précédents permettent de préparer les solutions mères associées :

- Solution mère de D-glucose à 22,2 mmol/l : 200 mg de D-glucose sont introduits dans une fiole jaugée de 50 ml dont le volume est complété avec du sérum physiologique (NaCl 0,15mol/L). Cette solution doit être conservée à 4°C pendant deux semaines maximum.
- Solution mère de D-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose à 11,1mmol/l : 100 mg de D-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose sont introduits dans une fiole jaugée dans laquelle sont exactement ajoutés 50 ml de sérum physiologique (NaCl 0,15mol/L). Cette solution doit être conservée à 4°C pendant deux semaines maximum.

#### ***I-1-4-3 Solutions étalons***

Les solutions étalons sont préparées à partir des solutions mères de glucose et de glucose marqué de manière à obtenir un rapport de quantité de matière D-glucose / D-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose, variant entre 0,8 et 1,2,. Le volume final de chaque solution étalon est de 1ml. Le volume de solution de D-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose est fixe ; celui de la solution de D-glucose varie. Ces solutions étalons peuvent être stockées à 4°C pendant 2 semaines maximum.

#### ***I-1-4-4 Matériau de référence***

Parmi les matériaux de référence certifiés (MRC) référencés par le JCTLM, nous avons sélectionné le MRC suivant car il se présente sous la forme de sérum dont les concentrations permettent de valider le domaine d'application de la méthode développée (de 1,92 mmol/l à 16,25 mmol/l) :

- SRM 965a glucose in frozen serum [Certificat: Annexe 1]

#### ***I-1-4-5 Echantillons sériques***

Dans cette thèse, nous avons pu utiliser plusieurs types d'échantillons :

- Sérums de patients provenant de sang veineux prélevé en tube sec,
- Sérum humain lyophilisé reconstitué avec de l'eau distillée,
- MRC.

Les sérums lyophilisés sont conservés à 4°C pendant 4 ans s'ils ne sont pas encore reconstitués. Une fois reconstitués, ils peuvent être conservés à - 80°C pendant un an maximum, au même titre que les échantillons se présentant sous forme de sérum congelé.

#### ***I-1-4-6 Réactifs***

- Sérum physiologique (NaCl, 0,15 M, Cooper). Conservation à 4°C, au maximum une semaine après ouverture.
- Méthanol : 99,9 %, qualité spectrophotométrique (Sigma-Aldrich).
- Anhydride acétique : pureté 98 % (Sigma-Aldrich).
- Dichlorométhane : pureté 99,5% (Sigma-Aldrich).
- Chlorhydrate d'hydroxylamine : pureté minimale 99,999 % (Sigma-Aldrich). Stockage dans un endroit sec à température ambiante.
- Pyridine anhydre : pureté minimale 99,9 %, (Sigma-Aldrich). Elle doit être anhydre pour éviter toute hydrolyse du GPA, et conservée dans un endroit sec.

La préparation des solutions de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la pyridine à 0,19 M est réalisée par gravimétrie à chaque série d'analyse, de la manière suivante : 333 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine sont pesés dans une fiole jaugée de 25 ml et le volume est complété avec la pyridine.

### ***I-1-4-7 Matériel***

- Congélateur à  $- 80 \pm 10^{\circ}\text{C}$  (stockage des échantillons sanguins et des matériaux de référence)
- Réfrigérateur à  $+ 4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  (stockage des solutions en cours de préparation)
- Evaporateur thermostaté sous flux réduit d'azote (évaporation des solutions)
- Vortex
- Bain-marie SWV 22 Julabo, température jusqu'à  $100^{\circ}\text{C}$ .
- Tubes à essais : 6 ml
- Fioles jaugées : 50 ml et 25 ml, classe A
- Balances de précision (**Tableau 7**):

**Tableau 7 : Caractéristiques des balances de précision utilisées**

Balance	Pesée de 100 mg à 2g	Pesée de 2 g à 200 g
Portée	20 g	200 g
Résolution	0,001 mg	0,01 mg

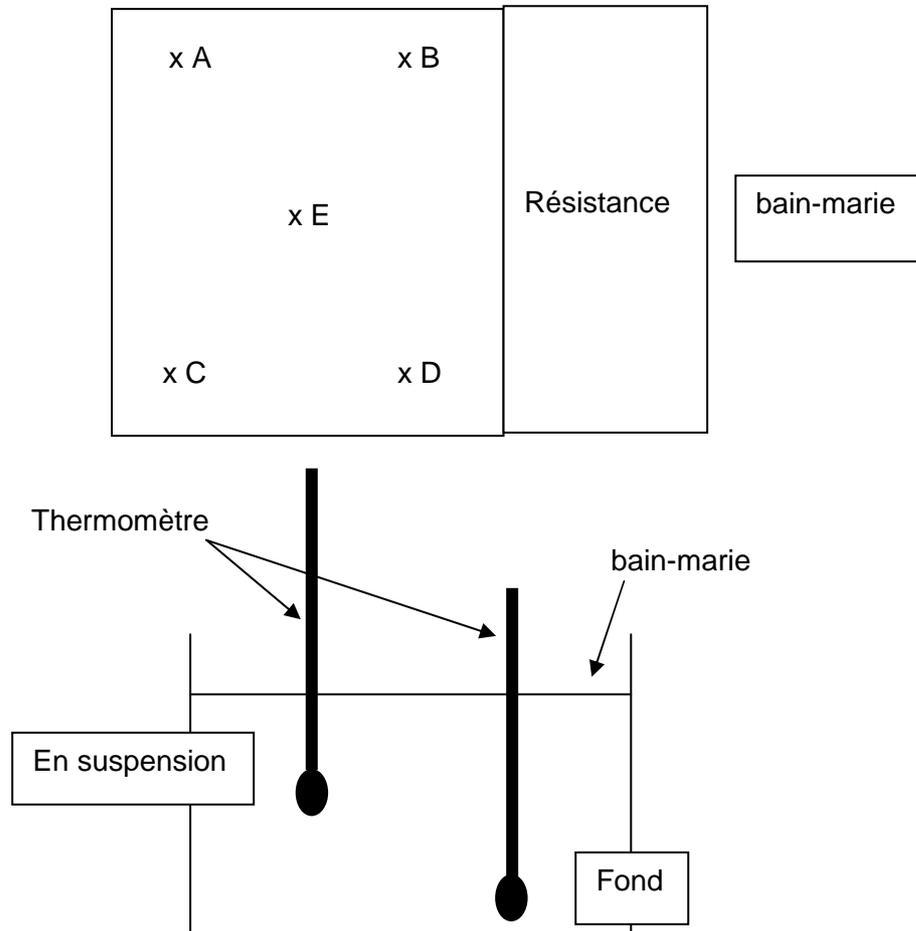
- Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Agilent, 6890N (CG) et 5975B (SM)
- Colonne chromatographique capillaire apolaire 5MS (95 % méthylpolysiloxane, 5 % phényle) de dimensions 30m x 0,25 mm et 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de phase.

Le matériel décrit ci-dessus nécessite parfois des caractérisations préliminaires, comme l'homogénéité des températures dans une enceinte réfrigérée ou chauffée, ou la vérification de l'exactitude des rapports m/z du spectromètre de masse. Les caractérisations sont mises en œuvre dans le cadre de l'assurance qualité. En revanche, le bain-marie, outil dédié à cette étude, n'a jamais été caractérisé à la température utilisée.

Cette caractérisation est réalisée en laissant le bain se stabiliser à la température définie pendant 1h30, puis :

- En vérifiant l'adéquation entre la température affichée sur le régulateur et celle mesurée dans l'enceinte.
- En s'assurant de l'homogénéité de la température en tout point du bain.

Bien que l'eau du bain soit homogénéisée par une pompe, il est nécessaire de s'assurer que la température est homogène en tout point du bain, en surface et en profondeur. Pour cela, une cartographie a été définie (**Figure 31**) et la température a été mesurée cinq fois en chaque point.



**Figure 31** : Points de vérification du bain-marie

Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 8** :

**Tableau 8** : Températures mesurées dans le bain-marie. Les valeurs sont la moyenne des cinq mesures et leur incertitude.

Zones du bain-marie	Température « fond »	Température « en suspension »
Zone A	90,0 ± 0,8 °C	90,0 ± 0,8 °C
Zone B	90,0 ± 0,8 °C	90,0 ± 0,8 °C
Zone C	90,0 ± 0,8 °C	90,0 ± 0,8 °C
Zone D	90,0 ± 0,8 °C	90,0 ± 0,8 °C
Zone E	90,0 ± 0,8 °C	90,0 ± 0,8 °C

En travaillant par itération, nous avons pu montrer que pour obtenir une température de 90°C dans le bain, il était nécessaire de régler l'afficheur à 93°C. Une fois la température de 90°C atteinte dans le bain, il n'existe pas de différence significative de température aux différents points testés. L'homogénéité du bain a donc été vérifiée.

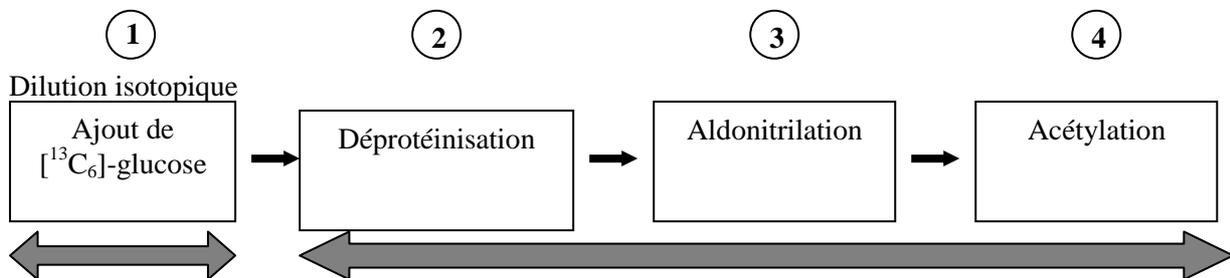
## I-2 Optimisation de la méthode

La méthode de référence que nous avons retenue pour la détermination du glucose repose sur la dérivation du glucose en glucose pentaacétate aldonitrilé (GPA) puis sur une détermination par DI-CG/SM.

Chaque étape a été optimisée afin d'obtenir une méthode juste présentant les incertitudes les plus faibles possibles.

### a) Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon peut être décomposée en quatre étapes (*Figure 32*) :



*Figure 32: Différentes étapes de la préparation de l'échantillon pour la détermination du glucose par DI-CG/SM*

Les différentes références bibliographiques décrivant la méthode de référence sélectionnée proposent des temps de réactions de dérivation variant de 30 à 40 minutes pour la réaction d'aldonitration [68-73]. Le temps de réaction pour l'acétylation est toujours, en revanche, de 60 minutes. Pour tous les auteurs, ces deux réactions doivent être réalisées à 90°C. Afin de définir un temps suffisant pour que la réaction soit totale mais également le plus court, nous avons réalisé des études de cinétique. De plus, il était nécessaire de vérifier que les étapes de centrifugation et d'évaporation « à sec » des produits de réaction n'engendrent pas une contamination et/ou une perte de l'analyte.

### b) Séparation chromatographique

Nous avons sélectionné une colonne chromatographique différente de celles décrites dans la littérature (cf. chapitre « matériel et méthode »). Les paramètres chromatographiques (mode d'injection, programmation en température du four ...) ont donc dû être optimisés.

### *c) Détection et quantification de la molécule dosée*

Si les spectres de masse sont bien connus, les paramètres d'acquisition du spectromètre de masse doivent être définis afin d'obtenir des pics chromatographiques suffisamment résolus, définis et répétables.

## **I- 2- 1 Optimisation de la séparation chromatographique**

Lors de la préparation d'échantillon, si des composés comme les protéines sont éliminés lors de la déprotéinisation, d'autres composés de structure similaire au glucose, comme le mannose, le galactose, sont présents dans l'échantillon, et subissent également les réactions de dérivation. Ils se retrouvent donc dans l'extrait final, en tant qu'interférents (mêmes ions caractéristiques). Il est alors nécessaire de disposer d'une méthode chromatographique permettant de les séparer afin de quantifier correctement le glucose.

Le choix de l'injecteur et de sa programmation est essentiel pour obtenir des pics chromatographiques présentant une bonne résolution. Afin d'éviter une saturation de la colonne, il a été décidé de travailler avec un injecteur avec division (injecteur split).

### ***I-2-1-1 L'injection avec division (split)***

Cet injecteur permet un transfert rapide de l'échantillon sur la colonne et l'utilisation d'une quantité injectée très faible. L'échantillon est introduit dans l'injecteur, vaporisé et mélangé avec le gaz vecteur dans la chambre de vaporisation. Puis le débit du gaz vecteur et des analytes est divisé en deux parties : la plus importante est évacuée par une fuite (débit de fuite :  $d_F$ ), alors que la plus petite arrive en tête de colonne (débit de colonne :  $d_C$ ). Le rapport de division  $R$  est défini par :  $R = d_C / d_F$ .

Tous les paramètres doivent être optimisés afin que l'injecteur à division puisse être apte à introduire dans la colonne une partie reproductible de l'échantillon sans discrimination, afin de pouvoir réaliser une quantification. En effet, quelle que soit la concentration de l'échantillon, la partie envoyée dans la colonne doit toujours être proportionnelle à un rapport de division fixé.

Suite à différents essais, la température de chauffage de l'injecteur a été fixée à 270°C. Nous avons optimisé deux paramètres : le volume injecté et le rapport de split.

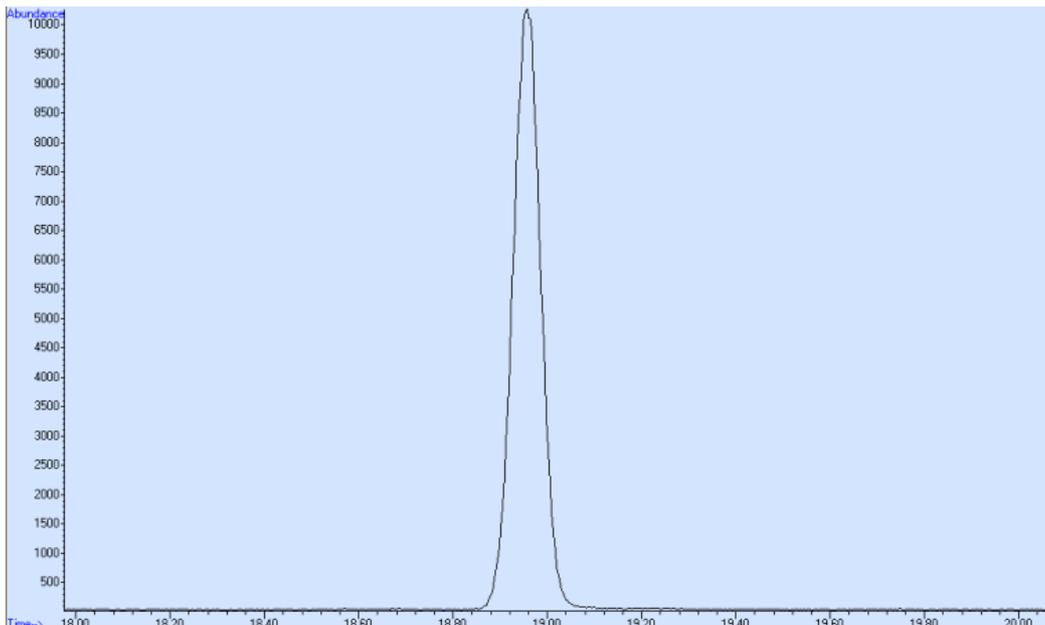
Le volume d'échantillon ne doit pas excéder le volume de la chambre de vaporisation, dont la configuration (diamètre, longueur, position de la tête de colonne...) permet d'avoir un rapport de division constant quels que soient le volume et la concentration de l'échantillon injecté. En effet, dans cette chambre, l'échantillon doit être totalement vaporisé, homogénéisé et divisé, et ce quelles que soient les fluctuations de pression dues à la vaporisation. Au vu des caractéristiques physico-chimiques du solvant de l'échantillon injecté (dichlorométhane) et des caractéristiques de la chambre de vaporisation, un volume maximum de 3 µl d'échantillon ne doit pas être dépassé. Suite aux résultats obtenus avec différents volumes d'injection variant de 1 à 3 µl, il a été décidé de travailler avec un volume injecté de 1 µl car une meilleure définition et résolution de pic chromatographique a été obtenue à ce volume.

Le choix du rapport de split est influencé par la nature et la concentration de l'échantillon à doser, des caractéristiques de la colonne capillaire (longueur, diamètre), de la géométrie de la chambre de vaporisation et du détecteur (en spectrométrie de masse, les débits de colonne sont plus faibles que ceux pouvant être appliqués avec d'autres détecteurs). Selon les indications du constructeur de notre appareil, le rapport optimal serait compris entre 1/10 et 1/25.

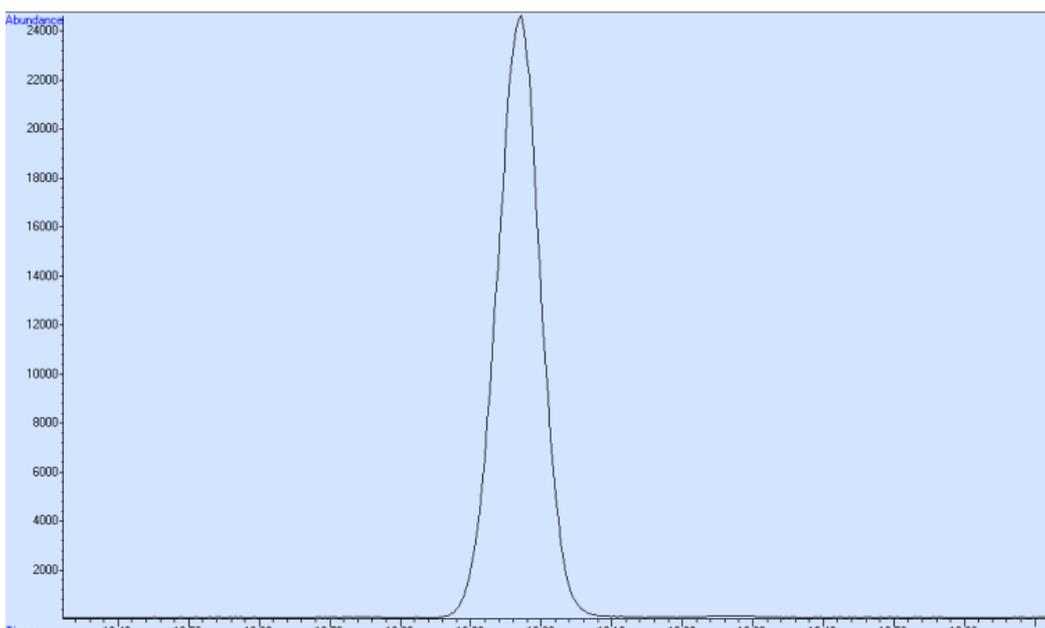
Pour définir la valeur optimale, deux solutions représentatives du domaine de concentration ont été préparées :

- Solution 1 : 0,5 g/l de glucose et 2,5 g/l de glucose marqué,
- Solution 2 : 5 g/l de glucose et 2,5 g/l de glucose marqué.

L'analyse **qualitative** des pics chromatographiques n'a pas permis de mettre en évidence de différence statistique entre les deux rapports (*Figure 33* et *Figure 34*) :



**Figure 33** : Chromatogramme d'un pic de produit (ion 314 m/z) de GPA de la solution 1 (**rapport 0,2**) pour un split de 1/10



**Figure 34** : Chromatogramme d'un pic de produit (ion 314 m/z) de GPA de la solution 2 (**rapport 2**) pour un split de 1/10

La réponse étudiée est le rapport des aires de pic (aire du pic du glucose / aire du pic du glucose marqué), afin de s'affranchir des éventuelles variations de réponse du spectromètre de masse (**Tableau 9**), mais aussi de se retrouver dans les mêmes conditions de quantification puisque la dilution isotopique met en œuvre les rapports molécule/molécule marquée (cf III-2-1).

**Tableau 9 :** Rapport entre les aires de pic du glucose et les aires de pic du glucose marqué pour deux rapports de split différents (1/10 et 1/25) et ce, pour deux concentrations de glucose différentes (0,5 g/l et 5 g/l). La concentration de la solution de glucose marquée est de 2,5 g/l. Les coefficients de variation sont obtenus à partir de trois injections d'une même solution et leur expression est égale au rapport écart-type/concentration moyenne.

Concentration (g/l)	Rapport de division	Rapport d'aires de pics Glc/Glc*	Moyenne	CV (coefficient de variation) %
[Glc] : 0,5 [Glc*] : 2,5	1/10	0,218 0,218 0,216	0,217	0,60
	1/25	0,217 0,224 0,222	0,221	1,69
[Glc] : 5 [Glc*] : 2,5	1/10	2,142 2,116 2,128	2,129	0,60
	1/25	2,123 2,120 2,126	2,123	0,14

Pour chaque solution, il n'existe pas de différence significative entre les valeurs obtenues pour chaque valeur de rapport de split. Aucune discrimination lors de l'étape de vaporisation n'a été mise en évidence pour ces deux rapports. En revanche, pour la concentration la plus faible, le coefficient de variation du rapport des aires de pics est plus élevé pour un rapport de 1/25 (1,69 %) que pour un rapport de 1/10 (0,6 %). Cette observation est inversée pour la concentration la plus élevée.

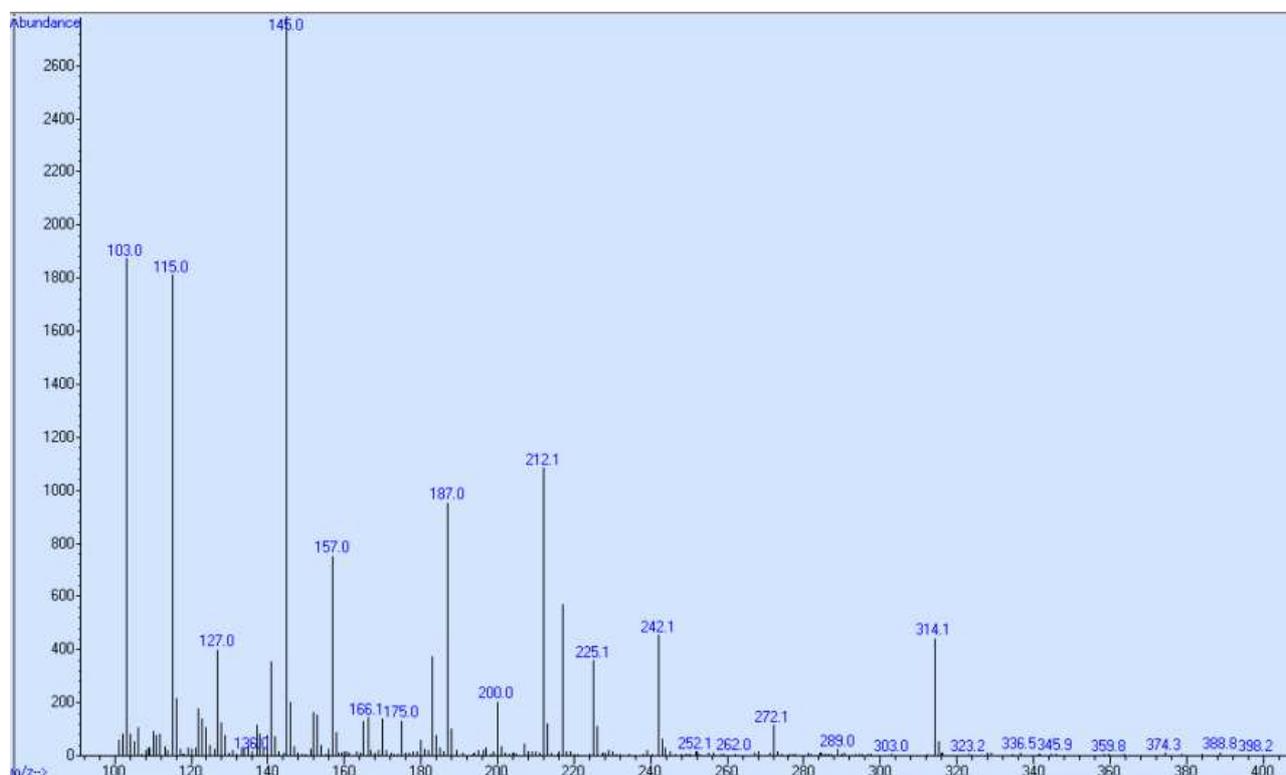
Le split de 1/10 présente une division de flux moins importante et manifeste une répétabilité constante quelque soit la concentration.

La gamme de travail de notre étude oscille entre des concentrations allant approximativement de 0,5 à 5 g/l. Compte tenu de la gamme de concentration étudiée, nous avons fait le choix de travailler avec un split de 1/10.

### *I-2-1-2 Programmation en température du four*

Le but de la chromatographie est de séparer les différents constituants d'un mélange tout en assurant un temps d'analyse le plus court possible. Le pic du glucose pentaacétate aldonitrilé (GPA) a été isolé, ainsi que son homologue marqué des différents composés présents dans l'échantillon final. Les principaux interférents sont les oses les plus présents dans les échantillons sanguins : le mannose et le galactose.

