

ANNEE : 2019

THESE N° 05/18 CSVS

**UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**  
Centre d'études doctorales des Sciences de la vie et de la santé  
FORMATION DOCTORALE : BIOLOGIE MEDICALE, PATHOLOGIE HUMAINE  
ET EXPERIMENTALE ET ENVIRONNEMENT.

**THESE DE DOCTORAT**

**VALIDATION DES METHODES SELON LA NORME ISO 15189 :  
APPLICATION AUX METHODES DE L'ASSISTANCE MEDICALE  
A LA PROCREATION**

Présentée et soutenue publiquement le 10/01/2019

**Par**

**Dr. Siham ABOULMAKARIM**

**JURY**

**Professeur Badr Eddine LMIMOUNI**

Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V-Rabat

**Professeur Rachid BEZAD**

Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V-Rabat

**Professeur Hakima KABBAJ**

Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V-Rabat

**Professeur Souad ABOUDKHIL**

Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Université Hassan II.

**Professeur Leila BENCHAKROUN**

Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V-Rabat

**Professeur Houyam HARDIZI**

Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V-Rabat

**Président**

**Directeur de thèse**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Membre**

## Remerciements

*Avec l'aboutissement de mes travaux de thèse et leurs présentations, vient le temps de remercier tous ceux qui m'ont soutenu et aidé durant ces années de thèse.*

*Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury,*

*A mon Directeur de Thèse Monsieur le Professeur BEZAD Rachid*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes sincères remerciements pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour vos multiples conseils et pour toutes les heures que vous m'avez consacrées à diriger cette recherche, j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.*

*Monsieur le Professeur EL MIMOUNI Badr*

*Merci infiniment d'avoir accepté de présider ce jury malgré votre agenda chargé. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.*

*Madame le professeur KABBAJ Hakima*

*Merci pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, pour vos multiples conseils pour avoir initié, dirigé mon travail et mes réflexions, Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail.*

**Madame le professeur ABOUDKHIL Souad**

*Je vous remercie pour tout le soutien que vous m'avez apporté au cours de ce travail, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je suis très honoré que vous ayez bien voulu apporter à ce travail votre expertise. Merci de prendre le temps de venir à Rabat pour participer à mon jury. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance.*

**Madame le professeur BENCHAKROUN Leila**

*Je vous remercie pour tout le soutien que vous m'avez apporté au cours de ce travail. Pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail. Veuillez croire, professeur, à l'assurance de mon respect et ma grande reconnaissance.*

**Madame le professeur HARDIZI Houyam,**

*Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je suis très honoré. Veuillez accepter mes sincères remerciements.*

**Je remercie le directeur du Centre d'Etudes Doctorales des sciences de la vie et de la santé,**

**Monsieur le Professeur JAMAL TOUFIK**

*Merci de m'avoir accueilli au sein de votre école doctorale et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans de bonnes conditions. Je serais toujours admirative de votre rigueur scientifique, de votre créativité, de votre efficacité et de votre amour pour cette école.*

*J'en profite pour remercier mes collègues et amis chercheurs, notamment Docteur BENBELLA Amal, ZAIDOUNI Asmaa ainsi que toute l'équipe du Centre de Procréation Médicalement Assistée : Rachida, Halima et Hasnaa.*

*Finalement, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

## **Dédicaces**

***A** ma grande et petite familles, surtout mes **chers parents**, qui ont fait plus que tout autre, preuve d'une patience et d'une confiance exemplaire durant tout mon parcours d'études universitaires et professionnel.*