Aussi, il a été nécessaire de vérifier que ces composés n'interfèrent pas sur le signal du GPA. Pour cela, une solution de mannose dérivé et une solution de fructose dérivé sont analysées afin de déterminer leurs spectres de masse (**Figure 35**). Ceux-ci se sont avérés être identiques à celui du glucose.



**Figure 35** : Spectre de masse confondu du glucose pentaacétate aldonitrilé, du mannose pentaacétate aldonitrilé et du galactose pentaacétate aldonitrilé.

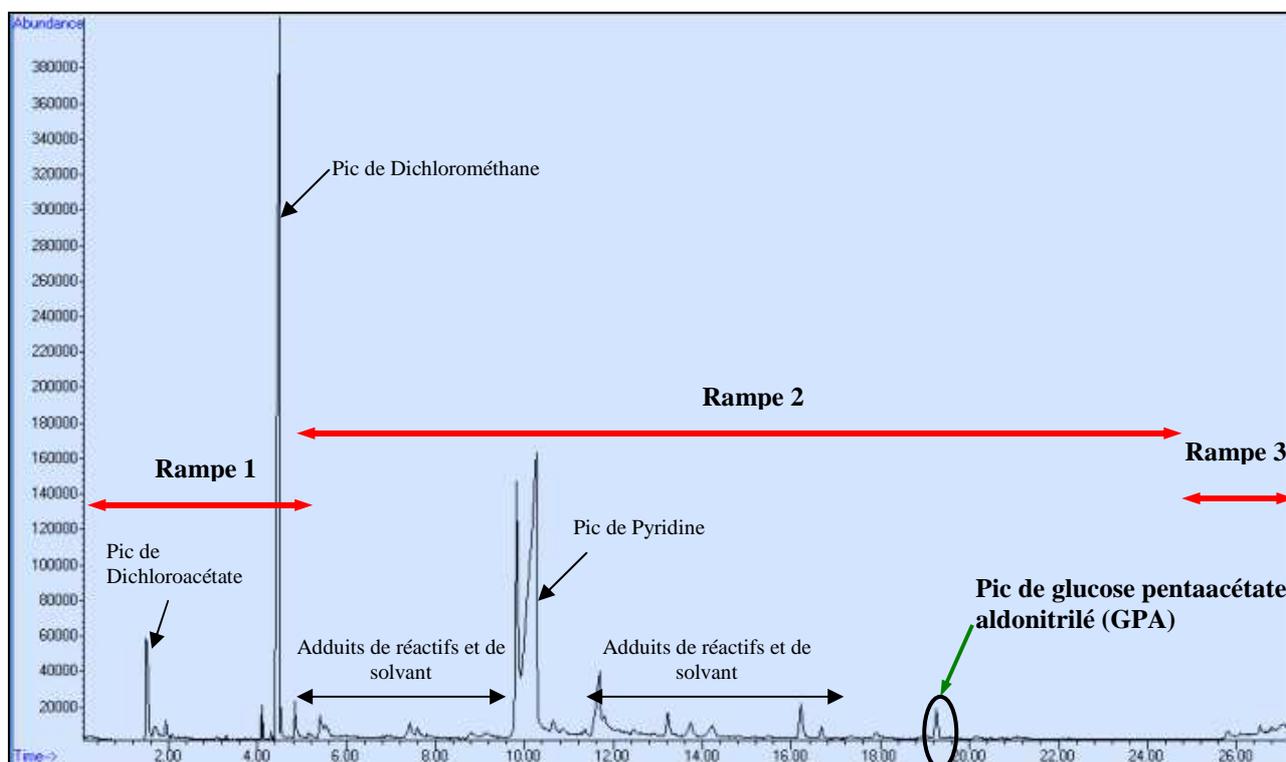
Comme les ions caractéristiques sont identiques, la séparation des composés dérivés du glucose, mannose et galactose doit être réalisée. La programmation en température du four a été optimisée (**Tableau 10**) afin d'obtenir une séparation optimale des différents constituants du mélange (**Figure 36** à **Figure 40**).

**Tableau 10** : Programmation en température du four.

Programmation	°C/min	Température °C	Temps (min)
Initial		50	0
<b>Rampe 1</b>	20	160	5,5
<b>Rampe 2</b>	2	200	25,5
<b>Rampe 3</b>	120	280	27,17

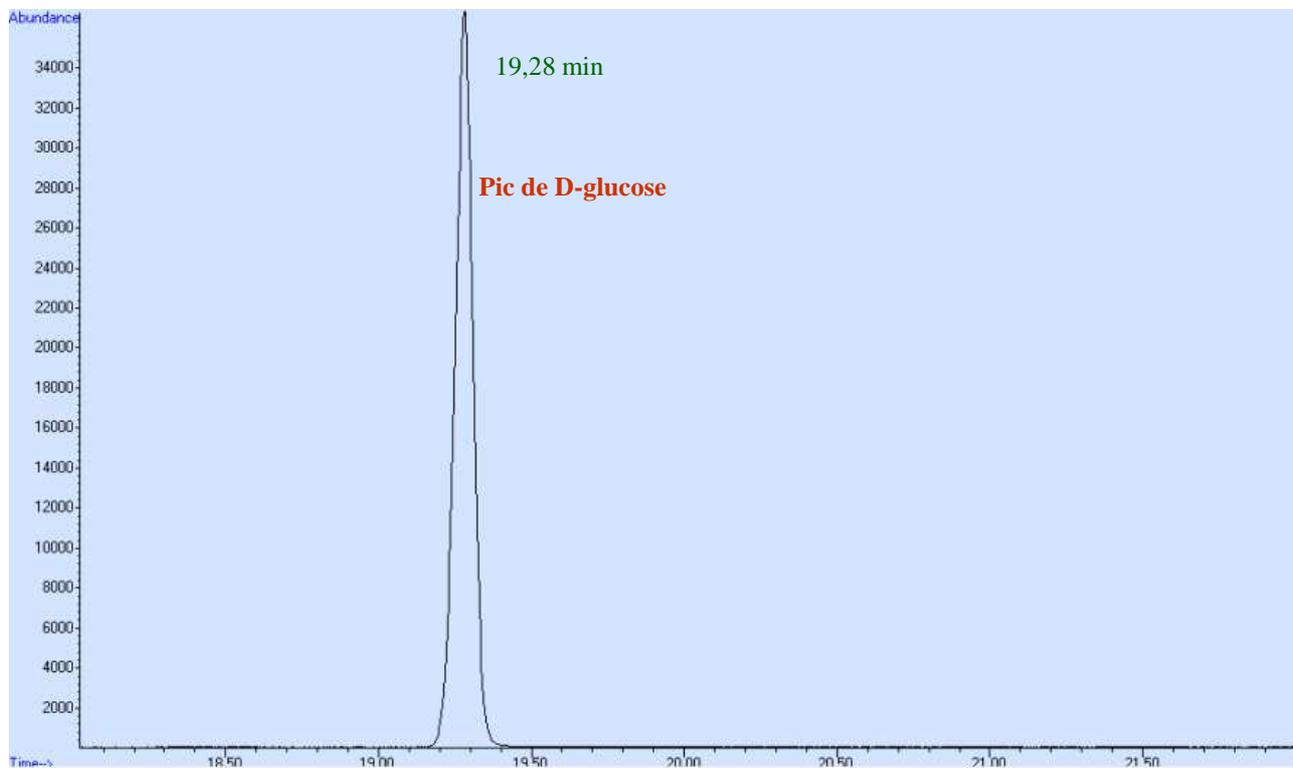
Lors des cinq premières minutes d'analyse, des composés tels le dichlorométhane ou ses adduits comme le dichloroacétate sont élués. Le temps de rétention du GPA est de l'ordre de 19 minutes. Le temps d'analyse est de 30 minutes.

L'optimisation de cette étape de programmation a conduit à modifier les paliers de température appliquées, et donc les paramètres "rampe 1" et "rampe 2", afin de bien distinguer la phase d'éluion des réactifs de celle du produit de réaction. Ces études nous ont montré que le prolongement de la phase de rampe 1 par l'application d'un palier de température plus lent, étale les premiers pics de solvants (dichlorométhane, dichloroacétate) au-delà des 6 minutes, de sorte à ce qu'ils soient proches des pics de réactifs. Par conséquent, le temps restant en phase de rampe 2 pour permettre la séparation du pic de produit est trop court et ce dernier a un temps de rétention proche de ceux des pics de réactif ou, selon les cas, se retrouve confondu.

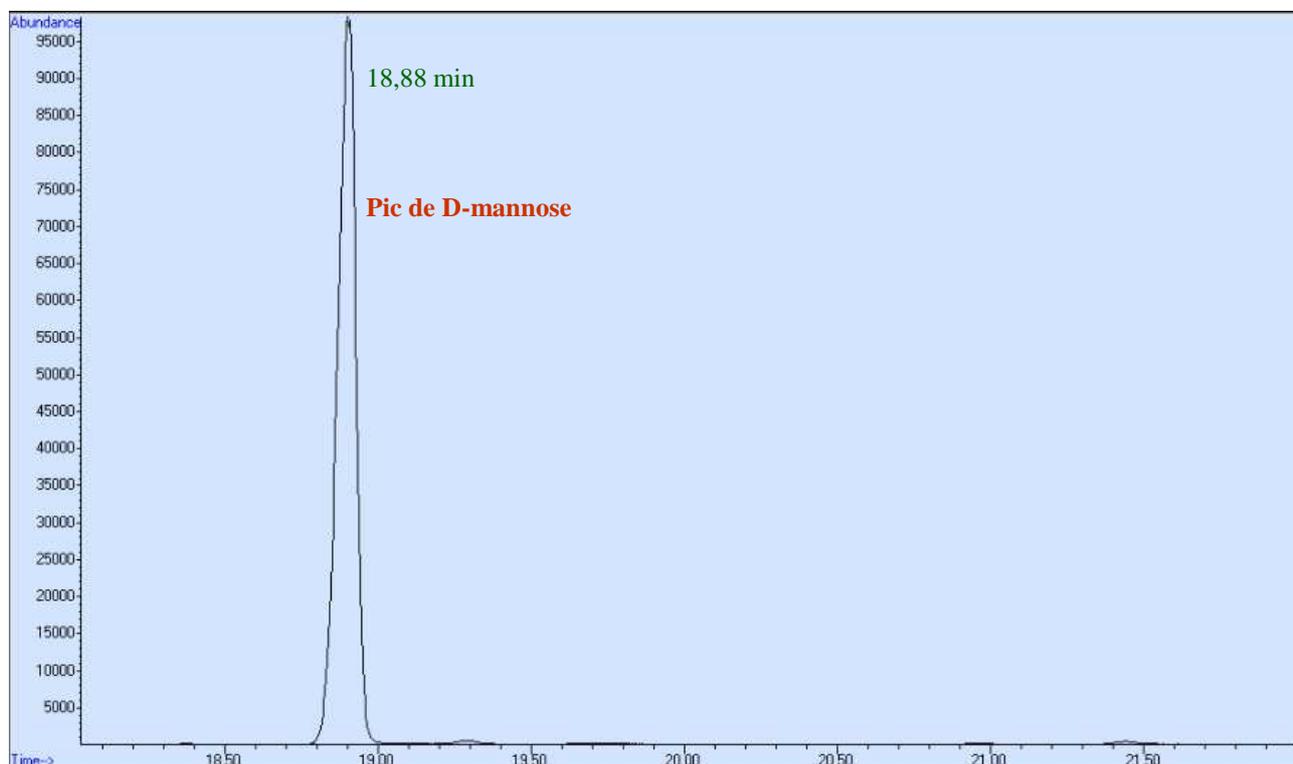


**Figure 36** : Chromatogramme d'une solution de GPA à 10 mg/l (mode d'acquisition : full scan).

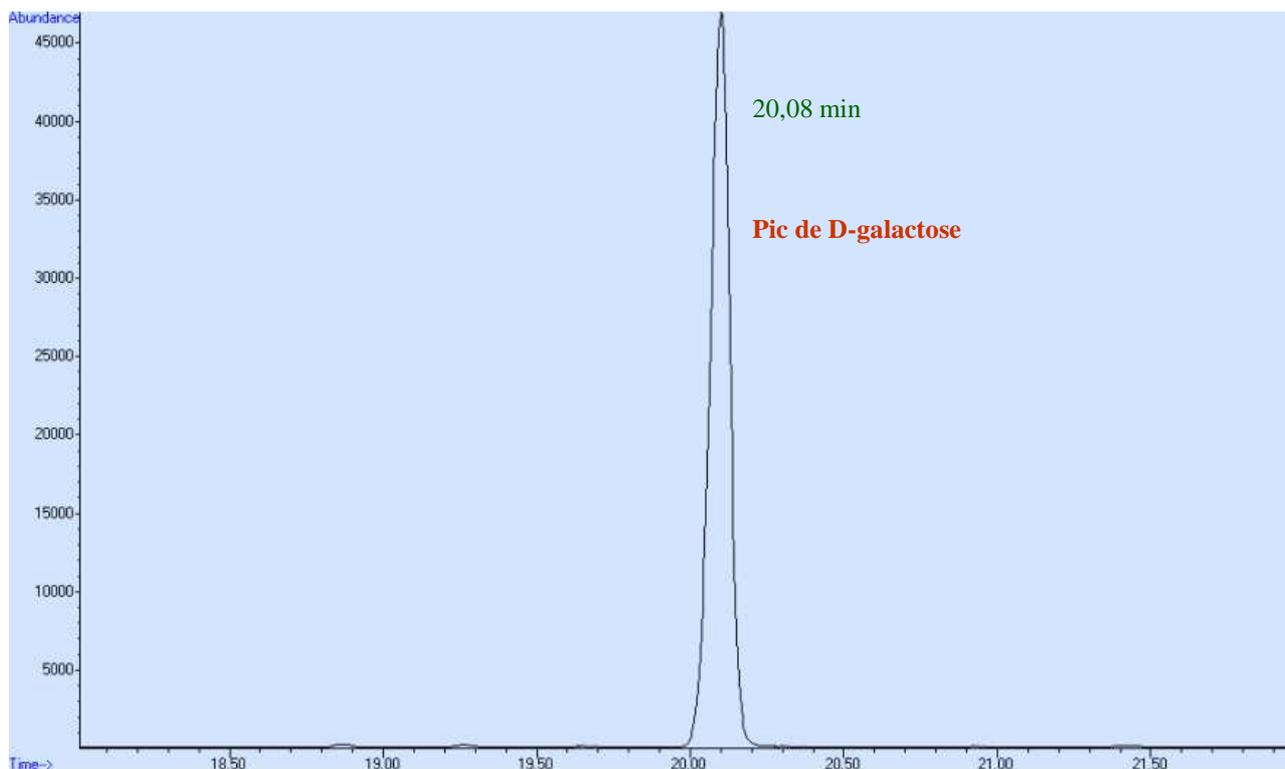
Au final, la programmation de température que nous avons choisie est l'idéale pour permettre d'isoler correctement notre pic de produit.



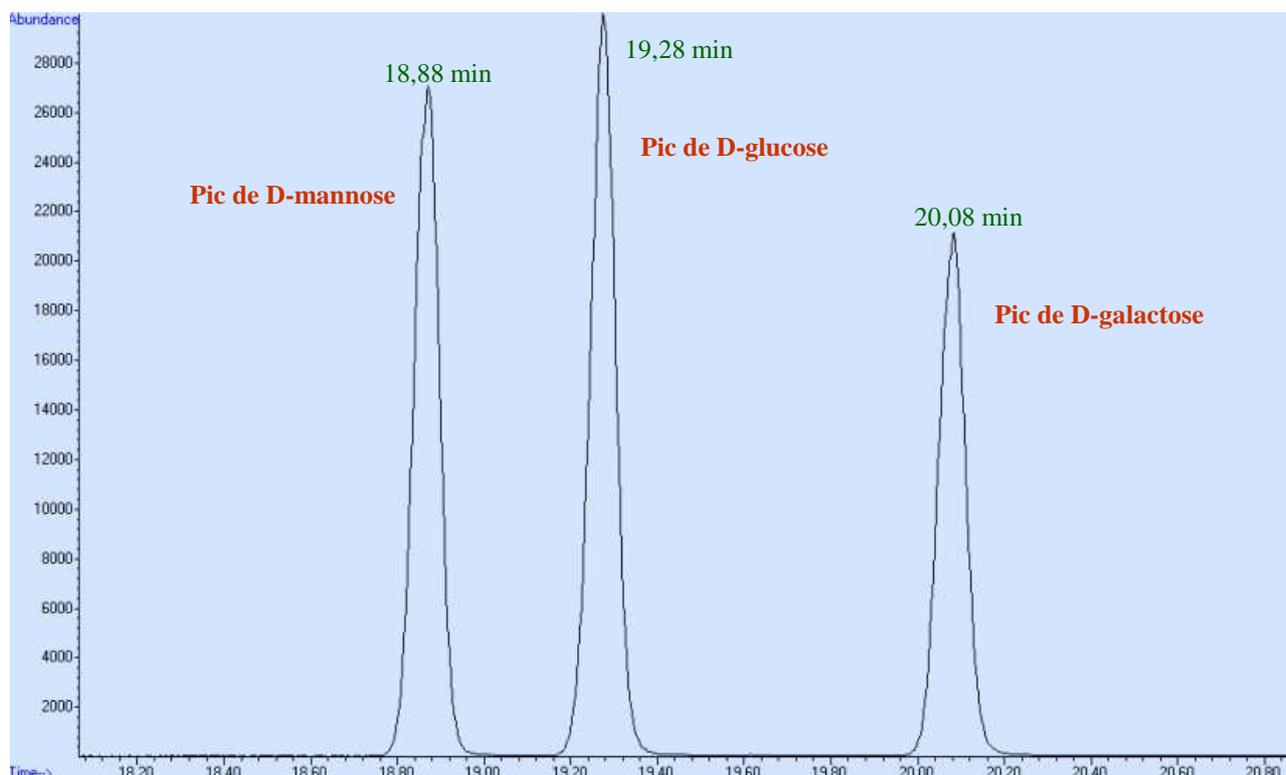
**Figure 37 :** Chromatogramme en mode SIM d'une solution étalon de D-glucose dérivé. L'ion caractéristique observé est l'ion 314 m/z.



**Figure 38 :** Chromatogramme en mode SIM d'une solution étalon de D-mannose dérivé. L'ion caractéristique observé est l'ion 314 m/z.



**Figure 39 :** Chromatogramme en mode SIM d'une solution étalon de D-galactose dérivé L'ion caractéristique observé est l'ion 314 m/z.



**Figure 40 :** Séparation des pics chromatographiques des trois oses : D-glucose, D-mannose et D-galactose, constituants d'un échantillon.

Les écarts de temps de 0,4 min (D-mannose) et de 0,8 min (D-galactose) sont suffisants pour permettre la séparation des trois oses, aux concentrations étudiées.

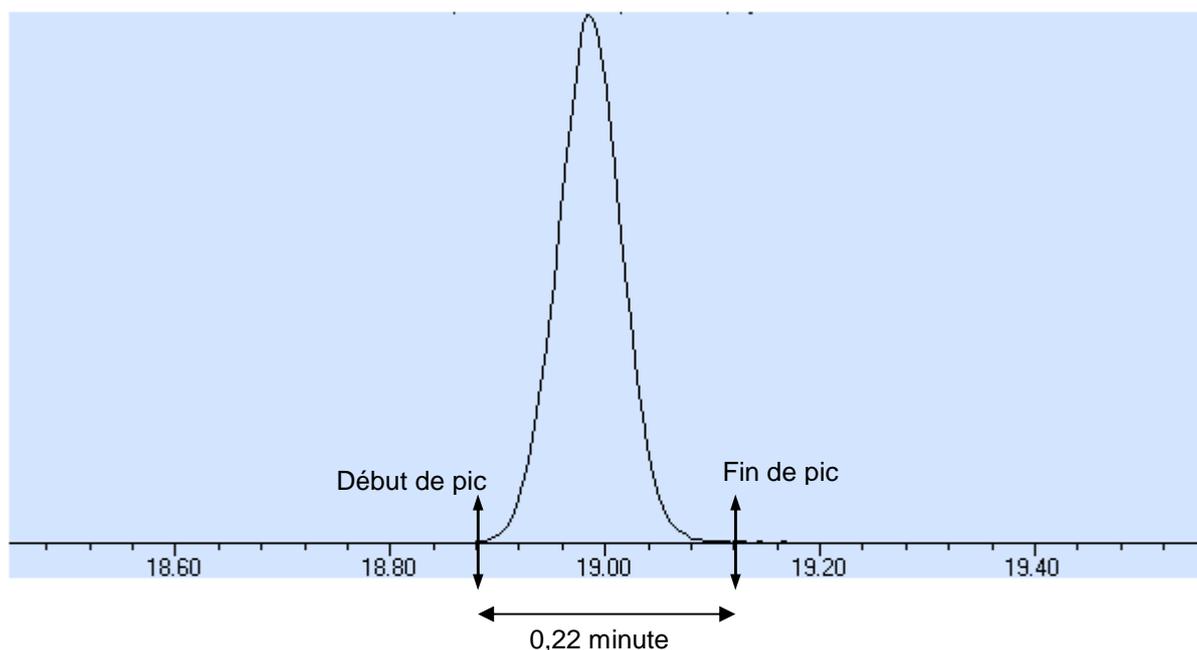
## I-2-2 Optimisation des paramètres d'acquisition du spectromètre de masse

Le mode d'acquisition du spectromètre de masse sélectionné est le mode « single ion monitoring », dont le principe est d'enregistrer le signal des ions caractéristiques d'une ou plusieurs molécules pendant un temps défini. Les différents paramètres doivent être optimisés afin d'obtenir un pic chromatographique défini par un nombre suffisant de points d'acquisition et ainsi une répétabilité optimale du signal (*Figure 41*).

Les paramètres optimisés sont les suivants :

- Température de la ligne de transfert : 270°C
- Température de la source : 230°C
- Température du quadrapôle : 150°C
- Fréquence d'acquisition des données : 20 Hz
- Délai de solvant : 5 min
- Dwell time : 50 ms

Le dwell time correspond au temps durant lequel le signal est enregistré sur une masse donnée.



*Figure 41* : Pic de GPA (mode d'acquisition : SIM, ion 314 m/z)

Le traitement du signal peut être réalisé soit en mode manuel par l'opérateur, soit en mode automatique par le logiciel. Selon les applications, il peut exister une influence du mode d'acquisition sur la répétabilité, surtout lorsque la ligne de base du signal est instable. Même si,

dans notre étude, les chromatogrammes présentent une stabilité de la ligne de base, nous avons voulu évaluer l'influence du mode d'intégration. Pour cela, deux solutions ont été préparées :

- **Solution 1** : [glucose] = 0,5 g/l et [glucose marqué] = 2,5 g/l, **rapport de concentration 0,2**
- **Solution 2** : [glucose] = 5 g/l et [glucose marqué] = 2,5 g/l, **rapport de concentration 2**

Ces solutions sont dérivées puis analysées par CG/SM. Les pics des chromatogrammes ont été intégrés manuellement et automatiquement (*Tableau 11*).

*Tableau 11 : Résultats obtenus par intégration manuelle ou automatique à partir des solutions 1 et 2*

	Solution 1, Rapport de concentration 0,2		Solution 2, Rapport de concentration 2	
	Rapport ions 314/319	Rapport ions 242/246	Rapport ions 314/319	Rapport ions 242/246
	<b>Intégration Manuelle</b>			
	0,2137	0,2343	2,1800	2,1336
	0,2235	0,2297	2,1105	2,1169
	0,2211	0,2175	2,1724	2,1294
<u>Moyenne</u>	0,2194	0,2272	2,1543	2,1266
<u>Ecart-type</u>	0,005	0,009	0,038	0,009
<b>CV (%)</b>	<b>2,34</b>	<b>3,82</b>	<b>1,77</b>	<b>0,41</b>
	<b>Intégration Automatique</b>			
	0,2182	0,2213	2,1417	2,1480
	0,2183	0,2197	2,1161	2,1473
	0,2160	0,2196	2,1277	2,1345
<u>Moyenne</u>	0,2175	0,2202	2,1285	2,1432
<u>Ecart-type</u>	0,001	0,001	0,013	0,007
<b>CV (%)</b>	<b>0,60</b>	<b>0,43</b>	<b>0,60</b>	<b>0,35</b>

Quel que soit l'échantillon, en intégration automatique les coefficients de variation (CV) des rapports d'aires de pic de trois injections consécutives sont inférieurs à 1%, alors que, en intégration manuelle ils varient entre 0,4 et 4 %. Nous avons donc décidé d'intégrer les pics en mode automatique, mais l'opérateur doit s'assurer visuellement que l'opération est correctement réalisée.

## **I-2-3 Optimisation de la préparation des échantillons**

### ***I-2-3-1 Addition de [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose (dilution isotopique)***

Afin de minimiser les incertitudes sur le résultat final, nous avons décidé de travailler par gravimétrie et non pas par volumétrie, aussi bien pour la préparation des solutions étalons que pour la préparation des échantillons. Si, par volumétrie, il est possible de prélever des échantillons de volumes faibles (de 5 à 20 µl), par gravimétrie, afin de disposer d'incertitudes faibles, et au vu des caractéristiques de la balance (portée de 20 g et résolution de 1µg), il peut être nécessaire de prélever des volumes plus importants d'échantillon.

La gamme de travail pour des analyses de glucose est de 1,66 mmol/l à 27,8 mmol/l, ce qui représente, pour des ajouts équimolaires, des prélèvements de 20µl à 100 µl avec un ajout de 40 µl de la solution de glucose marqué. Par expérience au laboratoire, il est généralement souhaité de travailler avec des volumes supérieurs à 50 µl afin de limiter au maximum les incertitudes. Dans ce cas, il faudrait diluer les échantillons pour obtenir des volumes plus élevés ; la dilution rajoutant une source d'incertitudes. Aussi, nous avons évalué l'influence du volume de sérum prélevé et travaillé sur quatre échantillons sanguins de concentration variant de 1,92 mmol/l à 16,26 mmol/l.

Un premier protocole fixe les volumes de sérum de 29 µl à 130,2 µl avec un ajout de 42 µl de solution de [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose.

Un second protocole fixe les volumes de sérum de 87µl à 290,6 µl avec un ajout de 126 µl de solution de [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose.

Les résultats (répétabilité et incertitude finale) sont regroupés dans le **Tableau 12**.

*Tableau 12 : Influence des volumes prélevés sur la répétabilité et l'incertitude des résultats*

<b>PROTOCOLE 1</b>	<b>Sérum 1</b>	<b>Sérum 2</b>	<b>Sérum 3</b>	<b>Sérum 4</b>
<b>Concentration mesurée (mmol/l)</b>	<b>1,91</b>	<b>4,33</b>	<b>6,56</b>	<b>16,41</b>
<b>Volume prélevé (µl)</b>	<b>29</b>	<b>69,6</b>	<b>108,3</b>	<b>130,2</b>
<b>Répétabilité</b>	<b>1,08 %</b>	<b>0,76 %</b>	<b>0,65 %</b>	<b>3,51 %</b>
Incertitude élargie (mmol/l) [k=2]	0,042	0,066	0,086	1,150
Incertitude élargie (%) (k=2)	2,20 %	1,52 %	1,31 %	7 %
<b>PROTOCOLE 2</b>				
<b>Concentration mesurée (mmol/l)</b>	<b>1,93</b>	<b>4,36</b>	<b>6,70</b>	<b>16,11</b>
<b>Volume prélevé (µl)</b>	<b>87</b>	<b>208,8</b>	<b>324,8</b>	<b>390,6</b>
<b>Répétabilité</b>	<b>0,89 %</b>	<b>0,44 %</b>	<b>0,41 %</b>	<b>1,25 %</b>
Incertitude élargie (mmol/l) [k=2]	0,035	0,039	0,055	0,402
Incertitude élargie (%) (k=2)	1,79 %	0,89 %	0,83 %	2,49 %

Les résultats obtenus montrent que la répétabilité est diminuée de 30 à 60 % selon la concentration en augmentant le volume d'échantillon prélevé d'un facteur 3. Il en est de même pour les incertitudes. Nous avons donc décidé, pour l'élaboration du protocole, de prélever un volume minimum de l'ordre de 100 µl, quelle que soit la concentration du sérum.

### ***1-2-3-2 Déprotéinisation des échantillons***

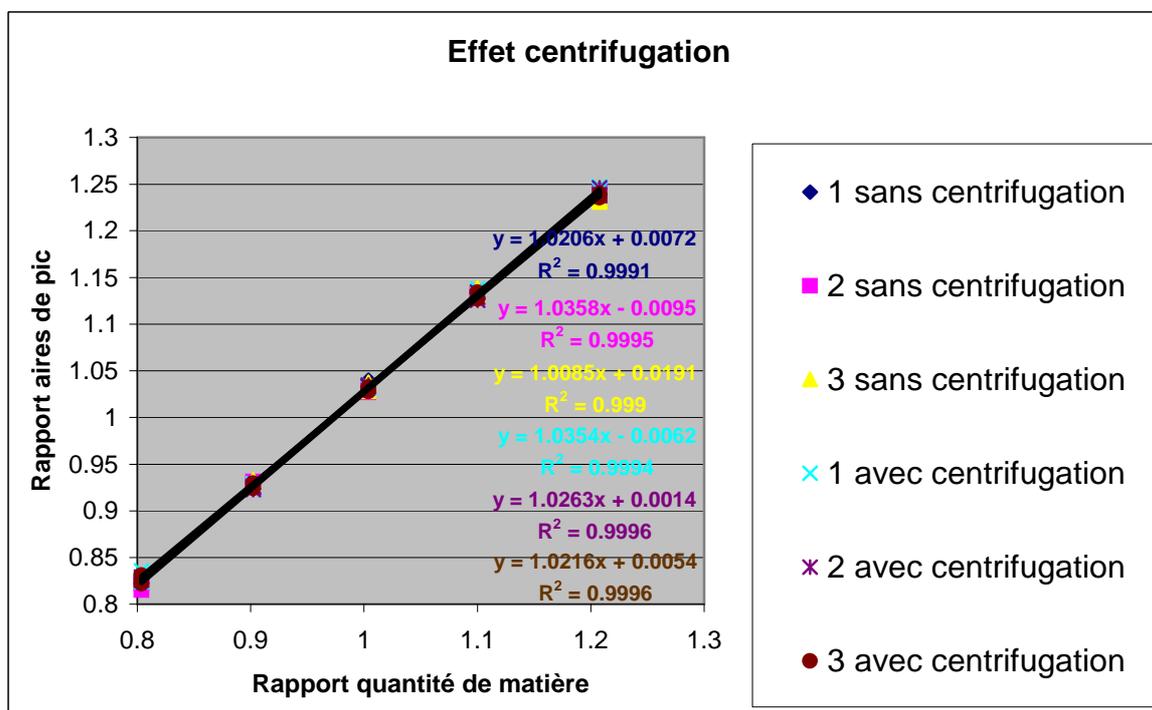
Comme toute étape de préparation, il est souhaitable de vérifier que celle-ci n'entraîne ni contamination, ni perte de l'analyte recherché. Afin de tester tout éventuel effet, trois gammes d'étalonnage, allant chacune de 4,43 à 6,65 mmol/l (0,8 à 1,2 en rapport de concentration D-glucose/[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose), sont préparées à partir de la même solution mère.

Chacune d'entre elles subit deux préparations différentes :

- Réaction de dérivation et analyse par CG/SM,

- Centrifugation et réaction de dérivation et analyse par CG/SM ;

Les différentes courbes d'étalonnage obtenues sont regroupées dans la **Figure 42**.



**Figure 42** : Droites d'étalonnage obtenues à partir de solution ayant subi ou non une étape de centrifugation. Dans les deux cas la mesure a été répétée trois fois.

Les droites d'étalonnage ne sont pas significativement différentes. Cependant, afin de vérifier que la centrifugation n'entraîne pas de dispersion des résultats, la répétabilité obtenue sur la réponse des différentes solutions étalon a été évaluée (**Tableau 13**).

**Tableau13** : Répétabilité des rapports d'aire de pic observée avec des préparations de solutions étalon avec ou sans centrifugation

	Répétabilité (%)	
	Sans centrifugation	Avec centrifugation
Etalon 0,8	<b>0,49</b>	<b>0,46</b>
Etalon 0,9	<b>0,36</b>	<b>0,24</b>
Etalon 1	<b>0,39</b>	<b>0,20</b>
Etalon 1,1	<b>0,27</b>	<b>0,31</b>
Etalon 1,2	<b>0,38</b>	<b>0,31</b>

La répétabilité sur les rapports d'aire de pic des différentes solutions varie de 0,2 à 0,5 % selon la concentration en glucose, mais il n'existe pas de différence significative entre les rapports

des solutions préparées avec et sans centrifugation. En l'absence d'effet lié à la « centrifugation », les solutions étalon sont alors préparées sans cette étape de centrifugation afin de permettre un gain de temps.

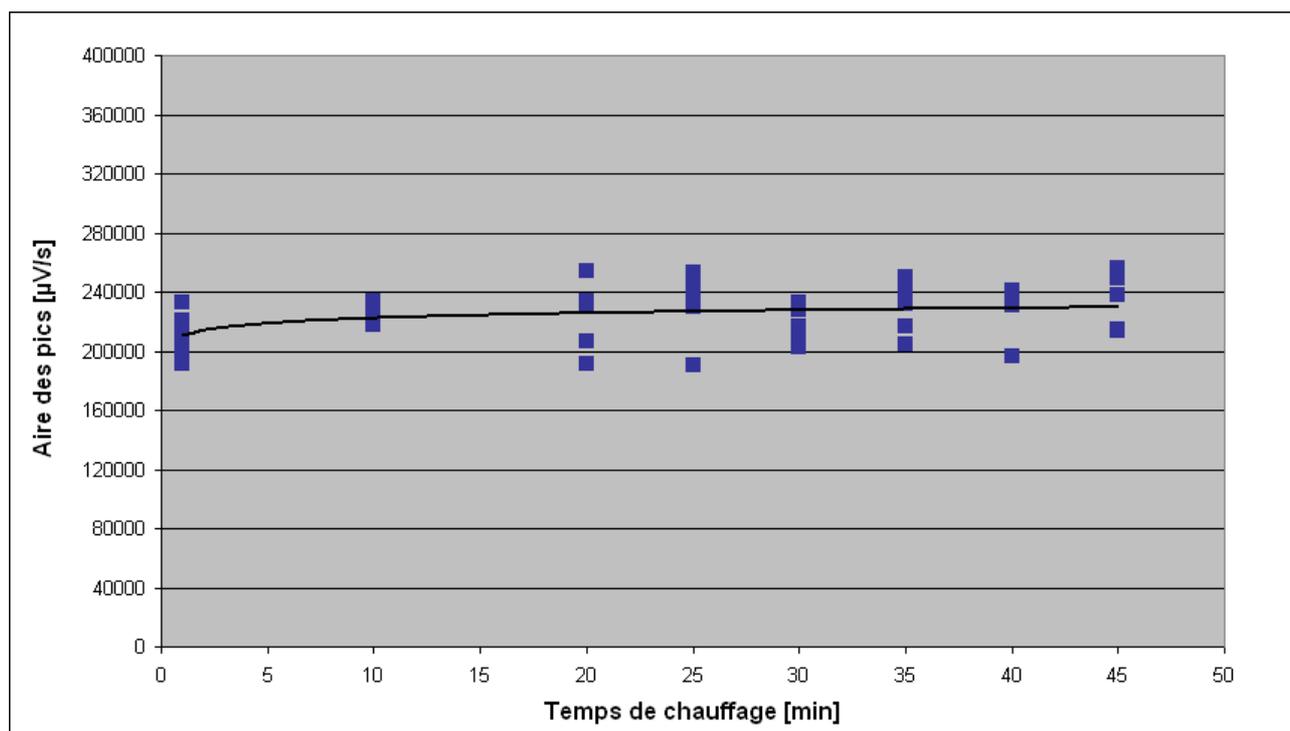
### *I-2-3-3 La dérivation des échantillons*

Après déprotéinisation, les échantillons sont dérivés à température élevée (90°C). Une première réaction d'aldonitrilation du D-glucose ou [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose avec du chlorhydrate d'hydroxylamine dans de la pyridine est effectuée, suivie une réaction d'acétylation avec de l'anhydride acétique.

Dans la littérature, les temps de chauffage varient entre 30 et 40 minutes pour le premier temps et sont fixés à 60 min pour le second temps de chauffage. Afin de finaliser le protocole, nous avons réalisé des études de cinétique de réaction pour ces deux étapes.

Pour cette étude de cinétique de formation du GPA, il a été nécessaire de disposer d'un détecteur dont le signal est suffisamment stable dans le temps (le signal du spectromètre de masse présente une robustesse minimale de 20%). Pour cette raison, cette étude a été réalisée avec un détecteur à ionisation de flamme.

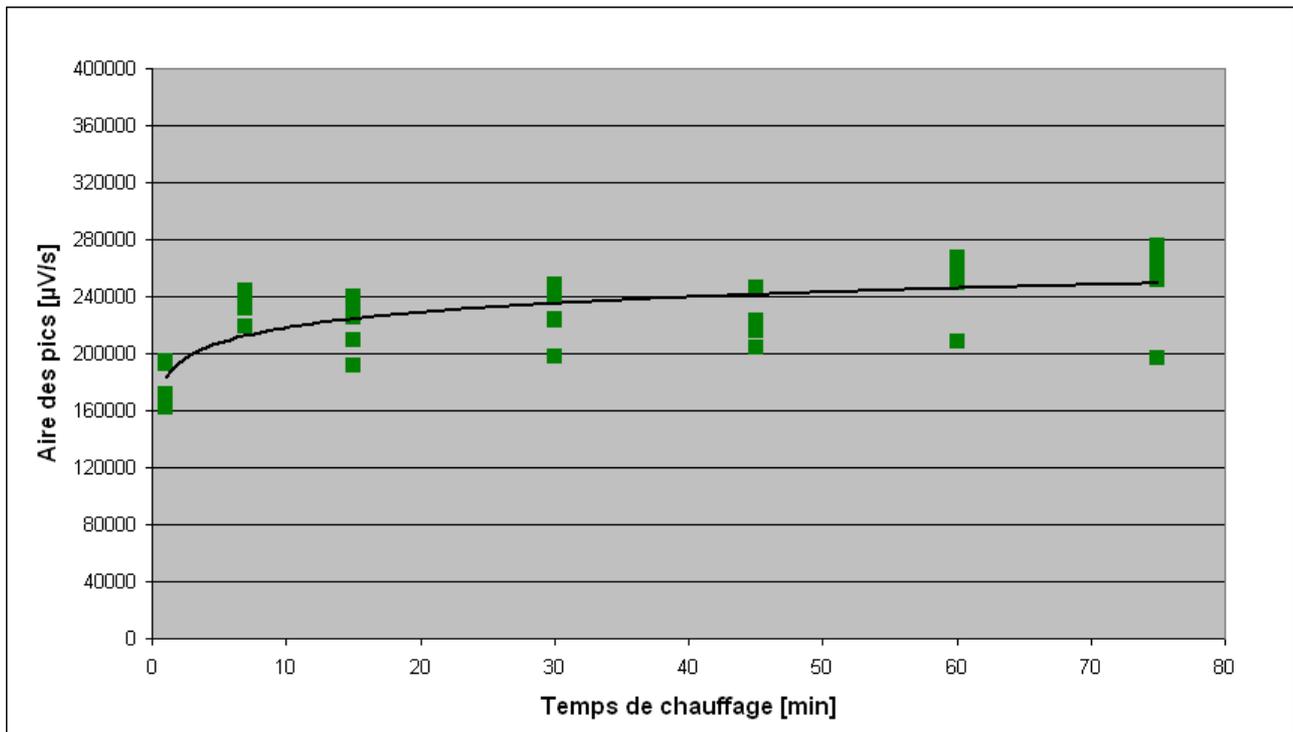
La première réaction étudiée est la réaction d'aldonitrilation. Pour cela, et à partir de solutions de D-glucose à 5mg/l, huit échantillons ont été préparés avec un premier temps de réaction (chauffage) différent: 1, 10, 20, 25, 30, 35, 40, et 45 min. Le deuxième temps de chauffage a été fixé à la valeur maximale décrite dans la littérature, soit 60 min, afin de s'affranchir d'un éventuel effet de celui-ci. Chaque point de chauffage a été répété cinq fois. Puis, pour chaque temps de chauffage, le GPA a été analysé en mesurant le signal correspondant à l'aire du pic chromatographique (*Figure 43*).



**Figure 43** : Cinétique de la première réaction d'aldonitrilation (1<sup>er</sup> temps de chauffage).

L'étude de la cinétique montre que la réaction d'aldonitrilation est rapide ; si le signal est rapporté au niveau du plateau observé au delà de 30 minutes, on voit que 90% du glucose est aldonitrilé dès les premières minutes. La répétabilité (réaction et analyse) est de l'ordre de 10 %. Il apparaît que la totalité du glucose est dérivée dès 10 minutes. Cette étude a été réalisée avec des solutions étalons pures. L'influence du D-mannose et du D-galactose sur cette cinétique n'a pas été étudiée, en raison de leur faible concentration par rapport à celle du D-glucose. En présence d'une matrice complexe, d'autres composés sont susceptibles de ralentir la formation du composé aldonitrilé. Ainsi, en accord avec la bibliographie, nous avons décidé de fixer ce temps de réaction à 30 minutes.

Pour le deuxième temps de réaction (acétylation), sept échantillons ont été préparés avec un deuxième temps de réaction différent: 1, 7, 15, 30, 45, 60, et 75 minutes. Le premier temps de chauffage a été fixé à 30 min, en fonction des résultats de l'étude précédente. Pour chaque temps de chauffage, un échantillon est préparé cinq fois. Puis, la solution de GPA est analysée, le signal retenu étant l'aire du pic chromatographique (**Figure 44**).

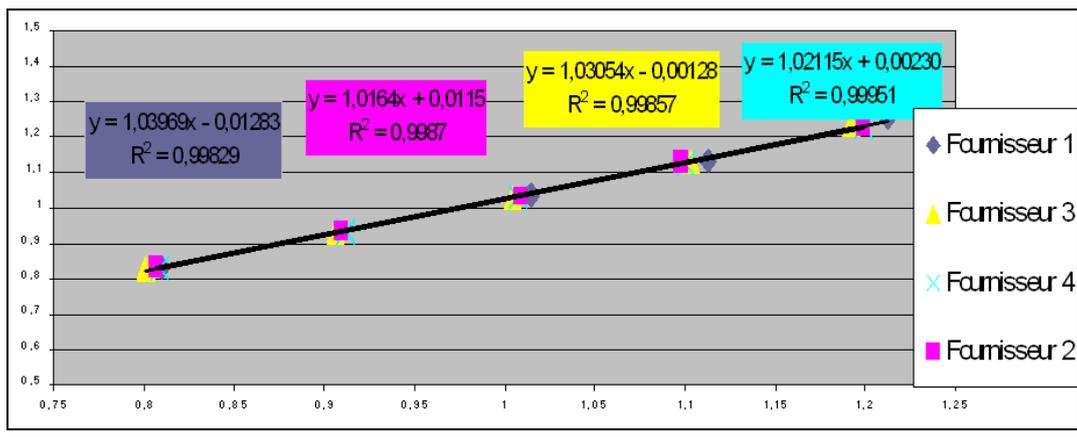


**Figure 44** : Cinétique de la deuxième réaction d'aldonitrilation (2ème temps de chauffage).

L'observation de la courbe montre que la réaction d'acétylation est plus lente. Seul 70 à 80% du glucose aldonitrilé est acétylé à 30 min. Après 1 heure, le rendement d'acétylation est suffisant pour que la réaction soit considérée comme quasi totale.

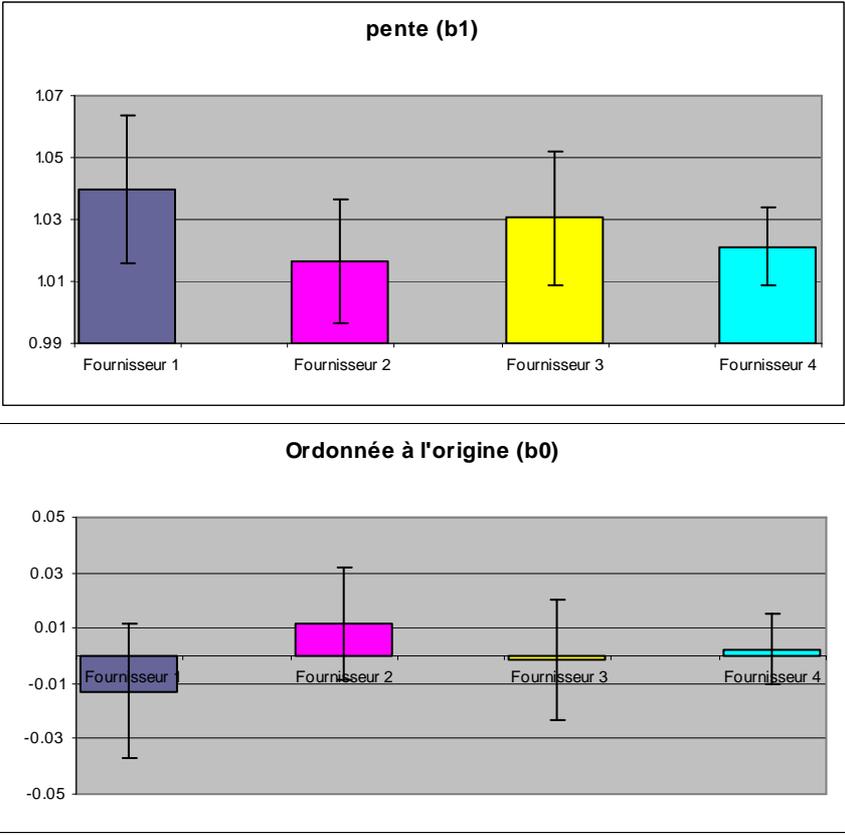
#### ***I-2-3-4 Effet fournisseur pour le D-glucose***

Lors des premières évaluations d'incertitude, il est apparu que la pureté du glucose utilisé pour la préparation des solutions étalon, représentait une composante importante (20 à 25 %) de la valeur d'incertitude. Afin de vérifier les puretés annoncées par les fournisseurs, nous avons préparé quatre droites d'étalonnage à partir de glucose provenant de quatre fournisseurs différents, et dont les puretés annoncées varient de 95 à 99 %. Les quatre gammes obtenues ont été comparées entre elles (**Figure 45**).



**Figure 45 :** Comparaison de quatre gammes d'étalonnage préparées à partir de glucose obtenu auprès de fournisseurs différents

Comme le montre la **Figure 45**, les droites d'étalonnage préparées à partir du glucose obtenu auprès des différents fournisseurs, sont confondues. Les pentes et ordonnées à l'origine des droites, avec leur incertitudes associées obtenues par la méthode des moindres carrés ont été également comparées (**Figures 46**).



**Figure 46:** Caractéristiques des droites d'étalonnage (pente, ordonnée à l'origine et incertitude calculées à partir de la méthode des moindres carrés) préparées à partir de glucose obtenu auprès de fournisseurs différents.

Les pentes et les ordonnées à l'origine ne sont pas statistiquement différentes. Les puretés annoncées par les fournisseurs sur les lots testés sont cohérentes entre elles. Nous avons donc choisi de travailler avec le lot de glucose dont la pureté annoncée était la plus élevée (99%).

### **I - 3 - Validation de la méthode**

La validation de méthode est une exigence de la norme ISO 17025 (Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) : « La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » (§5.4.5.1 de la norme ISO/CEI 17025).

C'est ainsi que les différentes caractéristiques de la méthode, comme la spécificité, la linéarité, les capacités de détection et de quantification, la reproductibilité et les incertitudes, ont été évaluées. La justesse a également été estimée avec des matériaux de référence certifiés (MRC).

#### **I-3-1 Spécificité et sélectivité**

Selon la définition de la norme [80], la sélectivité est « l'aptitude d'un élément de la méthode analytique (appareil de mesure, milieu de culture, etc.) à discerner un analyte donné dans un mélange complexe ».

La spécificité désigne « la propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte, avec la garantie que le résultat de la méthode d'analyse ne provient que de l'analyte. Très souvent la spécificité se fonde sur une absence d'interférences » [80].

Dans notre étude, la sélectivité de la méthode a été évaluée lors du développement de la méthode. Celle-ci est assurée d'une part par la séparation chromatographique des molécules dérivées du glucose, mannose et galactose, d'autre part, par la détection, qui est basée sur le suivi des ions issus de la fragmentation de la molécule, spécifiques des molécules d'intérêt.

Conclusion : la méthode développée, dans les conditions de notre étude, permet la quantification sélective des composés d'intérêt. La sélectivité a été établie avec des solutions étalon mais elle sera également vérifiée avec des échantillons réels lors de l'évaluation de la justesse

### **I-3-2 Linéarité**

L'étalonnage en CG/SM s'effectue en injectant plusieurs solutions de glucose à une concentration variable et son homologue marqué à une concentration fixe. L'utilisation de la dilution isotopique associée à la CG/SM implique l'exploitation des rapports entre les intensités observées pour la molécule étudiée (I) et son homologue marqué (I\*) en fonction des rapports entre les quantités de molécule (Q) et de molécule marquée (Q\*). Cette exploitation repose sur le fait que la teneur en molécule marquée est identique quelle que soit la solution étalon considérée.

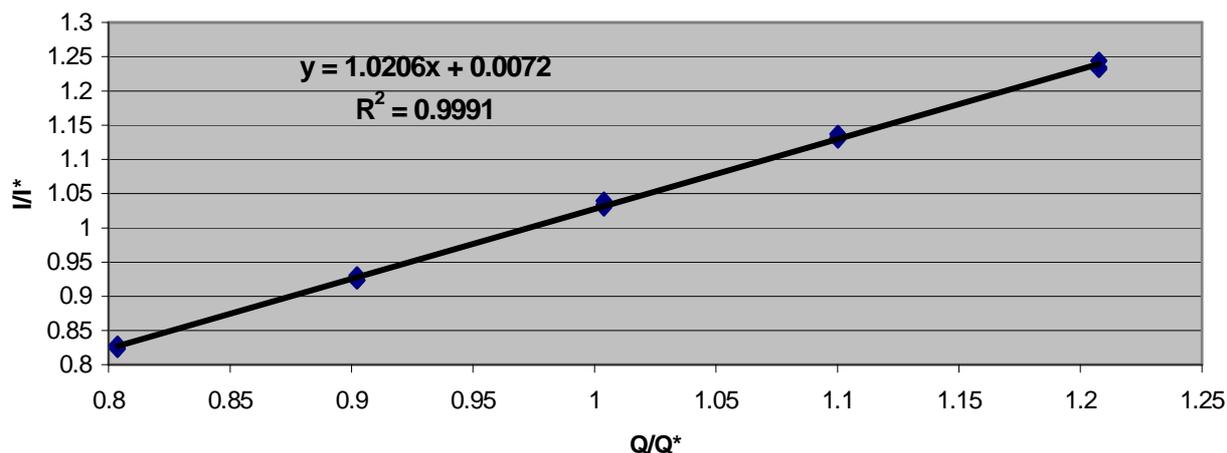
A partir des résultats obtenus, un modèle d'étalonnage permettant de décrire les points observés est recherché. En général, en chimie analytique, le modèle d'étalonnage recherché est linéaire et de type  $y = b_1x + b_0$ , dans notre cas,  $I/I^* = f(Q/Q^*)$ .