***Table des matières***

<b>Remerciements</b> .....	2
<b>Dédicaces</b> .....	4
<b>Table des matières</b> .....	5
<b>Résumé</b> .....	13
<b>Abstract</b> .....	14
<b>ملخص</b> .....	15
<b>Liste des abréviations</b> .....	16
<b>Liste des figures</b> .....	19
<b>Liste des tableaux</b> .....	20
<b>Liste des photos</b> .....	22
<b>Introduction générale</b> .....	23
<b>Objectifs</b> .....	25
<b>Première partie : Revue Bibliographique</b> .....	27
1. L'assistance médicale à la procréation AMP .....	28
1.1. Définition .....	28
1.2. Les techniques d'assistance médicale à la procréation.....	28
1.2.1. L'insémination intra- utérine .....	28
1.2.2. La fécondation in vitro classique ou avec micro-injection du spermatozoïde.....	29
1.3. Le cadre juridique de l'assistance médicale à la procréation au Maroc .....	34
2. Le laboratoire d'assistance médicale à la procréation du Centre de Santé Reproductrice.....	36
3. Assurance qualité, certification et accréditation des laboratoires de biologie médicale...42	
3.1. Le système assurance qualité aux laboratoires de biologie médicale.....	42
3.2. Certification et accréditation des laboratoires de biologie médicale.....	46
3.3. Les organismes accréditeurs .....	47

3.4. Place de la validation des méthodes dans la politique qualité d'un laboratoire de biologie médicale. ....	48
4. Les standards nationaux et internationaux au laboratoire de biologie médicale .....	49
4.1. Les référentiels obligatoires .....	49
4.1.1. Le guide de bonne exécution des analyses .....	49
4.2. Les référentiels choisis dans le cadre d'une démarche volontaire de validation des méthodes .....	50
4.2.1. Les normes de l'International Organization for Standardization.....	50
4.2.2. Les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute.....	53
4.2.3. Les normes du Comité Européen de Normalisation.....	53
4.2.4. Les publications de l'Organisation Mondiale de la Santé.....	53
5. Le choix de la norme ISO 15189 selon la méthode COFRAC pour la validation des méthodes en assistance médicale à la procréation .....	54
6. Exigences de la norme NF EN ISO 15189 en matière de validation/ vérification des méthodes de biologie médicale.....	56
7. Procédure de validation / vérification des méthodes en biologie médicale. ....	58
7.1. Contenu d'un dossier validation / vérification des méthodes .....	59
7.2. Spécification et expression de la portée d'accréditation.....	59
7.3. Choix de la portée A ou B.....	60
7.4. Choix du type de flexibilité.....	61
7.5. Choix de la nature de la méthode à valider .....	62
7.6. La description de la méthode .....	62
7.7. La définition des critères de performances à évaluer .....	62
7.8. La vérification bibliographique .....	65
7.9. La vérification expérimentale.....	65
7.9.1. La vérification expérimentale des performances d'une méthode quantitative d'assistance médicale à la procréation .....	65

7.9.2. La vérification expérimentale des performances d'une méthode qualitative d'assistance médicale à la procréation .....	71
7-9-2-1- L'analyse des risques et les composantes d'incertitudes .....	71
7-9-2-2- Définition des indicateurs de performances.....	78
7-10- Conclusion.....	78
8. La confirmation des performances en routine .....	78
8.1. Suivi des performances des méthodes quantitatives d'assistance médicale à la procréation . .....	78
8.1.1. La gestion des contrôles qualité en spermologie .....	78
8.1.2. Les différents types d'échantillons de contrôle de qualité en spermologie.....	79
8.1.3. Choix des niveaux de concentrations et des fréquences de contrôles.....	80
8.1.4. Exploitation des contrôles qualité .....	80
8.2. Suivi des performances d'une méthode qualitative d'assistance médicale à la procréation .....	80
<b>Deuxième partie : Vérification des performances de la méthode qualitative d'AMP</b>	
<b>« Identification morphologique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon » .....</b>	<b>81</b>
1. Objectifs .....	82
2. Méthodologie .....	82
2.1. Identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon .....	82
2.1.1. Matériel.....	82
2.1.2. Méthodes .....	83
2.2. Validation de la méthode .....	84
2.2.1. Référentiels de la validation de notre méthode.....	84
2.2.2. Détermination de la portée d'accréditation et du type de flexibilité.....	85
2.2.3. Détermination de nos critères de performance .....	85
2.2.4. La maîtrise des risques .....	86
2.2.5. Evaluation de la criticité des équipements au niveau du laboratoire d'assistance médicale à la procréation .....	87