La linéarité est définie comme la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une réponse ou des résultats proportionnels aux valeurs de la grandeur mesurée [80]. Le modèle postulé, il faut vérifier son adéquation lors de l'expérimentation. Le coefficient de corrélation (noté  $r^2$ ), caractéristique d'une fonction affine, n'est pas un outil suffisant pour confirmer l'adéquation du modèle supposé avec les points expérimentaux. Il est nécessaire d'utiliser d'autres indicateurs ou tests statistiques.

#### ***I-3-2-1 Gamme d'étalonnage et résultats***

Le modèle d'étalonnage a été étudié sur une gamme de cinq rapports de concentrations  $I/I^*$  compris entre 0,8 et 1,2, proche du rapport équimolaire de 1, afin de réduire l'intervalle et diminuer les part d'incertitude liée au modèle. Quelle que soit la solution étalon considérée, la concentration de la molécule marquée est constante et fixée à 1 mg/mL.

Chaque solution d'étalonnage est analysée trois fois par CG/SM et le modèle d'étalonnage est tracé (*Figure 47*).



**Figure 47** : Modèle d'étalonnage pour la détermination du glucose :  $I/I^* = f(Q : Q^*)$  ;  $I$  = aire du pic de l'ion 314 et  $I^*$  = aire du pic de l'ion 319.

Visuellement, la droite passe au plus près des points expérimentaux. Les valeurs des coefficients de corrélation sont d'ailleurs très proches de 1. Afin de confirmer cette observation, le test d'adéquation du modèle d'étalonnage est effectué.

### ***I-3-2-2 Test d'adéquation du modèle***

Le modèle recherché est un modèle linéaire de type :  $y = b_1x + b_0$ . Le test d'adéquation est alors appliqué à la droite d'étalonnage obtenue. Les estimateurs de la pente ( $b_1$ ) et de la constante ( $b_0$ ) sont obtenus par la méthode des moindres carrés. Le test d'adéquation au modèle est obtenu par l'analyse de la variance. Il permet de s'assurer que le modèle explique les valeurs observées mais également que la réponse est proportionnelle à la quantité introduite sur toute la gamme considérée. Le test consiste en fait à vérifier si la part de la variance due l'erreur de modèle n'est pas supérieure à la variance de l'erreur expérimentale.

Le **Tableau 14** représente un tableau Excel développé au LNE qui permet l'exploitation des données obtenues pour les cinq niveaux de la gamme d'étalonnage, selon la procédure décrite en Annexe 2.

**Tableau 14 : Exploitation de la gamme d'étalonnage**

Solution étalonnage	Q/Q*	I/I*	moyenne $\bar{y}_i$	écart-type $Sy_i$	modèle $\hat{y}_i$	non linéarité $\bar{y}_i - \hat{y}_i$	(répéta) $y_{ij} - \bar{y}_i$
1	0.8036	0.8293	0.8	0.0032	0.8274	-0.0006	0.0026
	0.8036	0.8277			0.8274		0.0010
	0.8036	0.8232			0.8274		-0.0035
2	0.9023	0.9305	0.9	0.0040	0.9280	-0.0020	0.0046
	0.9023	0.9238			0.9280		-0.0021
	0.9023	0.9235			0.9280		-0.0025
3	1.0038	1.0337	1.0	0.0048	1.0317	0.0028	-0.0008
	1.0038	1.0397			1.0317		0.0052
	1.0038	1.0301			1.0317		-0.0044
4	1.1001	1.1369	1.1	0.0039	1.1299	0.0028	0.0043
	1.1001	1.1317			1.1299		-0.0009
	1.1001	1.1293			1.1299		-0.0033
5	1.2076	1.2441	1.2	0.0065	1.2396	-0.0029	0.0074
	1.2076	1.2341			1.2396		-0.0026
	1.2076	1.2319			1.2396		-0.0048
Moyenne générale	1.0	1.031	1.031		1.0313	1.1102E-16	-7.4015E-18
somme des carrés des écarts	3.03536E-01	3.16464E-01	1.054E-01		3.16164E-01	1.4389E-04	2.130E-04
nombre de concentrations	5	nombre de mesures par concentration			3		

L'analyse de la variance (ANOVA) est ensuite effectuée. Elle permet de tester l'influence d'une ou de plusieurs variables qualitatives sur une variable quantitative, à un risque donné. Le **Tableau 15** présente les résultats obtenus.

**Tableau 15 : Analyse de la variance pour le modèle d'étalonnage**

Source de variation	carrés des écarts	degré de liberté	carré moyen	$F_{obs}$	$F_{(5\%)}$	$F_{(1\%)}$	
expliqués	3.16164E-01	1	3.162E-01	14841	4.96	10.04	$F_{expliqué}$
non linéarité	1.43894E-04	3	4.796E-05	2	3.71	6.55	$F_{nlin}$
residuels	2.13037E-04	10	2.130E-05				
totaux	3.16521E-01	14					

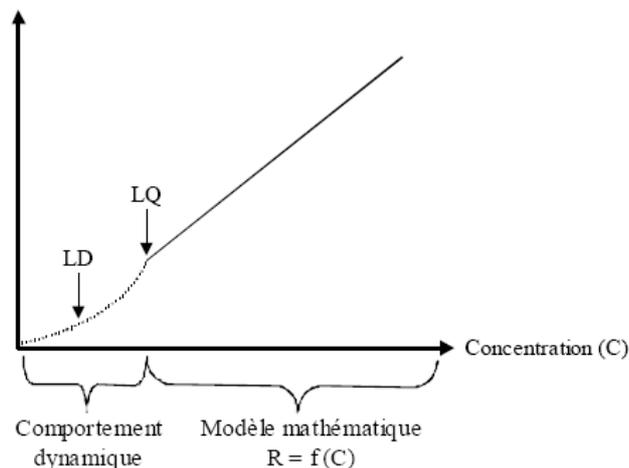
Les règles de décision sont effectuées en deux étapes qui consistent à vérifier:

- si la régression est validée, c'est à dire si le modèle explique les données. Pour cela, il faut que  $F_{obs} \text{ Expliqués} > F_{(95\%)}$ ,
- si le modèle est linéaire. Pour cela, il faut que  $F_{obs} \text{ Non-linéarité} < F_{(95\%)}$ .

Conclusion : dans le cas étudié ici, le modèle postulé explique les données et la linéarité est vérifiée.

### I-3-3 Détermination des limites de détection $L_D$ et de quantification $L_Q$

La représentation graphique des réponses en fonction des concentrations est souvent décrite comme ayant deux zones (**Figure 48**). Dans la première zone, la gamme est considérée comme linéaire et sa limite basse de ce domaine est la limite de quantification ( $L_Q$ ). La  $L_Q$  correspond à la plus petite quantité d'un composé à analyser dans un échantillon pouvant être détectée et quantifiée avec un risque connu [81]. En revanche, la gamme est considérée comme dynamique au sein de la deuxième zone, c'est à dire que la réponse n'est plus proportionnelle à la concentration. C'est dans cette zone que se trouve la limite de détection ( $L_D$ ). La  $L_D$  est la plus petite quantité d'un analyte à doser dans un échantillon pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc mais non nécessairement quantifiée avec un risque connu [69].



**Figure 48 :** Représentation schématique des capacités de détection et de quantification.

Il est nécessaire d'évaluer la valeur de ces deux limites, afin de définir comment notre gamme de concentration se situe par rapport à elles.

#### ***I-3-3-1 Limite de détection***

Trois approches sont proposées dans les documents normatifs [82] : l'approche par l'étude de la linéarité, l'approche par l'étude d'un blanc ou d'un point de faible concentration et l'approche par la vérification d'une limite de quantification choisie.

La stratégie que nous avons mise en œuvre a consisté à déterminer la concentration de glucose pour laquelle le rapport signal/bruit est de l'ordre de 3 (**Figure 49**). Auparavant, une

solution de concentration faible en glucose est analysée afin de déterminer un rapport signal/bruit qui permette d'estimer une concentration proche de la  $L_D$ . Celle-ci est vérifiée expérimentalement en injectant cette solution, puis en la diluant si nécessaire.

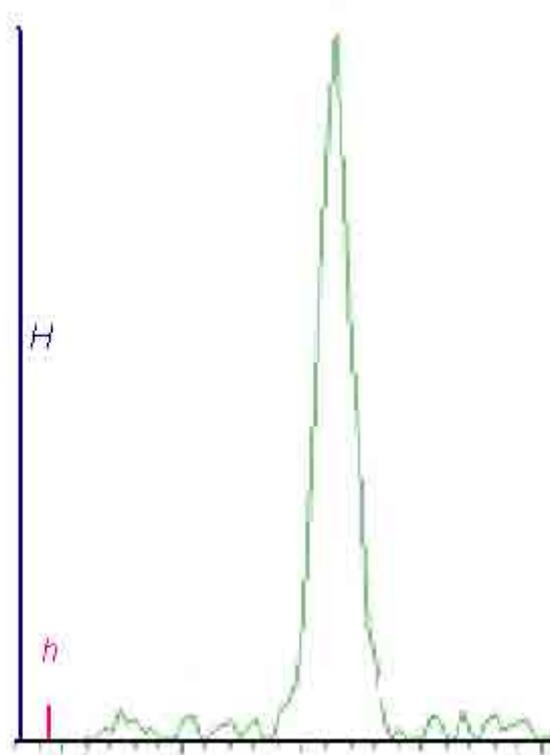


Figure 49 : Détermination du rapport signal( $H$ )/bruit( $h$ )

Nous avons injecté une solution de concentration faible ( $0,05\mu\text{g/ml}$ ). A partir du rapport signal sur bruit obtenu, nous avons considéré la concentration correspondant à trois fois ce rapport comme étant la limite de détection. Ici, elle a été estimée à  $0,005\mu\text{g/ml}$  (Figure 50).

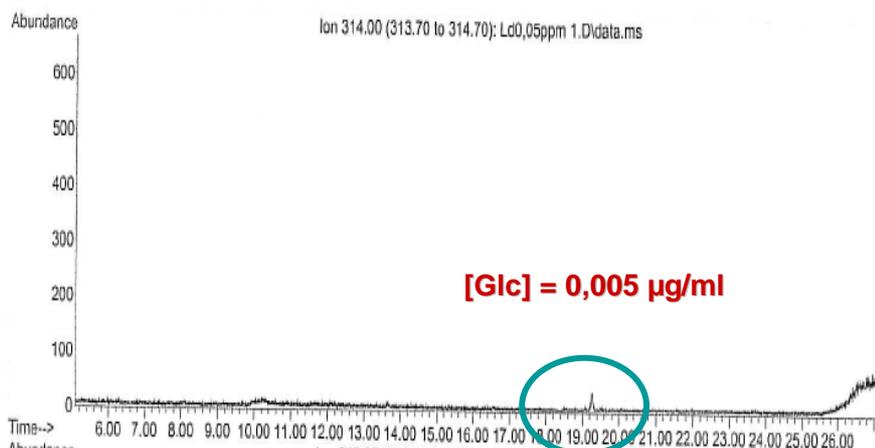
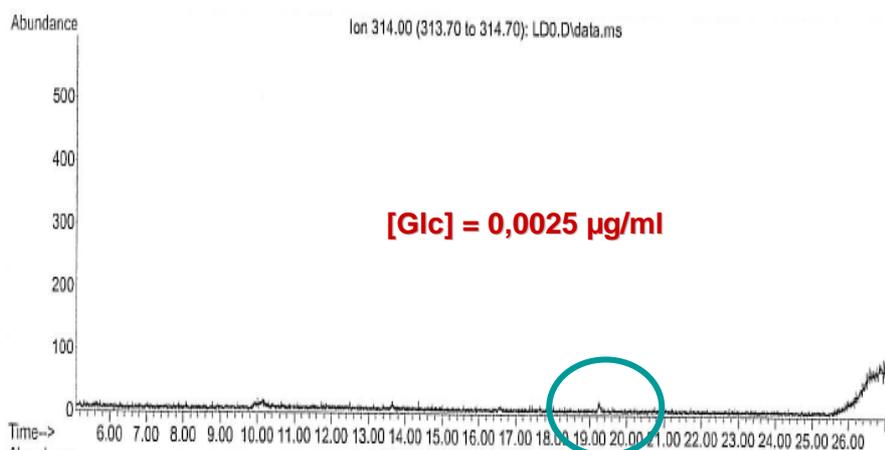


Figure 50 : Chromatogramme en mode SIM d'une solution de glucose à  $0,005\mu\text{g/ml}$ .

Comme le rapport signal sur bruit est supérieur à trois, une nouvelle solution, de concentration 0,025 µg/ml, est analysée (**Figure 51**).



**Figure 51** : Chromatogramme en mode SIM d'une solution de glucose à 0,025 µg/ml avec un split de 1/10, soit une concentration réelle de glucose de 0,0025µg/ml.

Le rapport signal sur bruit étant voisin de trois et le rapport de split de 1/10, la valeur acceptée comme cette valeur est acceptée comme la limite de détection ( $L_D = 0,0025 \mu\text{g/ml}$ ). La limite de détection obtenue est environ 2,5 fois inférieure à celle décrite dans la littérature pour une méthode de référence ( $L_D = 0,006 \mu\text{g/ml}$ ) [69]

### ***I-3-3-2 Limite de quantification***

La limite de détection  $L_D$  ayant été déterminée précédemment, nous avons calculé la limite de quantification  $L_Q$  par la relation mathématique  $L_Q = 3 \times L_D$  [87]:

La  $L_Q$  estimée est donc de l'ordre de **0,0075 µg/ml**.

Les concentrations d'échantillons utilisées dans la méthode, sont comprises entre 0,2 et 0,3 µg/ml, Ces valeurs sont au minimum 25 fois supérieures à la limite de quantification et 80 fois supérieures à la limite de détection. Ceci permet d'éviter d'éventuels problèmes de sensibilité liés à l'encrassement du détecteur, par exemple.

### I-3-4 Etude de la fidélité intermédiaire

Selon le VIM (Vocabulaire International de la Métrologie) [83], la répétabilité est la fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité alors que la reproductibilité est une fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité. Ces deux types de fidélité de mesure se définissent comme une condition de mesurage parmi plusieurs conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires. Il est évident qu'au sein d'un même laboratoire, il est difficile de définir la reproductibilité d'une méthode. Aussi, nous avons estimé la fidélité intermédiaire de la mesure de glucose qui est la fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire [83]. Nous avons décidé de faire varier l'effet opérateur. Cette caractéristique a été évaluée à partir d'un matériau de référence certifié, le NIST SRM 965a (glucose in frozen serum) comportant quatre niveaux de concentrations :

- Niveau 1 :  $0,3456 \pm 0,0036$  g/l (  $1,92 \pm 0,02$  mmol/l )
- Niveau 2 :  $0,7850 \pm 0,0086$  g/l (  $4,36 \pm 0,05$  mmol/l )
- Niveau 3 :  $1,221 \pm 0,013$  g/l (  $6,78 \pm 0,07$  mmol/l )
- Niveau 4 :  $2,926 \pm 0,035$  g/l (  $16,26 \pm 0,20$  mmol/l )

Trois opérateurs ont effectué de manière indépendante les analyses des échantillons pour trois niveaux du SRM. Les résultats sont regroupés dans le *Tableau 16*.

*Tableau16 : Fidélité intermédiaire évaluée sur le SRM 965a*

Concentration (g/l)	SRM 965a		
	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>Opérateur 1</b>	0.3464	0.7831	1.2150
<b>Opérateur 2</b>	0.3499	0.7960	1.2220
<b>Opérateur 3</b>	0.3490	0.7913	1.2290
Moyenne	<b>0.3484</b>	<b>0.7901</b>	<b>1.2220</b>
Ecart-type	<b>0.0018</b>	<b>0.0065</b>	<b>0.0070</b>
Fidélité intermédiaire (%)	<b>0.52</b>	<b>0.83</b>	<b>0.57</b>

La fidélité est inférieure à 1% ; cette valeur est satisfaisante au vu des incertitudes souhaitées (inférieures à 2%).

### **I-3-5 Etude de justesse**

Selon le VIM [83], la justesse correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

Elle a été évaluée avec le SRM 965a « glucose in frozen serum ».

L'écart normalisé est une donnée statistique qui permet d'attester ou non si deux valeurs sont significativement différentes l'une de l'autre. Il est calculé à partir de ces valeurs et de leur dispersion (incertitude). Ici, le calcul s'appuie sur l'écart existant entre les valeurs fournies par la méthode et le matériau certifié, tout en prenant en compte les incertitudes associées soit à la valeur de référence, soit estimées. Sa formule est la suivante :

$$E_N = \frac{X_{LNE} - X_{ref}}{\sqrt{u_{LNE}^2 + u_{ref}^2}}$$

avec :

$X_{LNE}$  = valeur moyenne mesurée

$X_{ref}$  = valeur de référence

$u_{LNE}^2$  = incertitude type associée à la moyenne des valeurs mesurées

$u_{ref}^2$  = incertitude type associée à la valeur de référence

Il n'existe pas d'écart significatif entre la valeur mesurée et la valeur de référence si  $|E_N| < 2$ . Si les incertitudes utilisées dans la formule sont les incertitudes élargies, alors il n'existe pas d'écart significatif entre la valeur mesurée et la valeur de référence si  $|E_N| < 1$

Les valeurs mesurées pour chaque niveau du SRM, ainsi que la valeur de l'écart normalisé sont regroupées dans le **Tableau 17**

**Tableau17** : Tableau récapitulatif des valeurs certifiées et mesurées avec leurs incertitudes associées, et des écarts normalisés pour chaque niveau de concentration du NIST SRM 965a.

SRM	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
<b>Valeur certifiée (g/L)</b>	<b>0,3456</b>	<b>0,7850</b>	<b>1,221</b>	<b>2,926</b>
<b>Incertitude (k=2) (g/l)</b>	<b>0,0036</b>	<b>0,0086</b>	<b>0,013</b>	<b>0,035</b>
<b>Pourcentage d'incertitude</b>	<b>1,04 %</b>	<b>1,10 %</b>	<b>1,06 %</b>	<b>1,20 %</b>
Valeur certifiée minimale (g/l)	0,3420	0,7764	1,208	2,891
Valeur certifiée maximale (g/l)	0,3492	0,7936	1,234	2,961
<b>Valeur mesurée selon méthode LNE (g/l)</b>	<b>0,3464</b>	<b>0,7831</b>	<b>1,215</b>	<b>2,900</b>
<b>Incertitude (k=2) (g/l)</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0062</b>	<b>0,010</b>	<b>0,027</b>
<b>Pourcentage d'incertitude</b>	<b>0,92 %</b>	<b>0,79 %</b>	<b>0,82 %</b>	<b>0,93 %</b>
<b>E<sub>N</sub> ( écart normalisé )</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>

Quel que soit le niveau de concentration du MRC, la valeur absolue des écarts normalisés sont tous inférieurs à 1 (calcul de E<sub>N</sub> avec les incertitudes élargies). Il n'existe pas d'écart de justesse significatif entre les valeurs de notre méthode et celles du SRM.

### **I-3-6 Robustesse**

La robustesse est définie comme l'aptitude d'une méthode d'analyse à produire de faibles variations du résultat lorsqu'elle est soumise à des modifications contrôlées des conditions d'application (exemples : température ambiante, lumière, pression atmosphérique, humidité, réactifs, appareillage) [82].

Dans la pratique, il s'agit de faire varier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de la mesure. Nous avons choisi de faire varier le paramètre opérateur et d'évaluer si les résultats individuels étaient significativement différents d'une valeur de référence. Pour cela, trois opérateurs ont analysé indépendamment les quatre niveaux du SRM 965a (*Tableau 18*).

**Tableau 18 :** Ecart normalisé pour chaque opérateur sur la détermination du glucose dans le NIST SRM 965a

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
<b>Valeur cible certifiée (g/L)</b>	0,3456	0,7850	1,221	2,926
<b>Incertitude (k=2) (g/L)</b>	0,0036	0,0086	0,013	0,035

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	
Opérateur 1	<b>Concentration de glucose (g/L)</b>	0,3464	0,7831	1,215	2,900
	<b>incertitude k=2 (g/L)</b>	0,0032	0,0062	0,010	0,027
	<b>E<sub>N</sub> ( écart normalisé )</b>	0,2	0,2	0,4	0,6

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	
Opérateur 2	<b>Concentration de glucose (g/L)</b>	0,3499	0,7960	1,222	2,972
	<b>incertitude k=2 (g/L)</b>	0,0031	0,0059	0,009	0,027
	<b>E<sub>N</sub> ( écart normalisé )</b>	0,9	1,1	0,1	1,0

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	
Opérateur 3	<b>Concentration de glucose (g/L)</b>	0,3490	0,7913	1,229
	<b>incertitude k=2 (g/L)</b>	0,0021	0,0031	0,005
	<b>E<sub>N</sub> ( écart normalisé )</b>	0,8	0,7	0,5

Il a été vérifié pour chaque opérateur qu'il n'existe pas de différence significative entre la valeur mesurée et la valeur de référence car dans tous les cas,  $|E_N| < 2$ . La méthode est donc considérée comme robuste.

### **I-3-7 Evaluation des incertitudes**

L'incertitude est un paramètre dont la valeur est non négative qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées [83].

C'est une étape délicate car l'incertitude de mesure comprend de nombreuses composantes implicites ou explicites et doit être représentative de l'ensemble des valeurs que peut prendre le mesurande.

L'incertitude ici a été évaluée selon la méthode préconisée par le GUM [84], et qui est basée sur quatre étapes :

### ***I-3-7-1 Modélisation du processus de mesure***

On écrit sous forme mathématique la façon dont on combine toutes les informations pour calculer le résultat :

Les coefficients a et b de la droite d'étalonnage sont déterminés ainsi que leurs incertitudes par la méthode des moindres carrés.

$$C_{M/\text{éch}} = \frac{[f(m_i) \times \text{Réf}^*] \times m_{M^*/\text{éch}}}{m_{\text{éch}}} \times (a \times R_{\text{éch}} + b) + F$$

avec :

$C_{M/\text{éch}}$  : concentration de la molécule M dans l'échantillon,

$f(m_i)$  : fonction tenant compte des différentes masses intervenant dans les étapes de préparation de la solution d'ajout de la molécule M\*,

Réf\* : pureté du composé marqué,

$m_{M^*/\text{éch}}$  : masse de solution de M\* ajoutée à l'échantillon,

$m_{\text{éch}}$  : masse prélevée d'échantillon,

$R_{\text{éch}}$  : rapport de l'intensité du signal correspondant au GPA sur l'intensité du signal correspondant au GPA\* dans l'échantillon,

F : fidélité intermédiaire

### ***I-3-7-2 Evaluation des incertitudes-types sur les grandeurs d'entrée du modèle***

A chaque paramètre du modèle mathématique est associée son incertitude-type définie comme de type A pour des valeurs issues de l'expérience ou de type B pour des valeurs pré-définies ; à chaque incertitude-type est associée une loi de distribution qui représente la répartition des valeurs selon la probabilité de présence (*Tableau 19*).

**Tableau 19** : Récapitulatif des expressions mathématiques des incertitudes en fonction de la source.

Source d'incertitude	Type d'éval.	Demi-étendue	Loi	Incertitude type
Pureté de l'étalon Réf (cf. certificat)	B	a	$\square$ (uniforme)	$a/\sqrt{3}$ kg/kg ou %
Pesées $m_i$	B	/	K=1	$u(m_i)$
Rapport des aires $R_j$	A	/	/	$s_{R_j} / \sqrt{m}$
Rapport des quantités de matière $\hat{R}_Q$	A	/	/	$u(\hat{R}_Q)$
Fidélité de la méthode : écart-type des p déterminations	A	/	/	$s_R / \sqrt{p}$

### I-3-7-3 Propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées

La propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées permet d'estimer l'incertitude sur le résultat de mesure selon la loi suivante :

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \left( \frac{\partial f}{\partial x_j} \right) u(x_i, x_j)}$$

Le calcul de l'incertitude-type est réalisée par le logiciel Wincert (version 3.11.2002, Implex, France). Il est nécessaire de fournir à ce logiciel la formule mathématique, les incertitudes-types ainsi que leur distribution à chaque valeur d'entrée.

### I-3-7-4 Expression de l'incertitude élargie :

L'incertitude élargie est déterminée selon la formule

$$U(y) = k u_c(y)$$

avec :

$U(y)$  : incertitude élargie

$u_c(y)$  : incertitude composée

$k$  : facteur d'élargissement

$k$  est déterminé à partir de la table de Student, pour un niveau de confiance de 95 % et pour un

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^2}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}}$$

nombre de degrés de liberté  $v_{\text{eff}}$  calculé selon la formule suivante :

$u_i$  : incertitude-type associée à la  $i^{\text{ème}}$  variable

$v_i$  : nombre de degré de libertés associé à la  $i^{\text{ème}}$  variable

La quantification a été réalisée de la manière suivante dans notre étude :

Après vérification que les ions du glucose ne sont pas présents dans la fragmentation du glucose marqué et vice-versa, la quantification est réalisée en méthode SIM par dilution isotopique. Une droite d'étalonnage est déterminée en traçant :

$$R_Q = f(R_{\text{aires}})$$

avec :

$$R_Q = \frac{\text{Masse de glucose}}{\text{Masse de glucose marqué}}$$

et

$$R_{\text{aires}} = \frac{\text{Aire du pic de glucose}}{\text{Aire du pic de glucose marqué}}$$

Puis, à partir des aires des pics des solutions des échantillons et de la droite d'étalonnage définie au dessus,  $R_Q$ , grandeur sans dimension, est déterminé et la concentration de l'échantillon est définie par :

$$C_{éch} = \frac{R_Q \times m_{spike} \times C_{spike}}{m_{éch}}$$

avec :

$C_{éch}$  : Concentration de glucose de l'échantillon (g / g)

$C_{spike}$  : Concentration de la solution de glucose marqué (g / g)

$m_{spike}$  : Masse de solution de glucose marqué ajouté à l'échantillon (g)

$m_{éch}$  : Masse d'échantillon (g)

Dans cette expression, la concentration de glucose est exprimée en gramme par gramme de sérum. Pour exprimer les résultats en mole par litre de sérum, les résultats en g /g doivent être multipliés par la masse volumique du sérum et divisés par la masse molaire du glucose ( $M = 180,16$  g / mol). La masse volumique du sérum est déterminée au préalable.

$$C_{éch} = \frac{R_Q \times m_{spike} \times C_{spike} \times \rho_{sérum}}{m_{éch} \times M_{Gluc}}$$

avec :

$C_{éch}$  : Concentration en glucose de l'échantillon (mol / dm<sup>3</sup>)

$C_{spike}$  : Concentration de la solution de glucose marqué (g / g)

$m_{spike}$  : Masse de solution de glucose marqué ajouté à l'échantillon (g)

$m_{éch}$  : Masse d'échantillon (g)

$\rho_{sérum}$  : Masse volumique du sérum (g / dm<sup>3</sup>)

$M_{Gluc}$  : Masse molaire du glucose (180,16 g / mol)

L'incertitude est déterminée à partir de la loi de propagation sur les paramètres intervenant dans le calcul de la concentration et de la fidélité.

Pour prendre en compte l'incertitude sur les solutions étalon (qui n'entre pas dans le calcul de l'incertitude sur  $R_Q$  par la droite d'étalonnage), le rapport est défini par :

$$R_Q = R_{1Q} \times R_{2Q}$$

avec :

$R_{1Q}$  : Rapport issu de la droite de calibration,

$R_{2Q}$  : Valant 0 mais dont l'incertitude est celle des solutions étalon.

L'incertitude sur  $R_{1Q}$  est obtenu à partir de :

$$u(\hat{Y})_{\text{modèle}} = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

avec l'écart-type sur les résidus :

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Les incertitudes calculées tout au long de ces travaux ont été comprises entre 0,3 et 1%. Ces valeurs sont satisfaisantes par rapport aux données bibliographiques (de 0,5 à 2 %).

### **Conclusion:**

Lors du développement de cette méthode de référence, nous souhaitons disposer d'une méthode juste et dont les incertitudes sont inférieures à 1 %.

Au vu des différents paramètres évalués au cours de cette étude (modèle d'étalonnage, justesse, incertitude), la méthode mise en œuvre est validée.

## **II- Participation à des essais inter laboratoires**

Les essais inter laboratoires peuvent avoir des objectifs différents. Ils permettent soit de valider et de caractériser une méthode d'analyse [norme ISO 5725], soit de caractériser des matériaux de référence, soit de vérifier l'aptitude d'un laboratoire à effectuer une mesure.

**Pour caractériser une méthode**, l'essai doit réunir au moins huit laboratoires qui reçoivent un ou plusieurs échantillons sur lesquels ils réalisent au minimum deux analyses. A partir des résultats reçus et selon la norme ISO 5725, des écarts-types de répétabilité et de reproductibilité sont évalués et caractérisent la méthode. Ce type d'essai peut être organisé par n'importe quel type d'organisme.

**Pour caractériser un matériau de référence (certifié ou non)**, il faut au préalable que l'organisateur ait estimé son homogénéité et sa stabilité. Les participants sont généralement sélectionnés sur leur haut niveau de compétence. Les méthodes analytiques doivent être aussi variées que possible afin de détecter un biais systématique. A partir des résultats, la caractéristique est définie avec une valeur et une incertitude.

**Pour vérifier l'aptitude d'un laboratoire à réaliser une analyse**, par rapport à l'ensemble de la profession, l'essai inter laboratoires, appelé essai d'aptitude, réunit de nombreux laboratoires, parfois plusieurs milliers. Un même échantillon est envoyé à l'ensemble des laboratoires, qui renvoient leur résultat à l'organisateur. A partir de ceux-ci, une valeur consensuelle est établie (moyenne arithmétique, moyenne robuste) ainsi qu'une tolérance. Les laboratoires sont ensuite classés selon leur aptitude à fournir un résultat dans les limites de la tolérance. Ces essais sont organisés par des structures professionnelles, accréditées ou non.

Actuellement, la qualité des analyses et en particulier leur justesse sont évaluées au travers d'essais inter laboratoires (évaluation externe de la qualité) organisés par les autorités de tutelle (AFSSAPS) ou sur une base volontaire par des associations telles que le Centre Toulousain de Contrôle en Biologie (CTCB). Les incertitudes des résultats d'analyses sont très rarement évaluées et la justesse est appréciée par la mesure de l'écart entre le résultat d'un laboratoire et la moyenne obtenue par ses pairs. Cette moyenne peut donc souffrir d'une erreur systématique, sans moyen de la détecter. Cette situation est en contradiction avec les référentiels internationaux qui exigent une traçabilité des mesures à un étalon international. C'est pourquoi, après avoir validé la méthode de référence pour la détermination du glucose dans le sérum, nous avons fourni des valeurs de référence à des échantillons d'essais d'aptitude et les avons comparées aux valeurs consensuelles. Les essais d'aptitude sont ceux du CTCB (EIL) et de l'AFSSAPS (CNQ).

## II-1 Informations relatives aux essais inter laboratoires

### II-1-1 Echantillons reçus et laboratoires participants

Les échantillons sont envoyés aux laboratoires participants par les organisateurs des EIL (AFSSAPS ou CTCB) dans des conditions permettant la bonne conservation des échantillons. Plusieurs types d'échantillons sont fournis lors des EIL : des échantillons de sérum bovin ou humain, qui peuvent être soit congelés, soit lyophilisés.

Les sérums congelés sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avant analyse, ils sont retirés du congélateur et laissés à température ambiante jusqu'à décongélation.

Les sérums lyophilisés sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$ . Avant analyse, ils sont reconstitués dans un volume défini d'eau distillée (5 ml). Cette préparation doit être effectuée avec un soin tout particulier :

- ouverture du flacon avec beaucoup d'attention afin d'éviter toute perte de l'échantillon ;
- reconstitution avec de l'eau distillée ou ultra pure ;
- temps d'attente de 30 minutes avant de réaliser l'homogénéisation par retournements lents, afin d'éviter la formation de bulles.

La détermination a été réalisée avec la méthode de référence développée au LNE et avec les méthodes utilisées en routine dans les laboratoires.

Les différentes caractéristiques des échantillons analysés sont regroupés dans les **Tableaux 20 et 21** :

**Tableau 20** : Tableau récapitulatif des échantillons du CTCB

Matrices sériques	Nature	
Sérums congelés	humain	CHE 913
		CHE 924
Sérums lyophilisés	humain	CHE914
		CHE 915
	bovin	CHE 916
		CHE 922
		CHE 923

**Tableau 21 : Tableau récapitulatif des échantillons de l'AFSSAPS**

Matrices sériques	Nature	
Sérums lyophilisés	humain	BIO7
		BIO8

## **II-1-2- Méthodes utilisées par les laboratoires participants**

Les effectifs relatifs aux différentes méthodes mises en œuvre au cours de ces essais d'aptitude sont détaillés dans les **Tableaux 22, 23 et 24**.

**Tableau 22 : Effectifs des différentes techniques mises en œuvre lors des EIL organisés par le CTCB concernant les échantillons CHE 913 et CHE 924**

<b>Techniques</b>	<b>Effectif EIL CHE 913</b>	<b>Effectif EIL CHE 924</b>
<b>Toutes techniques</b>	<b>167</b>	<b>164</b>
Techniques utilisant Hexokinase – point final avec blanc échantillon ou bichromatisme	80	80
Technique utilisant Hexokinase - point final sans blanc échantillon	2	1
Techniques utilisant Glucose oxydase - Spectrorélectométrie	19	20
Technique utilisant Glucose Oxydase - Chromogène phénolique point final	55	53
Technique utilisant Glucose Oxydase - GOD utilisant une électrode à PO <sub>2</sub>	4	3
Techniques enzymatiques diverses : INT, FLUO	2	2
OrthoToluidine	2	2
Autres	4	4

**Tableau 23 :** Tableau récapitulatif des différentes méthodes, ainsi que des différentes associations fournisseurs/automates utilisées dans les laboratoires de biologie médicale pour doser l'échantillon de l'AFSSAPS : BIO7.

<b>BIO7</b>			
<b>Techniques/ fournisseurs</b>	<b>Automate/réactif</b>	<b>Effectif total</b>	<b>Effectif sélectionné</b>
<b>Méthode LNE DI-CG/SM</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Moyenne générale</b>		<b>3358</b>	<b>2982</b>
<b>HEXOKINASE point final avec blanc</b>		<b>1176</b>	<b>1084</b>
Olympus	AU system, Glucose (HK)	185	178
Abott	Architect TM systems	94	82
Roche	Hitachi / Modular, Gluco-quant HK	79	67
Roche	cobas c systems - (GLUC2, GLUC3)	81	72
Dade Behring	Dimension TM séries, (DF39A, DF40)	316	283
Beckman Coulter	Synchron TM séries, Glucose HK	89	80
Roche	Integra TM séries, Glucose HK (liquide)	327	296
<b>Tech.avec lecture</b>		<b>519</b>	<b>468</b>
Ortho-CD	Vitros TM séries	510	460
<b>Techniques GOD-POD Trinder -</b>		<b>1490</b>	<b>1338</b>
Biocode-Hycoel	Lisa TM séries, Glucose	65	59
Randox	RX TM séries, glucose (GOD-PAP)	39	35
Biomérieux	Glucose RTU/PAP	371	338
Poles	Hitachi TM séries, Glucose (GOD-PAP)	121	103
Sobioda	Glucose LD M	18	17
Diasys	Glucose GOD FS	47	42
Menarini	Glucose (GOD-PAP), 34232	61	55
Elitech	Glucose (GOD-PAP)	118	105
Maxmat	Maxmat PL-Glucose (GOD-PAP)	15	13
Thermo Fisher / DPC	Konelab TM séries, Glucose (GOD-POD)	238	214
ABX	ABX Pentra, Glucose PAP CP, A11A01668	62	57
Roche	Hitachi/Modular, Glucose GOD/PAP	207	184
Bayer	Advia TM séries, Glucose (GOD-PAP)	61	54
Biolabo	Glucose	31	28
<b>O2</b>		<b>134</b>	<b>124</b>
Beckman Coulter	Synchron TM séries, Glucose (GOD-électrode)	131	121
<b>Hexokinase point final sans blanc</b>		<b>18</b>	<b>16</b>
Autres		<b>16</b>	<b>13</b>

Ces deux types d'EIL concernent respectivement un nombre de laboratoires très différents. Le CNQ (AFSSAPS) concerne la totalité des laboratoires français (privés et hospitaliers), tandis que les EIL du CTCB sont limitées à des laboratoires volontaires. Par conséquent, le nombre de laboratoires participant au CNQ de l'AFSSAPS (plus de 3 000) est très supérieur à celui du CTCB (160 environ). Les effectifs des participants aux EIL du CTCB ne représentent que 6% de la participation nationale aux contrôles de qualité nationaux organisés par l'AFSSAPS.

**Tableau24 :** Tableau récapitulatif des différentes techniques, ainsi que des différentes associations fournisseurs automates utilisés dans les laboratoires de biologie médicale pour doser l'échantillon de l'AFSSAPS : BIO8.

BIO8				
Techniques/fournisseurs		Automate/réactif	Effectif total	Effectif sélectionné
<b>Méthode LNE DI-CG/SM</b>			<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Moyenne générale</b>			<b>3314</b>	<b>2992</b>
<b>HEXOKINASE point final avec blanc</b>			<b>1213</b>	<b>1108</b>
Olympus		AU system, Glucose (HK)	185	168
Abott		Architect c800, 7D66	106	95
Roche		Hitachi / Modular, Gluco-quant HK	86	77
Roche		Cobas 6000 (c501), Glucose HK, 04404483	236	206
Dade Behring		Dimension TM séries, DF39A, DF40	316	281
Beckman Coulter		Synchron TM séries, Glucose HK	86	77
Roche		Integra TM séries, Glucose HK, 20763020	196	180
<b>Tech.avec lecture REFLECTOMETRIQUE</b>			<b>512</b>	<b>462</b>
Ortho-CD		Vitros TM séries	505	457
<b>Techniques GOD-POD Trinder - point final</b>			<b>1411</b>	<b>1276</b>
Biocode-Hycel		Lisa TM séries, Glucose	58	54
Randox		Glucose (GOD-PAP)	38	37
Biomérieux		Glucose RTU	347	310
Poles		Hitachi TM séries, Glucose (GOD-PAP)	85	77
Diasys		Glucose GOD FS	69	61
Menarini		Glucose (GOD-PAP)	63	58
Elitech		Glucose (GOD-PAP)	116	101
Maxmat		Maxmat PL-Glucose (GOD-PAP)	17	17
Thermo Scientific		Konelab TM séries, Glucose (GOD-POD)	243	222
Horiba ABX		ABX Pentra, Glucose PAP CP, A11A01668	61	60
Roche		Hitachi/Modular, Glucose GOD/PAP	168	152
Siemens		Advia TM séries, Glucose (GOD-PAP)	72	71
Biolabo		Glucose	33	30
<b>GOD-ELECTRODE Consommation O2</b>			<b>144</b>	<b>135</b>
Beckman Coulter		Synchron TM séries, Glucose (GOD-électrode)	141	132
<b>Hexokinase point final sans blanc</b>			<b>22</b>	<b>21</b>

Le CTCB étant une organisation basée à Toulouse, son rayonnement touche préférentiellement les laboratoires de biologie médicale du Sud-Ouest.

Il apparaît que la proportion relative des méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale est très semblable dans les deux EIL : les laboratoires ayant participé aux EIL CTCB et de l'AFSSAPS utilisent tous une technique enzymatique, soit à l'hexokinase (près de 48 % pour le CTCB, et 35% pour l'AFSSAPS) soit à la glucose oxydase (près de 50% pour le CTCB, et 65% pour l'AFSSAPS). Dans les méthodes utilisant cette dernière enzyme, on distingue différentes modalités de quantification : réaction indicatrice avec lecture colorimétrique (près de 33 % pour le CTCB et 45 % pour l'AFSSAPS), lecture réflectométrique (près de 11% pour le CTCB, et 15% pour l'AFSSAPS) ou mesure directe de la consommation d'oxygène (près de 2 % pour le CTCB, et 4 % pour l'AFSSAPS).

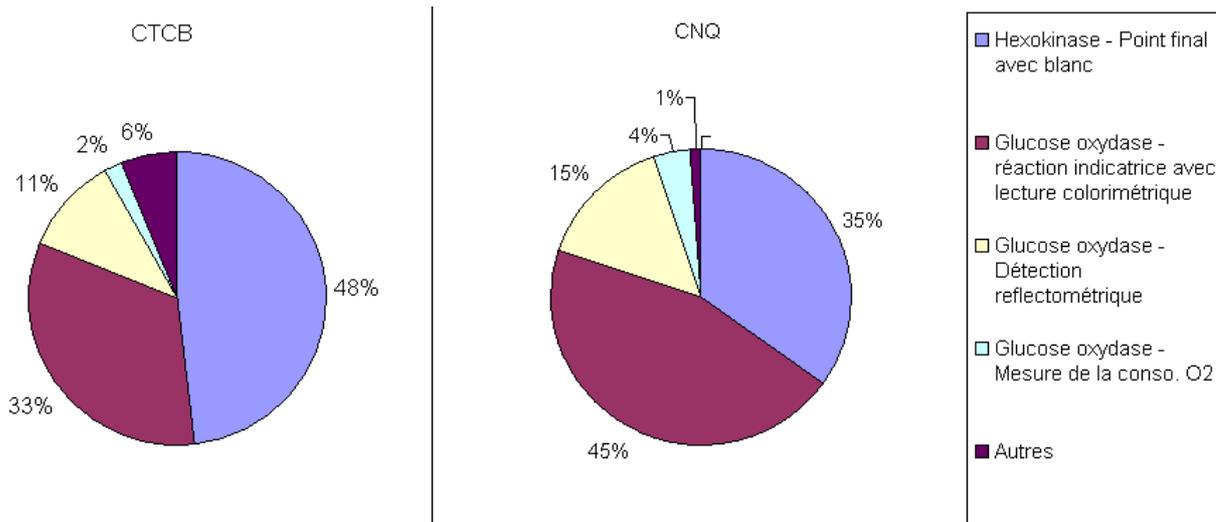


Figure 52 : Proportion des différentes techniques de routine utilisées pour chaque EIL : CTCB et CNQ

## II-2 Résultats

Chaque échantillon des différents EIL a été analysé par la méthode de référence développée au LNE. Les **Tableaux 25 et 26** regroupent les valeurs de référence (déterminées par la méthode de référence) et les valeurs consensuelles (déterminées par les résultats des méthodes de routine). L'écart normalisé, indique, lorsqu'il est supérieur à 2 en valeur absolue, une différence significative entre les deux valeurs. Dans le traitement des résultats, l'incertitude associée à la valeur consensuelle correspond à la dispersion des résultats de l'EIL.

### II-2-2 Valeurs

Tableau 25 : Valeurs de référence LNE et valeur consensuelles des échantillons d'essais d'aptitude du CTCB

SERUMS CONGELES				
		Concentration (mmol/l)	Incertitude-type (mmol/l)	Ecart normalisé EN
CHE 913 (humain)	Valeur de référence	9,86	0,09	1,10
	Valeur consensuelle	10,15	0,24	
CHE 924 (humain)	Valeur de référence	4,51	0,05	0,06
	Valeur consensuelle	4,50	0,18	

SERUMS LYOPHILISES				
		Concentration (mmol/l)	Incertitude-type (mmol/l)	Ecart normalisé EN
CHE 914 (humain)	Valeur de référence	16,84	0,03	3,03
	Valeur consensuelle	15,43	0,46	
CHE 915 (humain)	Valeur de référence	6,22	0,04	0,89
	Valeur consensuelle	6,04	0,20	
CHE 916 (bovin)	Valeur de référence	16,64	0,40	3,33
	Valeur consensuelle	15,30	0,40	
CHE 922 (bovin)	Valeur de référence	6,27	0,03	3,54
	Valeur consensuelle	5,64	0,18	
CHE 923 (bovin)	Valeur de référence	3,59	0,04	3,37
	Valeur consensuelle	3,19	0,11	

**Tableau 26** : Valeurs de référence LNE et valeur consensuelle des échantillons d'essais d'aptitude de l'AFSSAPS

		Concentration (mmol/l)	Incertitude-type (mmol/l)	Ecart normalisé EN
BIO7	Valeur consensuelle	2,95	0,10	0,53
	Valeur de référence	3,01	0,04	
BIO8	Valeur consensuelle	6,12	0,18	0,37
	Valeur de référence	6,05	0,03	

Quel que soit l'échantillon, l'incertitude fournie par une méthode de référence est largement inférieure à l'incertitude associée à la valeur consensuelle même s'il semble que les échantillons lyophilisés conduisent à plus d'imprécision dans les résultats des méthodes de routine que les

échantillons congelés. Ceci montre l'intérêt pour un laboratoire d'évaluer la justesse par rapport à une valeur dont la dispersion est faible.

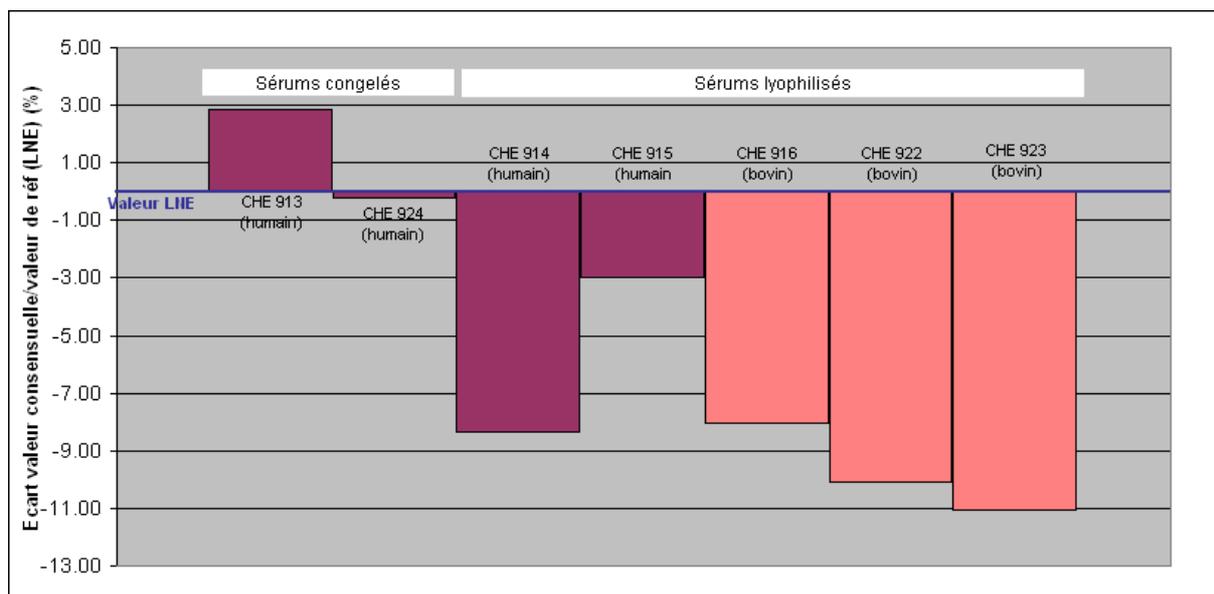
## **II-3 Analyse des résultats et discussion**

Les résultats des deux EIL apportent des informations différentes et complémentaires :

- Dans l'EIL du CTCB, les échantillons analysés se présentent soit sous forme de sérum congelé, soit sous forme lyophilisée. Par ailleurs, il peut s'agir de sérum humain ou bovin (Tableau n°4). Les résultats permettent d'identifier la présence d'éventuels biais de mesure induits par le mode de conditionnement du sérum (congelé ou lyophilisé). Par ailleurs, les concentrations des cinq échantillons analysés couvrent une gamme large compatible avec les valeurs trouvées habituellement dans les laboratoires (d'environ 3 mmol/l à environ 17 mmol/l), ce qui permet d'évaluer l'influence de la concentration sur la justesse du résultat.
- Dans ce cas du CNQ de l'AFSSAPS, les sérums se présentent exclusivement sous forme de sérum humain lyophilisé. Les informations communiquées par l'AFSSAPS permettent une analyse des résultats non seulement en fonction du principe de la technique (Hexokinase ou Glucose oxydase avec différentes techniques de détection) mais aussi en fonction du réactif et du fabricant.

### **II-3-1 Mise en évidence d'un effet matrice (EIL du CTCB)**

Des écarts significatifs entre la valeur de référence et la valeur consensuelle sont observés pour quatre échantillons sur les sept analysés. A partir des caractéristiques de tous les échantillons (humain ou bovin, lyophilisés ou non) et du pourcentage d'écart entre les valeurs consensuelles et les valeurs de références (**Figure 53**), il a été mis en évidence un « effet échantillon ». En effet, la glycémie moyenne obtenue par l'ensemble des méthodes de routine est plus proche de la valeur obtenue par IDMS lorsque l'échantillon se présente sous la forme de sérum congelé. En revanche, pour la majorité des échantillons lyophilisés (4 sur 7), l'écart est significatif (entre 8 et 11 %) et se traduit dans tous les cas par une sous-évaluation de la glycémie par des méthodes utilisées dans les laboratoires participants.

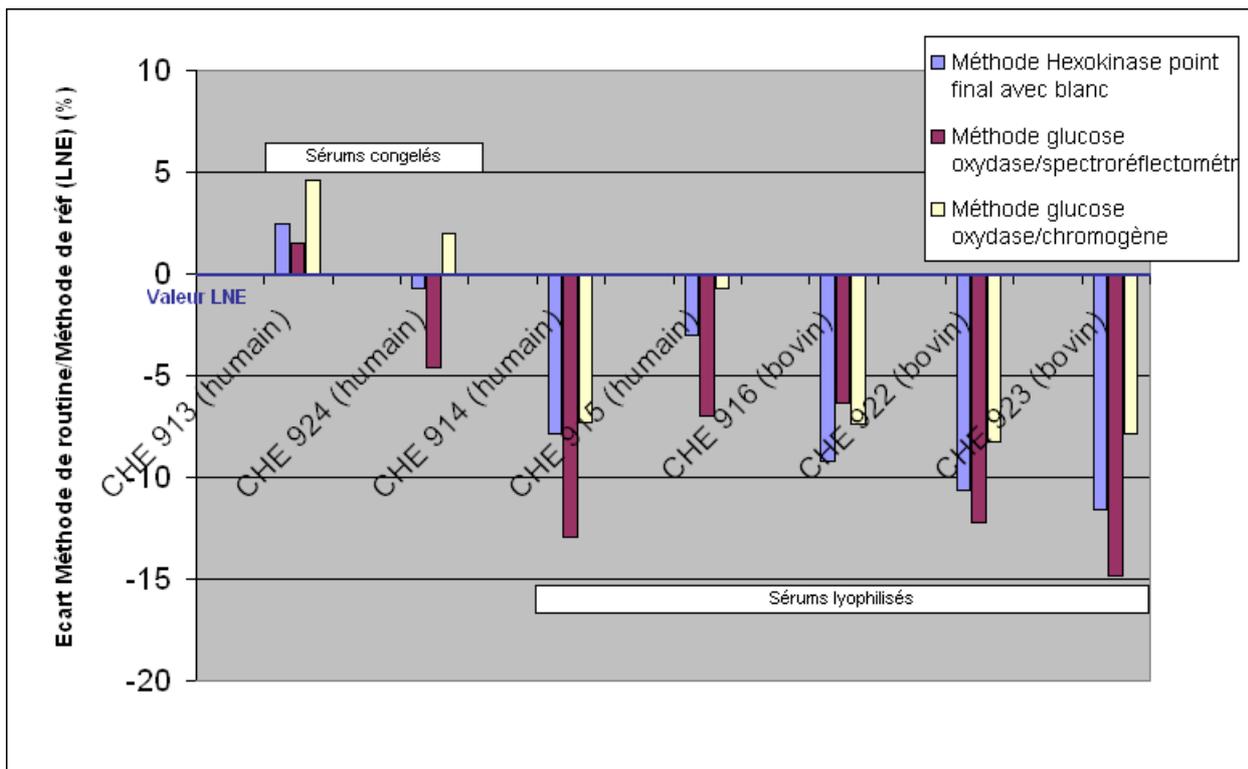


**Figure 53 :** Ecart relatif entre la valeur de référence (LNE) et la valeur consensuelle fournie par l'ensemble des laboratoires de biologie médicale pour les échantillons du CTCB. Les échantillons CHE 913 à CHE 923 ont été classés dans l'ordre croissant des concentrations.

Par ailleurs, les écarts de justesse les plus importants sont observés pour les trois échantillons de sérum bovin lyophilisés utilisés dans l'EIL du CTCB (de 8 à 11 % pour les sérums bovins contre 3 à 8% pour les sérums humains). Cependant, le nombre d'échantillon n'est pas suffisant pour conclure de manière certaine quant à l'existence d'un effet de la nature du sérum. La non-commutabilité des échantillons pourrait aussi être à l'origine de la non comparabilité des mesures.

### **II-3-2 Analyse des résultats par méthode utilisée (EIL du CTCB)**

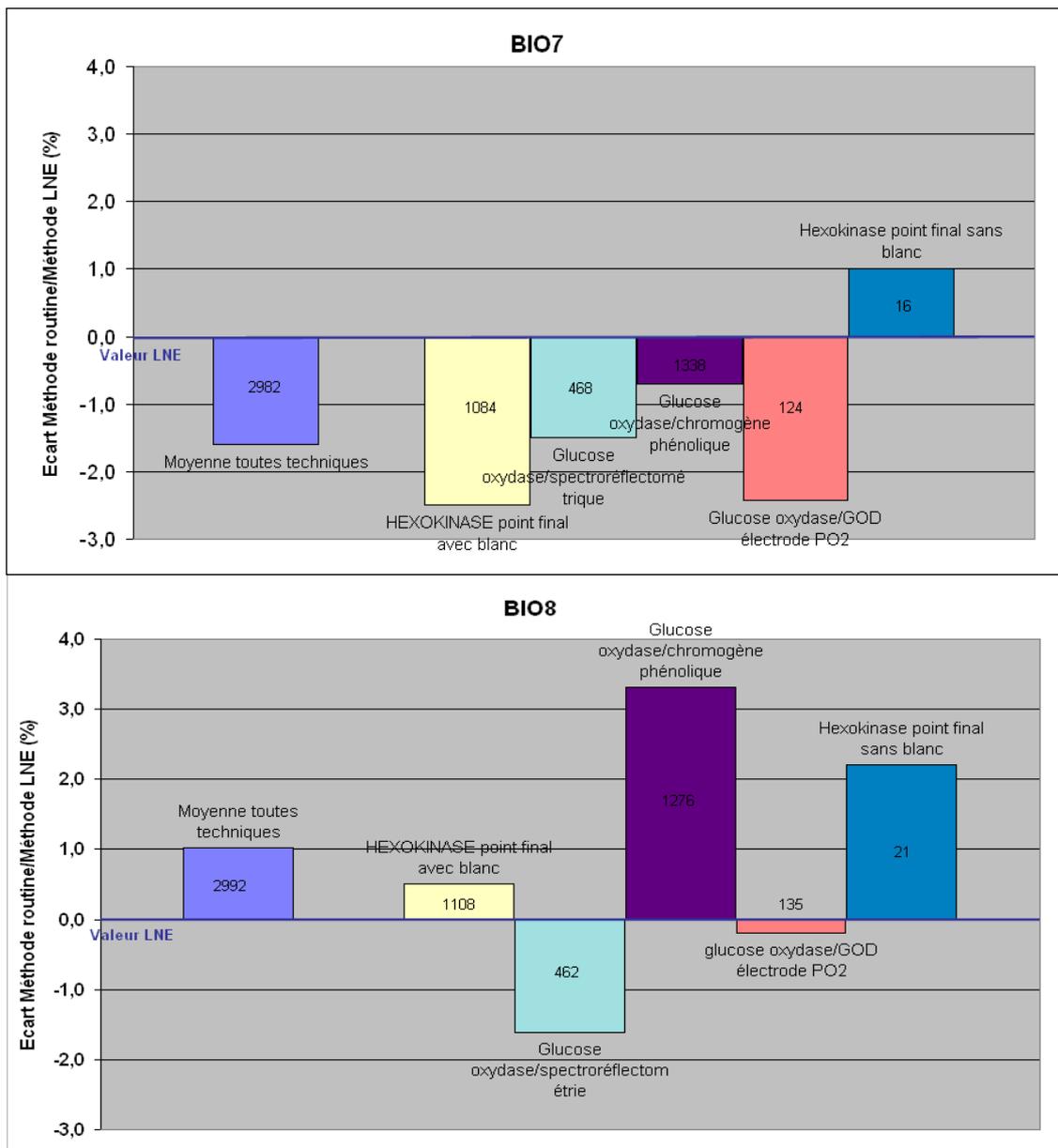
Les valeurs consensuelles présentées jusqu'à présent étaient estimées toute méthodes confondues. S'il existe un biais lié à la méthode, il ne pouvait être mis en évidence. Aussi, l'écart relatif entre la valeur consensuelle et la valeur de référence a été calculé en fonction des méthodes les plus représentatives pour l'ensemble des échantillons (*Figures 54 et 55*).



**Figure 54 :** Ecart relatif entre la valeur de référence (LNE) et la valeur consensuelle fournie par les méthodes des laboratoires de biologie médicale pour chaque échantillon du CTCB.

L'analyse des résultats des EIL du CTCB ne permet pas de mettre en évidence d'effet méthode évident : les résultats sont homogènes quelle que soit la technique utilisée. Dans l'ensemble, les méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale ont tendance à sur-évaluer très légèrement la glycémie dans les sérums congelés et à la sous-évaluer plus nettement dans les échantillons lyophilisés, d'une manière indépendante de la technique mise en œuvre. Le nombre de laboratoires participant à l'EIL n'est peut être pas suffisant pour que le nombre de mesures réalisées par chaque groupe de pairs soit significatif.

En revanche, les résultats des CNQ AFSSAPS permettent une analyse des résultats sur un volume d'analyses beaucoup plus conséquent. Les résultats sont présentés dans les **Tableaux 26 et 27**.



**Figure 55 :** Ecart relatif entre la valeur de référence et la valeur consensuelle fournie par l'ensemble des laboratoires de biologie médicale des échantillons de l'AFSSAPS

Dans l'ensemble, les résultats sont satisfaisants puisque l'écart de justesse est de l'ordre de quelques pourcents. Il apparaît que les techniques à la glucose oxydase avec mesure spectrorélectométrique » ont tendance à donner des résultats inférieurs à la valeur de référence et ce, quel que soit l'échantillon. En revanche, les techniques à l'hexokinase avec blanc présentent des écarts, aussi bien positifs que négatifs, selon les échantillons. Elles ne présentent donc pas de tendance particulière, alors que la technique « sans blanc » aurait tendance à sur-évaluer les résultats. Cependant, peu de laboratoires utilisent cette technique.

La technique à la glucose oxydase avec chromogène phénolique fournit des résultats supérieurs d'environ 3% à la valeur de référence pour la concentration la plus élevée.

### **II-3-3 Analyse des résultats par méthode et par couple** **« appareil / fournisseur du réactif » (CNQ AFSSAPS)**

Le contrôle CNQ de l'ASSAPS fournit également des informations supplémentaires comme les fournisseurs des techniques mises en œuvre lors de ces essais d'aptitude (*Tableaux 27 et 28*).

*Tableau 27 : Résultats selon les techniques et les fournisseurs pour l'échantillon BIO7 de l'AFSSAPS et écart relatif entre la valeur consensuelle et la valeur de référence. L'écart normalisé doit être supérieur à 2 pour que les valeurs soient considérées comme significativement différentes.*

BIO7							
Techniques/ fournisseurs	Automate/réactif	Effectif total	Effectif sélectionné	Concentration en glucose (mmol/l)	Incertitude-type	Ecart méthode de routine/méthode de réf. (%)	Ecart normalisé k=1
<b>Méthode LIIE DI-CG/SM</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3.001</b>	<b>0.043</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Moyenne générale</b>		<b>3358</b>	<b>2982</b>	<b>2.953</b>	<b>0.100</b>	<b>-1.60</b>	<b>0.438</b>
<b>HEXOKINASE point final avec blanc</b>		<b>1176</b>	<b>1084</b>	<b>2.926</b>	<b>0.073</b>	<b>-2.50</b>	<b>0.887</b>
Olympus	AU system, Glucose (HK)	185	178	3.021	0.056	0.67	0.286
Abott	Architect TM systems	94	82	2.925	0.055	-2.53	1.079
Roche	Hitachi / Modular, Gluco-quant HK	79	67	2.916	0.073	-2.83	1.001
Roche	cobas c systems - (GLUC2, GLUC3)	81	72	2.916	0.087	-2.83	0.875
Dade Behring	Dimension TM séries, (DF39A, DF40)	316	283	2.995	0.073	-0.20	0.070
Beckman Coulter	Synchron TM séries, Glucose HK	89	80	2.904	0.065	-3.23	1.239
Roche	Integra TM séries, Glucose HK (liquide)	327	296	2.833	0.101	-5.59	1.534
<b>REFLECTOMETRIQUE</b>		<b>519</b>	<b>468</b>	<b>2.956</b>	<b>0.101</b>	<b>-1.50</b>	<b>0.410</b>
Ortho-CD	Vitros TM séries	510	460	2.956	0.101	-1.50	0.410
<b>Techniques GOD-POD Trinder -</b>		<b>1490</b>	<b>1338</b>	<b>2.980</b>	<b>0.113</b>	<b>-0.70</b>	<b>0.172</b>
Biocode-Hycel	Lisa TM séries, Glucose	65	59	3.064	0.132	2.10	0.455
Randox	RX TM séries, glucose (GOD-PAP)	39	35	3.050	0.125	1.64	0.371
Biomérieux	Glucose RTU/PAP	371	338	2.981	0.131	-0.66	0.144
Poles	Hitachi TM séries, Glucose (GOD-PAP)	121	103	2.934	0.082	-2.23	0.720
Sobioda	Glucose LD M	18	17	2.988	0.143	-0.43	0.086
Diasys	Glucose GOD FS	47	42	3.021	0.091	0.67	0.200
Menarini	Glucose (GOD-PAP), 34232	61	55	3.009	0.096	0.27	0.077
Elitech	Glucose (GOD-PAP)	118	105	2.946	0.106	-1.83	0.479
Maxmat	Maxmat PL-Glucose (GOD-PAP)	15	13	3.263	0.078	8.73	2.930
Thermo Fisher / DPC	Konelab TM séries, Glucose (GOD-POD)	238	214	2.991	0.081	-0.33	0.108
ABX	ABX Pentra, Glucose PAP CP, A11A01668	62	57	2.859	0.109	-4.73	1.213
Roche	Hitachi/Modular, Glucose GOD/PAP	207	184	2.919	0.073	-2.73	0.965
Bayer	Advia TM séries, Glucose (GOD-PAP)	61	54	3.116	0.084	3.84	1.217
Biolabo	Glucose	31	28	3.096	0.139	3.17	0.652
<b>GOD-ELECTRODE Consommation O2</b>		<b>134</b>	<b>124</b>	<b>2.928</b>	<b>0.088</b>	<b>-2.43</b>	<b>0.744</b>
Beckman Coulter	électrode)	131	121	2.928	0.088	-2.43	0.744
<b>Hexokinase point final sans blanc</b>		<b>18</b>	<b>16</b>	<b>2.971</b>	<b>0.107</b>	<b>-1.00</b>	<b>0.259</b>
Autres		<b>16</b>	<b>13</b>	<b>3.042</b>	<b>0.058</b>	<b>1.37</b>	<b>0.570</b>

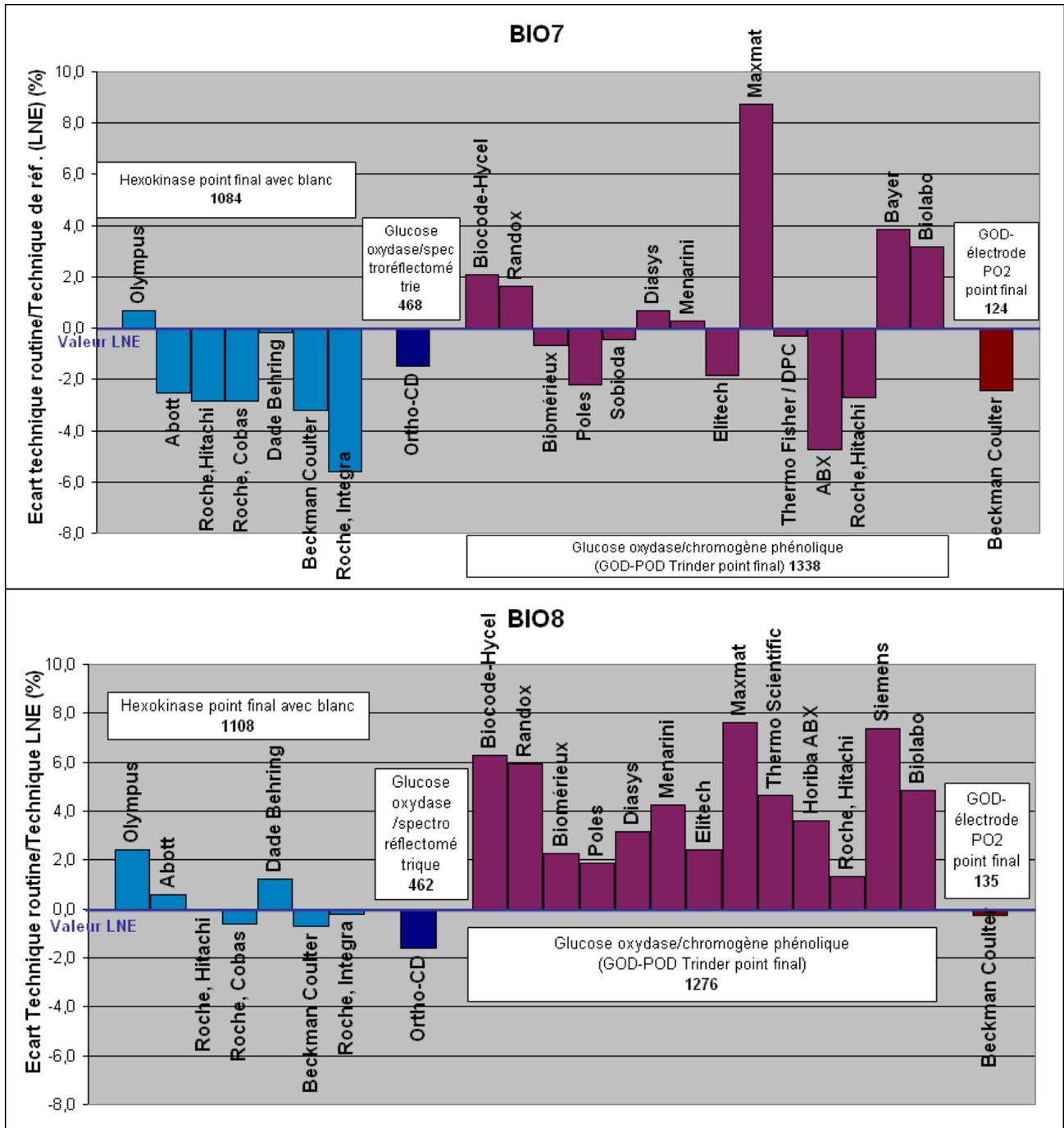
Seul un couple fournisseur/automate (Maxmat/Maxmat PL-Glucose GOD/PAP) pour le dosage par la technique GOD-POD Trinder fournit une valeur significativement différente (écart normalisé = 2,930).

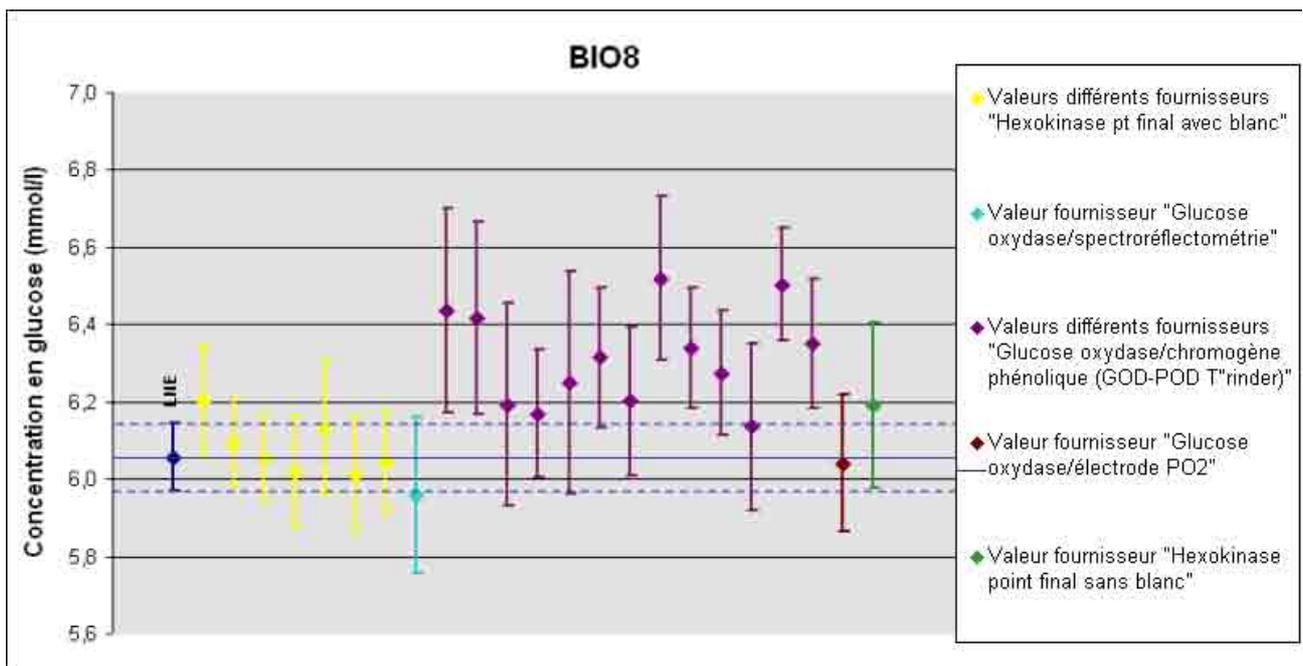
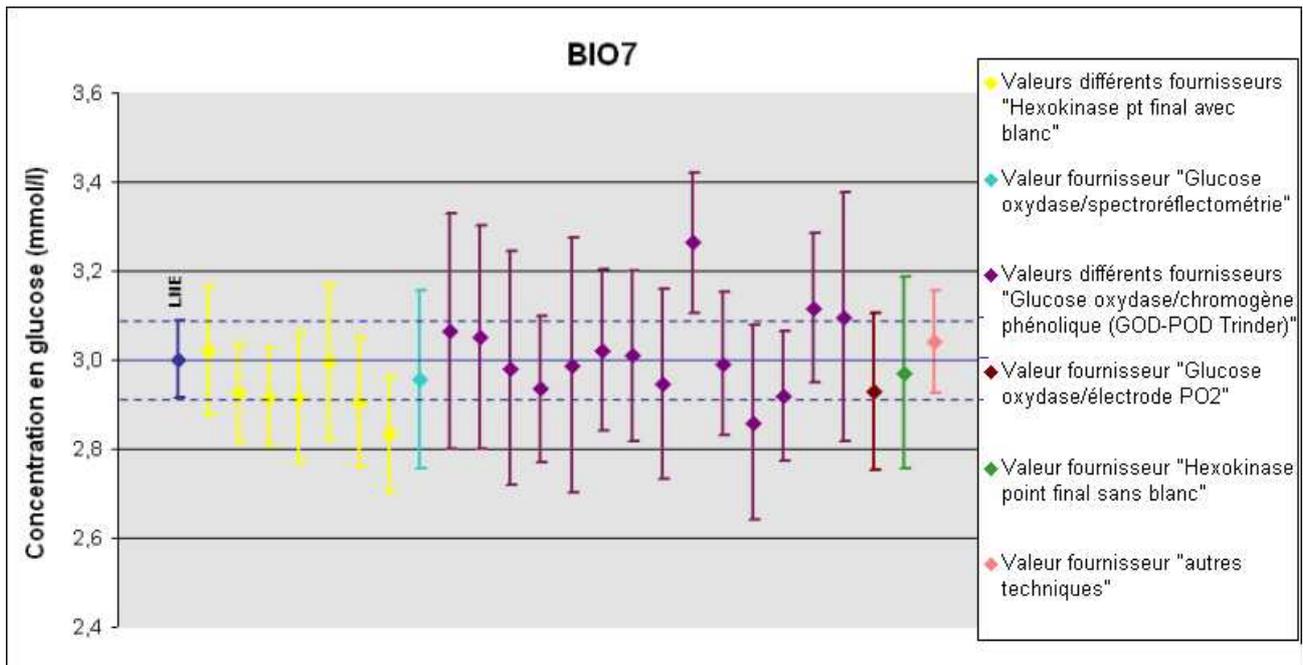
**Tableau 28** : Résultats selon les techniques et les fournisseurs de l'échantillon BIO8 de l'AFSSAPS et écart relatif entre la valeur consensuelle et la valeur de référence. L'écart normalisé doit être supérieur à 2 pour que les valeurs soient considérées comme significativement différentes.

BIO8							
Techniques/fournisseurs	Automate/réactif	Effectif total	Effectif sélectionné	Concentration en glucose (mmol/l)	Incertitude-type	Ecart méthode de routine/méthode de réf. (%)	Ecart normalisé k=1
Méthode LIIE DI-CG/SM		1	1	6.056	0.054	0	0
<b>Moyenne générale</b>		<b>3314</b>	<b>2992</b>	<b>6.118</b>	<b>0.367</b>	<b>1.02</b>	<b>0.167</b>
<b>HEXOKINASE point final avec blanc</b>		<b>1213</b>	<b>1108</b>	<b>6.087</b>	<b>0.268</b>	<b>0.51</b>	<b>0.113</b>
Olympus	AU system, Glucose (HK)	185	168	6.201	0.260	2.39	0.545
Abbott	Architect c800, 7D66	106	95	6.091	0.171	0.57	0.196
Roche	Hitachi / Modular, Gluco-quant HK	86	77	6.052	0.242	-0.07	0.016
Roche	Cobas 6000 (c501), Glucose HK, 04404483	236	206	6.018	0.205	-0.63	0.180
Dade Behring	Dimension TM séries, DF39A, DF40	316	281	6.129	0.245	1.20	0.291
Beckman Coulter	Synchron TM séries, Glucose HK	86	77	6.013	0.265	-0.72	0.159
Roche	Integra TM séries, Glucose HK, 20763020	196	180	6.043	0.254	-0.22	0.050
<b>Tech.avec lecture REFLECTOMETRIQUE</b>		<b>512</b>	<b>462</b>	<b>5.959</b>	<b>0.250</b>	<b>-1.61</b>	<b>0.379</b>
Ortho-CD	Vitros TM séries	505	457	5.958	0.250	-1.62	0.383
<b>Techniques GOD-POD Trinder - point final</b>		<b>1411</b>	<b>1276</b>	<b>6.257</b>	<b>0.413</b>	<b>3.31</b>	<b>0.483</b>
Biocode-Hycel	Lisa TM séries, Glucose	58	54	6.437	0.451	6.29	0.840
Randox	Glucose (GOD-PAP)	38	37	6.416	0.372	5.94	0.957
Biomérieux	Glucose RTU	347	310	6.193	0.384	2.26	0.353
Poles	Hitachi TM séries, Glucose (GOD-PAP)	85	77	6.169	0.407	1.86	0.275
Diasys	Glucose GOD FS	69	61	6.249	0.287	3.18	0.660
Menarini	Glucose (GOD-PAP)	63	58	6.315	0.467	4.27	0.551
Elitech	Glucose (GOD-PAP)	116	101	6.201	0.459	2.39	0.314
Maxmat	Maxmat PL-Glucose (GOD-PAP)	17	17	6.519	0.613	7.64	0.753
Thermo Scientific	Konelab TM séries, Glucose (GOD-POD)	243	222	6.339	0.304	4.67	0.916
Horiba ABX	ABX Pentra, Glucose PAP CP, A11.A.01668	61	60	6.274	0.502	3.59	0.432
Roche	Hitachi/Modular, Glucose GOD/PAP	168	152	6.135	0.245	1.30	0.314
Siemens	Advia TM séries, Glucose (GOD-PAP)	72	71	6.503	0.455	7.38	0.975
Biolabo	Glucose	33	30	6.35	0.445	4.85	0.657
<b>GOD-ELECTRODE Consommation O2</b>		<b>144</b>	<b>135</b>	<b>6.045</b>	<b>0.290</b>	<b>-0.19</b>	<b>0.037</b>
Beckman Coulter	Synchron TM séries, Glucose (GOD-électrod	141	132	6.041	0.278	-0.25	0.053
<b>Hexokinase point final sans blanc</b>		<b>22</b>	<b>21</b>	<b>6.19</b>	<b>0.285</b>	<b>2.21</b>	<b>0.462</b>

A partir de données de ces tableaux et pour une meilleure lisibilité, les écarts relatifs entre la valeur consensuelle et la valeur de référence ont été reportées dans la **Figure 56**.

**Figure 56 :** Ecart relatif entre les valeurs fournies par chaque fournisseur/fabricant et la valeur fournie par la méthode développée au LNE. L'échantillon BIO7 présente une tendance uniforme de sous-dosage pour la méthode de dosage par Hexokinase point final avec blanc. L'échantillon BIO8, lui, présente une tendance homogène au surdosage avec la méthode Glucose oxydase/chromogène phénolique.





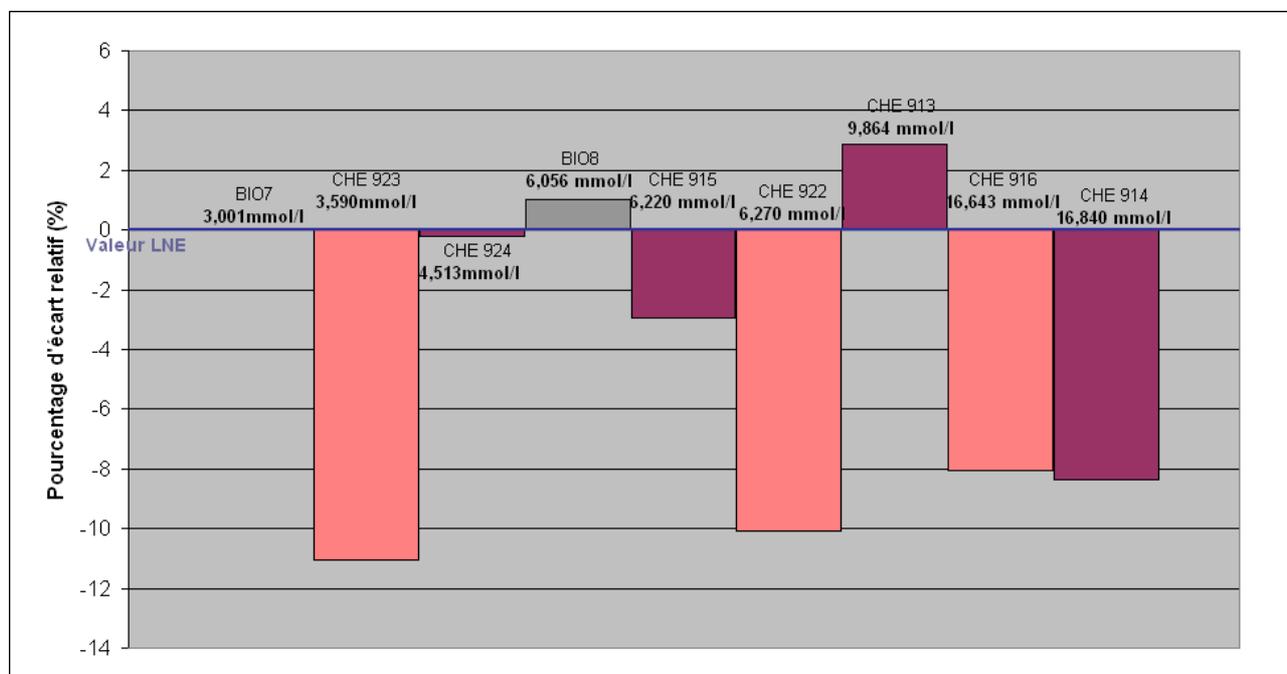
**Figure 57 :** Concentration en glucose des échantillons BIO7 et BIO8 obtenues par méthode et pour les différents fournisseurs, par rapport à la valeur de référence du LNE. Les concentrations sont associées à leurs incertitudes élargies. Ces dernières représentent deux fois l'écart-type pour les valeurs consensuelles

Il apparaît que les techniques à la glucose oxydase de type « Trinder » (qui sont les plus utilisées) sont justes dans l'ensemble pour les concentrations basses (3 mmol/l) mais il semble qu'elles aient tendance à surévaluer la glycémie aux concentrations plus élevées (dès 6 mmol/l).

Les méthodes à l'hexokinase avec blanc, elles aussi très utilisées, présentent de meilleurs résultats pour les concentrations hautes mais ont tendance à sous-évaluer les concentrations faibles. Les méthodes à la glucose oxydase avec détection spectroreflectométrique, les troisièmes méthodes les plus fréquentes, sont justes, dans les concentrations faibles comme élevées, avec un biais négatif de seulement 2%. Compte tenu de l'ensemble des résultats, il est difficile de recommander une méthode en particulier car les résultats sont majoritairement assez proches des valeurs de référence (*Figure 57*) quelque soit l'échantillon.

### II-3-4 Effet de la concentration sur la justesse des résultats

La concentration en glucose de l'échantillon BIO7 est deux fois moins importante que celle de l'échantillon BIO8. Au vu des résultats précédents, la concentration représente potentiellement un paramètre influent, mais la gamme de concentrations dans laquelle se trouvent les deux échantillons BIO7 et BIO8 est trop restreinte pour pouvoir conclure (BIO7 : 3,001 mmol/l, BIO8 : 6,056 mmol/l (Valeur de référence)). Afin d'étudier l'influence de la concentration sur la justesse des résultats, les valeurs de glycémie obtenues pour l'ensemble des échantillons ont été classées par concentration croissante de gauche à droite (*Figure 58*).



*Figure 58* : Ecarts relatifs entre les valeurs consensuelles fournies par l'ensemble des laboratoires de biologie médicale et la valeur donnée par le LNE pour tous les échantillons d'EIL. Les écarts sont présentés par ordre croissant de concentration en D-glucose.

Il n'apparaît pas d'effet significatif de la concentration. Les résultats obtenus sur les échantillons BIO7 et BIO8 indiquent donc que les écarts de justesse observés pour ces deux échantillons selon la méthode utilisée ne dépendent pas de la glycémie, mais d'un ou plusieurs autres paramètres influant sur le résultat et qui n'ont pas été identifiés.

L'ajout de conservateurs dans les échantillons lyophilisés pourrait être un exemple de variable susceptible de biaiser les résultats d'une manière qui dépende de la concentration.

## **CONCLUSION**

Les résultats fournis par les méthodes utilisées dans les laboratoires de biologie médicale sont proches de ceux fournis par les méthodes de référence. Les pourcentages d'écarts de justesse entre les deux types de valeurs sont en moyenne proches de 2 à 3%. Majoritairement, les méthodes de routine ont tendance à sous-évaluer la concentration de glucose dans les échantillons lyophilisés, mais il n'a pas été mis en évidence d'effet général de la concentration ou d'effet relatif au couple méthode/fournisseur sur le résultat obtenu.

Les données concernant les échantillons sanguins congelés nécessiteraient d'être complétées afin d'établir afin d'avoir une réelle comparaison avec les échantillons lyophilisés, d'autant plus que ces derniers sont couramment utilisés en tant que contrôles internes.

Quoiqu'il en soit les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les méthodes de routines peuvent être jugées comme fiables



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Au LNE, le développement de méthodes de référence pour le dosage de composés d'origine biologique était une thématique entièrement nouvelle au laboratoire. L'objectif de cette thèse a consisté à effectuer une opération de démonstration appliquée au dosage du glucose dans le sérum. La mesure de la glycémie constitue en effet l'analyse de base dans le cadre du diagnostic du diabète, ce qui explique cette analyse soit la deuxième analyse la plus fréquente en France. Dans un premier temps, le travail de thèse a consisté à développer, optimiser et valider une méthode de référence pour le dosage du glucose. Dans un deuxième temps, la méthode de référence a été mise à profit pour fournir des valeurs de référence et les incertitudes associées pour un certain nombre d'échantillons utilisés dans le cadre d'essais inter-laboratoires.

Tout d'abord, une première étape a consisté à choisir la méthode de référence, car plusieurs sont référencées par le JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine). La méthode retenue repose sur la dilution isotopique associée à chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (DI-CG/SM), qui est une méthode primaire de haute exactitude permettant de s'affranchir des effets de matrice et d'obtenir de très faibles incertitudes, ayant démontré d'excellentes performances en termes de répétabilité et de spécificité.

D'un point de vue technique, le protocole inclut une étape de dérivation du glucose car ce composé n'est pas suffisamment stable thermiquement pour être analysé en chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, deux réactions de dérivation successives ont été réalisées pour conduire à la formation de glucose pentaacétate aldonitrilé (GPA) : une aldonitration et une acétylation. Chacune de ces étapes a été optimisée car les temps de réaction varient selon les références bibliographiques décrivant cette réaction, suggérant que ce paramètre puisse avoir un impact sur la justesse de la mesure. Les expériences réalisées ont permis de fixer les temps de chaque étape de dérivation à respectivement 30 minutes pour l'acétylation et 60 minutes pour l'aldonitration.

Ensuite, la spécificité et sélectivité de la méthode ont été évaluées, ainsi que la répétabilité de la méthode. Il apparaît que la méthode développée est spécifique car la séparation chromatographique des interférents connus permet de ne doser que le glucose. La limite de détection  $L_D$  et la limite de quantification  $L_Q$  ont été déterminées : la limite de détection, qui correspond à la concentration de glucose pour laquelle le rapport signal sur bruit est de l'ordre de 3 a été estimée à 2,5  $\mu\text{g/L}$ . La limite de quantification est quant à elle de 7,5  $\mu\text{g/L}$ . Enfin, la justesse de la méthode a été évaluée au moyen du matériau de référence certifié commercialisé par le NIST (NIST SRM 965a). Les résultats montrent que la méthode développée au LNE est juste et qu'il n'existe pas d'effet opérateur significatif, témoignant de la reproductibilité de celle-ci.

Il serait intéressant de caractériser de manière plus complète la robustesse de la méthode. En particulier, il semble pertinent d'apprécier la transférabilité de la méthode et de ses performances dans un environnement autre que celui du LNE. En effet, il faut garder présent à l'esprit que la méthode développée au LNE a pour vocation d'être transférée à d'autres laboratoires souhaitant devenir laboratoires de référence. Le transfert au Laboratoire de Biologie et de Recherche Pédiatriques du CHU de Reims constitue la prochaine étape de la démarche.

Une fois l'optimisation et la validation achevées, la méthode a été utilisée pour fournir des valeurs de référence aux échantillons utilisés dans le cadre de différents essais inter-laboratoires :

- des EIL du CTCB, qui sont des essais d'aptitude volontaires et auxquels participent une centaine de laboratoires de routine,
- des opérations de contrôle organisés par l'AFSSAPS : les contrôles nationaux de la qualité (CNQ), qui sont obligatoires et concernent la totalité des laboratoires de routine, c'est à dire plus de 3000 laboratoires.

Des valeurs de référence ont été assignées à neuf échantillons différents, ainsi que les incertitudes associées. Les résultats montrent que les méthodes de routine sont globalement satisfaisantes : la valeur consensuelle est très proche de la valeur de référence.

Dans les essais inter laboratoires du CTCB, il a été mis en évidence un « effet échantillon ». En effet, la glycémie moyenne obtenue par l'ensemble des méthodes de routine est plus proche de la valeur obtenue par DI-CG/SM lorsque l'échantillon se présente sous la forme de sérum congelé. Pour la majorité des échantillons lyophilisés (4 sur 7), l'écart avec la méthode de référence est significatif et se traduit dans tous les cas par une sous-évaluation de la glycémie par les méthodes utilisées dans les laboratoires participants.

En revanche, l'analyse des résultats des EIL du CTCB ne permet pas de mettre en évidence d'effet méthode clair : les résultats sont homogènes quelle que soit la technique utilisée. Dans l'ensemble, les méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale ont tendance à sur-évaluer très légèrement la glycémie dans les sérums congelés et à la sous-évaluer plus nettement dans les échantillons lyophilisés et ce, d'une manière indépendante de la technique mise en œuvre. Il serait intéressant d'évaluer la justesse de la méthode de référence avec des MRC à base de sérum

lyophilisé. Cela permettrait de conclure quant à l'influence du conditionnement des échantillons de sérum.

Les EIL du CTCB montrent par ailleurs que les écarts de justesse les plus importants sont observés pour les trois échantillons de sérum bovin lyophilisés. Cependant, le nombre d'échantillon n'est pas suffisant pour conclure de manière certaine quant à l'existence d'un effet de la nature du sérum. Il serait donc intéressant de disposer d'autres échantillons de sérum de même concentration mais de nature différente (humain ou bovin) afin de confirmer ou infirmer la tendance observée.

En revanche, les résultats des CNQ AFSSAPS permettent une analyse des résultats sur un volume d'analyses beaucoup plus conséquent. En plus, les informations communiquées par l'AFSSAPS permettent une analyse des résultats non seulement en fonction du principe de la technique (Hexokinase ou Glucose oxydase avec différentes techniques de détection) mais aussi en fonction du fabricant du réactif et de l'automate sur lequel la mesure a été réalisée.

Dans l'ensemble, les résultats sont satisfaisants puisque l'écart de justesse est de l'ordre de quelques pourcents. Il apparaît que les trois méthodes les plus utilisées en routine présentent des résultats satisfaisants puisque l'erreur de justesse est dans tous les cas inférieure à 4%.

- Les techniques à la glucose oxydase avec chromogène phénolique (qui sont les plus utilisées) fournissent des résultats inférieurs à la valeur de référence pour la concentration basse et des résultats supérieurs à la valeur de référence pour la concentration plus élevée.

- Les techniques à l'hexokinase avec mesure en point final (qui sont aussi très largement utilisées) fournissent des résultats inférieurs à la valeur de référence pour la concentration basse et des résultats supérieurs à la valeur de référence pour la concentration plus élevée.

- les techniques à la glucose oxydase avec mesure spectrorélectométrique fournissent quant à elles des résultats inférieurs à la valeur de référence, quelle que soit la concentration de l'échantillon.

L'analyse détaillée des résultats par couple « automate / fournisseur du réactif » montre que l'ensemble des méthodes commerciales utilisant la glucose oxydase avec chromogène phénolique fournissent des résultats supérieurs à la valeur de référence pour la concentration plus élevée.

La tendance générale des techniques à l'hexokinase avec mesure en point final à fournir des résultats inférieurs à la valeur de référence pour la concentration basse est confirmée pour l'ensemble des méthodes commerciales. En revanche, pour les autres méthodes, il n'existe pas de tendance nette à sur-estimer ou sous-estimer la glycémie car les écarts de justesse sont trop faibles pour être significatifs.

Au vu de l'ensemble des résultats, la concentration de glucose dans l'échantillon ne semble pas avoir d'influence significative sur la justesse des résultats mais, pour conclure de manière définitive, il aurait été souhaitable de disposer d'un plus grand nombre d'échantillons de concentrations différentes mais pour lesquels le conditionnement serait le même (sérum humain ou bovin, congelé ou lyophilisé).

Au final, il apparaît qu'indépendamment des différentes composantes susceptibles d'influer sur le résultat de la mesure, les méthodes de routine et la méthode de référence fournissent des résultats très proches dans l'ensemble. On ne peut que se réjouir de cet état de fait car ceci n'est pas le cas dans tous les pays. Par exemple, une étude similaire réalisée au Mexique par le CENAM [65] a permis de montrer que pour environ la moitié des kits commerciaux utilisés dans l'étude, la glycémie était sur-estimée. Dans l'ensemble, les auteurs mettent en évidence une tendance très nette des méthodes commerciales à sur-évaluer la glycémie. En outre, la dispersion des résultats est beaucoup plus forte dans le cas du CNQ de l'AFSSAPS.

En France, le fait que les valeurs fournies par les méthodes commerciales soient dans l'ensemble très proches de celles fournies par la méthode de référence soulève une question bien légitime : quelle est l'utilité de développer une méthode de référence dans un tel cas ? Une première réponse est qu'on ne peut pas préjuger de la performance des méthodes commerciales a priori, c'est-à-dire en l'absence d'un raccordement des mesures au SI et notamment par l'intermédiaire d'une méthode de référence ou d'un matériau de référence. Par ailleurs, un contrôle régulier est indispensable pour s'assurer que la qualité des résultats est garantie, en particulier lorsque les laboratoires de biologie médicale font évoluer leurs pratiques : renouvellement des analyseurs, changement de méthode pour des raisons de coût ou de temps d'analyse, etc...

La dispersion des résultats et l'homogénéité de ceux-ci selon la méthode utilisée sont deux éléments qui donnent néanmoins une indication sur l'existence d'éventuels problèmes de justesse. C'est notamment le cas pour la mesure de la créatinine. Les dernières opérations du CNQ ont en

effet mis en évidence une très forte dispersion des résultats ainsi qu'un effet méthode très net, en particulier aux concentrations les plus basses. Dans ce cas, l'apport d'une méthode de référence est plus évident que dans le cas du glucose. Malheureusement, il existe bien d'autres analytes que la créatinine pour lesquels une dispersion importante des données est constatée ou pour lesquels le résultat dépend fortement de la méthode employée.

Le défi que doit désormais relever le LNE consiste à identifier les analytes présentant un intérêt élevé en biologie clinique et pour lesquels un apport métrologique constitue une réelle valeur ajoutée. Le LNE s'est donc engagé dans une politique volontariste basée sur des échanges étroits avec les experts médicaux et les autorités de santé publique pour identifier les besoins actuels et émergents en biologie clinique et auxquels le LNE pourrait apporter une réponse.

Dans un premier temps, et pour des raisons techniques, les analytes sélectionnés concerneront de petites molécules comme la créatinine ou le cholestérol. A ce titre, avoir développé une méthode de référence pour le dosage du glucose sera très profitable car un certain nombre de problèmes rencontrés seront identiques (sur- ou sous- évaluation de l'analyte, interférences...).

Dans un deuxième temps, le développement de méthodes de référence concernera des biomarqueurs de nature protéique. A ce titre, une suite logique à cette thèse sera de développer une méthode de référence pour le dosage de l'HbA1c. Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique de ce manuscrit (Cf. page 46), l'HbA1c est le biomarqueur qui permet la meilleure surveillance de l'équilibre glycémique en complément de la glycémie classique. Ainsi, l'Assurance Maladie a fait de la généralisation de cet examen un objectif central de son programme de santé publique «diabète», ce qui explique que nombre d'actes pratiqués ait augmenté de 26% entre 2004 et 2007. Le dosage de l'HbA1c représentait en 2007 la quatrième source de dépense de la sécurité sociale parmi les analyses médicales avec 74 millions d'euros (5,4 millions d'actes pratiqués en 2007). La méthode de référence pour le dosage de l'HbA1c par HPLC/MS/MS a été développée au CHU de Reims et doit désormais être transférée au LNE, tout comme la méthode de dosage du glucose développée au LNE sera transférée au CHU de Reims.

## Références bibliographiques

1. MARCHAL N.  
La démarche qualité au laboratoire de biologie médicale.  
Arch Inst Pasteur Madagascar 1998 ; 64 (1-2) : 85-87.
2. LE MOEL G, PITON A, PONTEZIERE C, CLAISSE C, LAUREAUX C, MARIE B, et al.  
Assurance qualité : contrôle de qualité interne et évaluation externe de la qualité.  
Ann Biol Clin (Paris) 2000 ; 58 (1) : 103-110.
3. GBEA [Guide de bonne exécution des analyses] : arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale modifié par l'arrêté du 26 avril 2002 [consulté 09/2002].  
Préfecture de la région île de France, direction des affaires sanitaires et sociales, version n°2.  
Disponible à partir de URL :  
<http://ile-de-france.sante.gouv.fr/sante/gbea.pdf>
4. COFRAC, section santé humaine.  
Exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale : manuel d'accréditation [consulté 02/2010].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.cofrac.fr/fr/actus/biologie/LBM\\_fev\\_2010.pdf](http://www.cofrac.fr/fr/actus/biologie/LBM_fev_2010.pdf)
5. COFRAC.  
Règlement d'accréditation-Document LAB REF 05 [consulté 12/2009].  
Disponible à partir de URL :  
<http://www.cofrac.fr/doc/docs2/commun/lab%20ref%2005.pdf>
6. COFRAC.  
Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.  
NF EN ISO/CEI 17025 ; septembre 2005.
7. COFRAC.  
Exigences particulières concernant la qualité et la compétence.  
NF EN ISO 15189 ; août 2007.
8. PASCAL P, BEYERLE F,  
Les référentiels qualité applicables dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale.  
Pathol Biol 2006 ; 54(6) : 317-324.
9. BALLEREAU M.  
Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale, conseil général des établissements de santé [consulté 23/09/2008].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.fnsip.fr/IMG/pdf/Rapport\\_sur\\_la\\_biologie\\_medicale.pdf](http://www.fnsip.fr/IMG/pdf/Rapport_sur_la_biologie_medicale.pdf)
10. Dossier de presse, « Présentation du projet de loi "Hôpital, patients, santé et territoires", un projet de santé durable pour nos concitoyens » [consulté 22/10/2008].  
Disponible à partir de URL :  
<http://www.sante-jeunesse-sports.gouv.fr/IMG/pdf/Dossierdepresse.pdf>
11. LALANDE F, YENI I, LACONDE C (Inspection générale des affaires sociales).

La biologie médicale libérale en France: bilan et perspectives [consulté 04/2006].  
Disponible à partir de URL :  
[www.sante-jeunesse-sports.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_IGAS\\_2006.pdf](http://www.sante-jeunesse-sports.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_IGAS_2006.pdf).

12. Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports.  
Lettre de mission de Michel Ballereau [consulté 01/2008].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/lettre\\_de\\_mission\\_Michel\\_BALLEREAU.pdf](http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/lettre_de_mission_Michel_BALLEREAU.pdf)
13. Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports.  
Lettre de mission de Michel Ballereau [consulté 12/2008].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/Lettre\\_de\\_mission\\_ballereau2009.pdf](http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/Lettre_de_mission_ballereau2009.pdf)
14. DUMONTET M, FUSS-OHLEN I, BEAUDEUX JL, PERRIN A, VASSAULT A, GIROUD C, et al.  
Présentation, à l'usage des laboratoires d'analyses de biologie médicale, des normes de métrologie (Document A).  
Ann biol Clin 2004 ; 62 (1) : 121-125.
15. STUMPF C, LABARRAQUE G.  
La dilution isotopique par ICP/MS : une méthode de référence pour l'analyse d'éléments traces.  
Spectra analyse 2003 ; 32 (234) : 14-18.
16. [www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/](http://www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/).
17. CHARLET P, HERVOUET G,  
Nouvelles demandes en matériaux de référence certifiés : cas de secteurs émergents, environnement, biologie et autres.  
Actes du 11e congrès international de métrologie 2003.  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.lne.fr/publications/actes\\_11e\\_congres\\_metrologie/183.pdf](http://www.lne.fr/publications/actes_11e_congres_metrologie/183.pdf)
18. RIVIER C, STUMPF C, LABARRAQUE G, HERVOUET G, DESENFANT M, PRIEL M et al.  
Matériaux de référence et essais d'aptitude : deux outils au service de la qualité des analyses.  
Spectra analyse 2005 ; 246 : 33-35.
19. [www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/](http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/).
20. KUSNIK-JOINVILLE O, WEILL A, SALANAVE B, RICORDEAU P, ALLEMAND H.  
Prevalence and treatment of diabetes in France : Trends between 2000 and 2005.  
Diabetes and Metabolism 2008 ; 34 (3) : 266-272.
21. OMS (organisation mondiale de la santé).  
Diabète sucré : aide mémoire n°138 [consulté 04/2002].  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/fr/index.html>
22. CHEVENNE D, TRIVIN F.

- Diabetes mellitus : proposal of new diagnostic and classification criteria.  
Ann Biol Clin 1998 ; 56 (4) : 463-70.
23. EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS.  
Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.  
Diabetes Care 2003 ; 26 (Suppl 1) : 5-20.
  24. NATIONAL DIABETES DATA GROUP.  
Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance.  
Diabetes 1979 ; 28 (12) : 1039-57.
  25. WHO STUDY GROUP.  
Diabetes mellitus : report of a WHO Study Group.  
World Health Organ Tech Rep Ser 1985 ; 727: 1-113.
  26. ENGELGAU MM, THOMPSON TJ, HERMAN WH, BOYLE JP, AUBERT RE, KENNY SJ, et al.  
Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes : diagnostic criteria and performance revisited.  
Diabetes Care 1997 ; 20 (5) : 785-91.
  27. MC CANCE DR, HANSON R, CHARLES MA, JACOBSSON LTH, PETTITT DJ, BENNETT PH, KNOWLER WC, et al,  
Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes.  
Br med j 1994 ; 308 (6940) : 1323-1328.
  28. FINCH CF, ZIMMET PZ, ALBERTI KG.  
Determining diabetes prevalence: a rational basis for the use of fasting plasma glucose concentrations ?  
Diabet Med 1990 ; 7 (7) : 603-610.
  29. CHARLES MA, SIMON D, BALKAU B, ESCHWEGE E.  
Révision des critères diagnostiques du diabète;  
Diabete Metab 1996 ; 24 : 75-79.
  30. CHARLES MA, BALKAU B, VAUZELLE-KERVROEDAN F, THIBULT N, ESCHWEGE E, et al.  
Revision of diagnostic criteria for diabetes.  
Lancet 1996 ; 348 (9042) : 1657-1658.
  31. GRIMALDI A.  
Diabétologie.  
Questions d'internat - Université Paris VI ; 1999-2000.  
Disponible à partir de URL :  
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/diabeto.pdf>
  32. MARSHALL WJ, BANGERT SK.  
Biochimie médicale : physiopathologie et diagnostic.  
Paris : Elsevier Campus Reference ; 2005.

33. SABLONNIERE B.  
Biochimie et biologie moléculaire.  
Paris : Editions omniscience ; 2006.
34. MAQUART FX, BOREL JP, GILLERY P.  
Précis de biochimie et biologie moléculaire : de la biologie à la clinique.  
Paris : Editions Frison-roche ; 2006.
35. MONSIGNY M.  
Les glycoconjugués : signaux de reconnaissance.  
Biofutur 1993 ; 125 : 20-24.
36. MURRAYR K, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW.  
Biochimie. 24ème édition.  
New york : Edition Harper ; 1999.
37. HENNEN G.  
Biochimie Humaine.  
Bruxelles : Edition De Boeck Université ; 1996.
38. HIGGINS P J, BUNN HF.  
Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin.  
J Biol Chem 1981 ; 256 (10) : 5204-5208.
39. STEVENS VJ, VLASSARA H, ABATI A, CERAMI A, et al.  
Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin.  
J Biol Chem 1977 ; 252 (9) : 2998-3002.
40. BUNN HF, HIGGINS PJ,  
Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance.  
Science 1981 ; 213 (4504) : 222-224.
41. TRIVIN F, CHEVENNE D, HAUTECOUVERTURE M.  
Produits de Maillard et complications chroniques du diabète sucré.  
Ann Biol Clin 1999 ; 57 (4) : 445-454.
42. BOBBINK IW, DE BOER HC, TEKELUNBERG WL, BANGA JD, DE GROOT PG, et al.  
Effect of extracellular matrix glycation on endothelial cell adhesion and spreading:  
involvement of vitronectin.  
Diabetes 1997 ; 46 (1) : 87-93.
43. NIWA T, KATSUZAKI T, MIYAZAKI T, ISHIZAKI Y, HAYASE F, TATEMICHIN,  
TAKEI Y, et al.  
Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in  
kidneys and aortas of diabetic patients;  
J Clin Invest 1997 ; 99 (6) : 1272-1280.
44. SINGH R, BARDEN A, MORI T, BEILIN L.  
Advanced glycation end-products: a review.  
Diabetologia 2001 ; 44 (2) : 129-146.

45. GILLERY P.  
Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré.  
*Ann Biol Clin* 2006 ; 64 (4) : 309-314.
46. GILLERY P, MONBOISSE JC, MAQUART FX, BOREL JP, et al.  
Glycation of proteins as a source of superoxide.  
*Diabete Metab* 1988 ; 14 (1) : 25-30.
47. JIANG ZY, WOOLLARD AC, WOLFF SP.  
Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation,  
*FEBS Lett* 1990 ; 268 (1) : 69-71.
48. WOLFF SP, DEAN RT.  
Glucose autoxidation and protein modification : the potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes.  
*Biochem J* 1987 ; 245 (1) : 243-50.
49. KISLINGER T, FU C, HUBER B, QU W, TAGUSHI A, DU YAN S, et al.  
Nε-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signalling pathways and modulate gene expression,  
*J Biol Chem* 1999 ; 97 : 889-901.
50. GILLERY P.  
Produits avancés de glycation (AGE), radicaux libres et diabète.  
*J Soc Biol* 2001 ; 195 : 387-390.
51. GILLERY P, VASSAULT A.  
Cahier de formation-Biologie médicale.  
*Bioforma* juin 1997 ; n°8.
52. REINAUER H.  
Biochemistry of protein glycation in diabetes mellitus.  
*Klin Lab* 1993 ; 39 : 984-987.
53. HAUTE AUTORITE DE SANTE (HAS).  
Guide affection de longue durée : la prise en charge de votre maladie, le diabète de type 1 [consulté 05/2006].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c\\_419399](http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_419399)
54. AFSSAPS.  
Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (actualisation) [consulté 11/2006].  
Disponible à partir de URL :  
[http://www.afssaps.fr/var/afssaps\\_site/storage/original/application/0fa2b1390ceaa2ff2f713ebc1b166116.pdf](http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/0fa2b1390ceaa2ff2f713ebc1b166116.pdf)
55. KANTER JE, AVERILL MM, LEOEUF RC, BORNFEDT KE, et al.  
Diabetes-accelerated atherosclerosis and inflammation.  
*Circ Res* 2008 ; 103 (8) : 116-117.

56. BOOTH GL, KAPRAL MK, FUNG K, TU JV, et al.  
Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study.  
Lancet 2006 ; 368 (9529) : 29-36.
57. COUTINHO M, GERSTEIN HC, WANG Y, YUSUE S, et al.  
The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 year.  
Diabetes Care 1999 ; 22 (2) : 233-240.
58. GRUNDY SM, BENJAMIN IJ, BURKE GL, CHAIT A, ECKEL RH, HOWARD BV, et al.  
Diabetes and cardiovascular disease : a statement for healthcare professionals from the American Heart Association.  
Circulation 1999 ; 100 (10) : 1134-1146.
59. HU FB, STAMPFER MJ, SOLOMON CG, LIU S, WILLETT WC, SPEIZER FE, et al.  
The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women : 20 years of follow-up.  
Arch Intern Med 2001 ; 161 (14) : 1717-1723.
60. MACDONALD E, LEE WK, HEPBURN S, BELL J, SCOTT PJW, DOMINICZAK MH.  
Advanced glycosylation end products in the mesenteric artery.  
Clin Chem 1992 ; 38 (4) : 530-533.
61. SHINOHARA M, THORNALLEY PJ, GIARDINO I, BEISSWENGER P, THORPE SR, ONORATO J, et al.  
Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis.  
J Clin Invest 1998 ; 101 (5) : 1142-1147.
62. MAKITA Z, RADOFF S, RAYFIELD EJ, ZHI Y, SKOLNIK E, DELANEY V, FRIEDMAN EA, CERAMI A, VLASSARA H, et al.  
Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy.  
N Engl J Med 1991 ; 325 (12) : 836-842.
63. REQUENA JR, AHMED MU, FOUNTAIN CW, DEGENHARDT TP, REDDY S, PEREZ C, et al.  
Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the maillard reaction in vivo.  
J Biol Chem 1997 ; 272 (28) : 17473-17479.
64. SUGIMOTO K, NISHIZAWA Y, HORIUSHI S, YAGIHASHI S.  
Localization in human diabetic peripheral nerve of N $\epsilon$ -carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct.  
Diabetologia 1997 ; 40 : 1380-1387.
65. PEREZ URQUIZA M, MITANI Y, NAVA JAIMES HO.  
Proficiency tests to evaluate commercially available IVD kits for glucose and cholesterol measurements.  
Accred Qual Assur 2009 ; 14 (5) : 269-271.

66. COFRAC  
Mesurage des grandeurs dans des échantillons d'origine biologique - Traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux agents d'étalonnage et aux matériaux de contrôle.  
Norme NF EN ISO 17511 ; janvier 2004.
67. NEESE JW, DUNCAN P, BAYSE DD, ROBINSON M, COOPER T, STEWART C.  
Development and evaluation of a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose reference method.  
HEW Publication, USPHS, (CDC) Centers for Disease Control and Prevention 1976 ; n°77-8330.
68. WHITE E, WELCH MJ, SUN T, SNIEGOSKI LT, SCHAFTER R, HERTZ HS, et al.  
The accurate determination of serum glucose by isotope dilution mass spectrometry--two methods.  
Biomed Mass Spectrom 1982 ; 9 (9) : 395-405.
69. STOCKL D, REINAUER H.  
Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup.  
Clin Chem 1993 ; 39 (6) : 993-1000.
70. THIENPONT LM, DE LEENHEER AP, STÖCKL D, REINAUER H.  
Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer;  
Clin Chem 1993 ; 39 (6) : 1001-1006.
71. THIENPONT LM, VAN NIEUWENHOVE B, STÖCKL D, REINAUER H, DE LEENHEER AP.  
Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European Reference Laboratories.  
Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996 ; 34 (10) : 853-860.
72. MAGNI F, PARONI R, BONINI P, KIENLE MG, STOCKL D, THIENPONT LM.  
Determination of serum glucose concentration by a candidate definitive method.  
Clin Chem 1994 ; 40 (10) : 1978-1980.
73. HANNESTAD U, LUNDBLAD A.  
Accurate and precise isotope dilution mass spectrometry method for determining glucose in whole blood.  
Clin Chem 1997 ; 43 (5) : 794-800.
74. PhD DORE D.  
Biochimie clinique.  
Sainte-Foy : Editions Le griffon d'argile ; 1994.
75. VALDIGUIE P.  
Biochimie clinique. 2<sup>ème</sup> édition.  
Cachan : Editions EM inter ; 2000.
76. KAMOUN P, FREJAVILLE JP.  
Guides des examens de laboratopire.  
Paris : Médecine sciences, Flammarion ; 2002.

77. SIEST G, HENRY J, SCHIELE F.  
Références en biologie clinique.  
New York : Elsevier collection option Bio ; 1990.
78. SHAFATI A, CLARK BJ.  
Evaluation of acetonitrile deproteinisation of the serum samples for the analysis of drugs in serum using capillary zone electrophoresis.  
Iranian J Pharm Res 2002 ; 1 : 43-46.
79. DE BIEVRE P, GÜNDZLER H.  
Traceability in chemical measurement.  
New York : Edition Springer ; 2005.
80. AFNOR.  
Analyse des produits alimentaires et agricoles : terminologie.  
FD V 01-000 [consulté 12/1999].
81. FEINBERG M.  
La validation des méthodes d'analyse.  
Sciences de l'ingénieur, Masson ; 1997.
82. AFNOR.  
Essais des eaux - Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.  
Norme XP T 90-210\_1.9 [consulté 12/1999].
83. JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology).  
Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM), n°200 [consulté 2008].  
Disponible à partir URL:  
[http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2008.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2008.pdf)
84. JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology).  
Évaluation des données de mesure — Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM), n°100 [consulté 2008].  
Disponible à partir URL:  
[http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf)
85. OMS (organisation mondiale de la santé).  
Diabète : aide mémoire n°312 [consulté 11/2009].  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>
86. AFSSAPS.  
Choisir un lecteur de glycémie en milieu hospitalier.  
Disponible à partir de URL :  
<http://www.afssaps.fr/content/download/5864/57177/version/2/file/glycemie.pdf>
87. IUPAC  
Recommandations  $L_D$ - $L_Q$  ; 1995 : 24 pages.



# **ANNEXES**

# Annexe 1



National Institute of Standards & Technology

## Certificate of Analysis

Standard Reference Material<sup>®</sup> 965a

Glucose in Frozen Human Serum

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating the accuracy of procedures for the determination of glucose in human serum. It is also intended for use in validating working or secondary reference materials. Because it is made from pools of human serum that have been modified to achieve the target concentrations, this material may not be commutable for all routine glucose measurement procedures. However, NIST is unaware of any commutability problems with the previous lot of this frozen serum material. A unit of SRM 965a consists of eight flame sealed ampoules of frozen human serum, two ampoules at each of four different glucose concentration levels. Each ampoule contains  $2.00 \pm 0.04$  mL of human serum.

**Certified Concentration Values:** The certified concentrations of glucose were determined using the NIST definitive method for glucose [1,2]. The concentrations and their uncertainties, expressed in both mmol/L and mg/dL, for the four concentration levels are listed in Table 1. The certified concentrations apply only to serum thawed to room temperature, 20 °C to 25 °C; see "Instructions for Use".

Table 1. Certified Concentrations and Uncertainties for Glucose

Concentration Levels	mmol/L	mg/dL
Level 1	1.918 ± 0.020	34.56 ± 0.36
Level 2	4.357 ± 0.048	78.50 ± 0.86
Level 3	6.777 ± 0.073	122.1 ± 1.3
Level 4	16.24 ± 0.19	292.6 ± 3.5

The uncertainties in the certified values are calculated as  $U = ku_c$ , where  $u_c$  is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO and NIST Guides [3], and  $k$  is a coverage factor. The values of  $u_c$  are intended to represent, at the level of one standard deviation, the uncertainties in mean concentration. The expanded uncertainty,  $U = ku_c$ , is defined as an interval estimated to have a level of confidence of at least 95 %. The effective degrees of freedom ( $\nu_{\text{eff}}$ ) are very large for each of the four levels, thus,  $k = 2$ .

**Expiration of Certification:** The certification of SRM 965a is valid, within the measurement uncertainty specified, until **31 December 2009**, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate (see "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

**Maintenance of SRM Certification:** NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

The analytical measurements were performed by L.T. Sniegoski and M.J. Welch of the NIST Analytical Chemistry Division.

The overall direction and coordination of the technical activities were under the chairmanship of M.J. Welch of the NIST Analytical Chemistry Division.

Stephen A Wise, Chief  
Analytical Chemistry Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 29 September 2008  
See Certificate Revision History on Last Page

Robert L. Watters, Jr., Chief  
Measurement Services Division

Design of the sampling protocol and statistical analysis of the data were performed by N.F. Zhang of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

#### NOTICE AND WARNINGS TO USERS

SRM 965a IS INTENDED FOR IN-VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY. THIS IS A HUMAN SOURCE MATERIAL. HANDLE PRODUCT AS A BIOHAZARDOUS MATERIAL CAPABLE OF TRANSMITTING INFECTIOUS DISEASE. The supplier of this serum has reported that each donor unit of serum or plasma used in the preparation of this product has been tested by an FDA approved method and found non-reactive/negative for HbsAg, HIV-1 & 2 antibodies, HCV and syphilis. However, no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus, hepatitis C virus, HIV, or other infectious agents are absent from this material. Accordingly, this human blood-based product should be handled at the Biosafety Level 2 or higher as recommended for any POTENTIALLY INFECTIOUS HUMAN SERUM OR BLOOD SPECIMEN in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual [4].

**Storage:** The serum is shipped frozen (on dry ice) and, upon receipt, should be stored frozen until ready for use. A freezer temperature of -20 °C is acceptable for storage up to one week. If a longer storage time is anticipated, the material should be stored at or below -50 °C. The SRM should **NOT** be exposed to sunlight or ultraviolet radiation. Storage of thawed material at room or refrigerator temperatures may result in changes in glucose concentrations.

**Stability:** The material is kept at -80 °C for long term storage at NIST. Under these conditions, the glucose is expected to be stable. NIST will continue to monitor the stability of glucose in this material and will notify purchasers of the material of any changes in the certified concentrations. Registration, see attached sheet, will facilitate notification.

#### INSTRUCTIONS FOR USE

Ampoules of the SRM to be analyzed should be removed from the freezer and allowed to stand at room temperature (20 °C to 25 °C) until thawed. After the material is thawed, it should be used immediately. The material should be swirled gently to mix it before aliquots are withdrawn.

#### SOURCE, PREPARATION, AND ANALYSIS<sup>1</sup>

SRM 965a was prepared by Euro-trol b.v., Wageningen, The Netherlands. The material was prepared from normal human serum and its appearance is a clear amber solution free of particulate matter. Donor units were collected and allowed to clot for a minimum of 2 h at room temperature using no additives to assist in the clot process. The serum pool was frozen at -20 °C, thawed, and filtered through an Avicel Cellulose slurry under vacuum to remove fibrin. Gentamicin sulfate was added as an antibacterial agent. The appropriate amounts of dextrose monohydrate were added to the four subpools to adjust the concentrations of glucose to the desired levels. The pH of each subpool was adjusted to 7.5 at 37 °C and filtered through a pre-sterilized 0.22 µm filter. Finally, 2.0 mL aliquots of each subpool were dispensed into 4.5 mL Duran glass ampoules, flame-sealed, and stored at -50 °C.

**Analytical Methods:** For the certification of this SRM, the method used was isotope dilution/gas chromatography/mass spectrometry (ID/GC/MS) and involves converting glucose into a dibutylboronate acetate derivative. The method is considered to be a *definitive* method [1] for serum glucose by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [2] and is an approved higher order reference measurement procedure according to the Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) [5].

**Homogeneity Analysis:** The homogeneity assessment was made at the time the certification analyses were performed. A stratified sampling plan was devised to test for homogeneity across the manufacturing process. The results indicated that there was no apparent trend in the data when plotted against the sequence in which the ampoules were prepared.

---

<sup>1</sup>Certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

## REFERENCES

- [1] *Development of Definitive Methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, Approved Guideline*, NCCLS Publication NRSL 1-A; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA (1991).
- [2] White V.E.; Welch, M.J.; Sun, T.; Sniegoski, L.T.; Schaffer, R.; Hertz, H.S.; Cohen, A.; *The Accurate Determination of Serum Glucose by Isotope Dilution Mass Spectrometry - Two Methods*; Biomed. Mass Spectrom.; Vol. 9, pp. 395-405 (1982).
- [3] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; ISBN 92-67-10188-9, 1st ed.; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [4] *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*; U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1988).
- [5] *Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine*; <http://www.bipm.fr/en/committees/jc/jc1m/> (accessed 20 January 2004).

**Certificate Revision History:** 29 September 2008 (Extension of certification period); 20 February 2004 (Original certificate date).

*Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail [srminfo@nist.gov](mailto:srminfo@nist.gov); or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.*

## Annexe 2 : Procédure de vérification de la linéarité

Pour vérifier la linéarité dans les meilleures conditions, il faudra :

Sélectionner au mieux  $p$  niveaux (points) situés dans le domaine d'application de la méthode.

Pour chaque niveau, réaliser  $n$  répétitions en respectant l'indépendance des mesures.

A partir des résultats expérimentaux et du modèle supposé *a priori* (droite), appliquer la méthode des moindres carrés ordinaires (MCO) à l'aide d'un logiciel (Excel propose "droite de régression" dans l'utilitaire d'analyse). On obtient les estimations de la pente ( $b_1$ ) et de l'ordonnée à l'origine ( $b_0$ ) qui donnent le modèle suivant :

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x$$

Premières dispositions pour vérifier la linéarité :

Analyser visuellement le graphique : si une courbure du graphe est observée, il faudra limiter le domaine d'application de la méthode au domaine de linéarité.

Analyser le graphe des résidus<sup>1</sup> (écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs modélisées) qui permet de détecter, par la répartition non aléatoire des points, un modèle autre que la droite (polynôme de degré 2...).

Application d'un test statistique : test d'adéquation du modèle linéaire

Le principe du test consiste à vérifier si la part de la variance due à une erreur de modèle (dispersion due à la non-linéarité) n'est pas supérieure à la variance de l'erreur expérimentale. Pour appliquer ce test, il est indispensable d'avoir fait des répétitions indépendantes en certains points du domaine.

---

<sup>1</sup> Excel (utilitaire d'analyse : droite de régression) construit le graphe des résidus et affiche aussi les valeurs dans un tableau.

Pour simplifier la formule suivante, on suppose le nombre de répétitions constant et égal à  $n$  pour les  $p$  niveaux.

Le modèle est celui de l'équation suivante :

$$\hat{y}_{ij} = b_0 + b_1 x_i$$

où

$i$  représente le niveau sur le domaine à vérifier ( $1 \leq i \leq p$ )

$j$  représente le numéro de la répétition ( $1 \leq j \leq n$ )

$b_0$  ordonnée à l'origine estimée

$b_1$  pente estimée

Pour le calcul de la linéarité on décompose la somme des carrés des écarts entre chaque valeur mesurée  $y_{ij}$  et la moyenne générale  $\bar{y}$  en une somme de carrés d'écarts. On obtient l'égalité suivante :

$$\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_i \sum_j (\hat{y}_{ij} - \bar{y})^2 + \sum_i \sum_j (\bar{y}_i - \hat{y}_{ij})^2 + \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad 1 \leq i \leq p$$

$$\sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^p (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^p (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + n \sum_{i=1}^p (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 + n \sum_{i=1}^p (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

où :

$\hat{y}_{ij}$  est la réponse prédite par le modèle

$\bar{y}_i$  est la moyenne des  $n$  répétitions

La formule précédente s'exprime selon des "sommes des carrés des écarts" (SCE) :

$$\mathbf{SCE}(\mathbf{y}) = \mathbf{SCE}_l(\mathbf{y}) + \mathbf{SCE}_{nl}(\mathbf{y}) + \mathbf{SCE}_e(\mathbf{y})$$

c'est à dire :

$$SCE_{\text{totaux}} = SCE_{\text{expliqués}} + SCE_{\text{non-linéarité}} + SCE_{\text{résiduels}}$$

$\mathbf{SCE}_l(\mathbf{y})$  représente la somme de carrés des écarts pris en compte par la régression linéaire

$SCE_{nl}(y)$  représente la somme des carrés des écarts dus à une erreur de modèle, en l'occurrence une non-linéarité.

Pour les degrés de liberté associés à chaque somme de carrés, on a

$$(np - 1) = 1 + (p - 2) + p(n - 1)$$

**Tableau du test de linéarité :**

Sources de variation	Somme de carrés d'écarts	Nombre de degrés de liberté	Carré moyen	F de Fisher (rapport de variance)
Régression linéaire	$SCE_l(y)$	1	$\frac{SCE_l(y)}{1}$	$F_l = \frac{s_l^2(y)}{s_e^2(y)}$
Erreur de modèle (non-linéarité)	$SCE_{nl}(y)$	$p-2$	$\frac{SCE_{nl}(y)}{p-2}$	$F_{nl} = \frac{s_{nl}^2(y)}{s_e^2(y)}$
Résiduelle	$SCE_e(y)$	$p(n-1)$	$\frac{SCE_e(y)}{p(n-1)}$	
Totale	$SCE(y)$	$np-1$		

Pour vérifier s'il n'y a pas d'erreur de modèle due à la non-linéarité et que c'est bien une droite dans tout le domaine choisi :

Comparer le rapport  $F_{nl}$  à la valeur critique  $F^2(p-2, p(n-1) ; 1-\alpha)$  au risque  $\alpha=5\%$

Si  $F_{nl} \leq F(p-2, p(n-1) ; 1-\alpha) \Rightarrow$  le domaine de linéarité choisi est acceptable .

Si  $F_{nl} > F(p-2, p(n-1) ; 1-\alpha) \Rightarrow$  le domaine choisi n'est pas linéaire.

Que faire lorsque la linéarité est rejetée ? :

Réduire le domaine pour assurer la linéarité

<sup>2</sup> Lire la valeur dans une table des fractiles de la loi F.

Segmenter le domaine pour avoir un ou des sous-domaines linéaires.

Garder le modèle non linéaire, mais introduire une incertitude due à la non-linéarité.

La quantification de cette incertitude peut se faire par exemple à partir du plus grand résidu moyen sur le domaine :  $E_{\max} = \max_i |\bar{y}_i - \hat{y}_i|$  et du choix d'une distribution uniforme qui se traduit par la

formule suivante :  $u_{\text{linéarité}} = \frac{E_{\max}}{\sqrt{3}}$