2.2.6. Détermination du niveau de criticité des équipements du laboratoire d'assistance médicale à la procréation à la grandeur température .....	87
2.2.7. Détermination des écarts maximaux tolérés à la grandeur température.....	88
2.2.8. Evaluation des pratiques professionnelles.....	88
3. Résultats .....	90
3.1. Description de la méthode suivant le formulaire SH-FORM-44 du COFRAC .....	90
3.2. Portée d'accréditation et type de flexibilité .....	90
3.3. Détermination de la nature de la méthode .....	91
3.4. Identification des processus et sous-processus liés à l'activité analytique .....	91
3.5. Résultats des critères de performance.....	93
3.6. Résultats de la maîtrise des risques selon la méthode 5M.....	93
3.6.1. 5 M : Matière .....	97
3.6.2. 5 M : Milieu .....	97
3.6.3. 5M : Méthodes.....	97
3.6.4. 5M : Matériel .....	97
3.6.4.1. Résultats de l'évaluation de la criticité des équipements au niveau du laboratoire AMP.....	100
3.6.4.2. Résultats de la gestion des consommables et des milieux de culture .....	101
3.6.5. 5M : Main-d'œuvre .....	101
3.6.5.1. Résultats de notre processus de vérification et maintien de la compétence	101
3.6.5.2. Résultats de l'évaluation des performances et des pratiques professionnelles.....	102
3.7. La politique métrologie au sein du laboratoire AMP .....	103
3.7.1. Résultats de la détermination des besoins et exigences métrologiques du laboratoire AMP .....	103
3.7.2. La grandeur température.....	104
3.7.2.1. Résultats de la détermination du niveau de criticité des équipements du laboratoire d'assistance médicale à la procréation à la grandeur température.....	104

3.7.2.2. Résultats de la détermination des écarts maximaux tolérés de la grandeur température. ....	105
3.7.2.3. Définition des modalités de raccordement métrologique des équipements du laboratoire AMP.....	106
3.7.2.4. Le suivi métrologique de la grandeur température en interne.....	107
3.7.3. L'environnement gazeux à l'intérieur des incubateurs à CO2 .....	107
3.7.4. Autres grandeurs .....	107
a. Volume.....	107
b. Optique.....	108
3.8. Evaluations internes et externes de la qualité - organisation et gestion des contrôles qualités.....	108
3.9. Estimation des incertitudes de mesure.....	108
3.10. Comparaisons inter-laboratoires.....	108
4. Discussion.....	109
<b>Troisième partie : Validation de la méthode quantitative « concentration des spermatozoïdes » du processus spermogramme.....</b>	<b>115</b>
1. Introduction .....	116
2. Méthodologie .....	116
2.1. Matériel.....	116
2.2. Méthodes.....	117
2.3. Validation de la méthode en portée B.....	117
2.3.1. Description du processus analytique .....	117
2.3.2. Description de la méthode .....	118
2.3.3. Définition de la portée d'accréditation, du type de flexibilité et de la nature de la méthode.....	119
2.3.4. Détermination des critères de performance à vérifier .....	119
2.3.5. Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier. ....	120
2.3.6. Choix des référentiels de la validation de notre méthode.....	120

2.4. Protocole expérimental et mise en œuvre au laboratoire d'assistance médicale à la procréation .....	120
2.4.1. La mise en place des contrôles qualité .....	120
2.4.1.1. La mise en place d'un contrôle interne de qualité fait maison.....	120
a. Préparation des échantillons de contrôle interne de qualité CIQ 1 et 2 .....	120
b. Préparation de l'échantillon CIQ 3 .....	121
c- Préparation de l'échantillon CIQ 4 .....	121
2.4.1.2. La mise en place d'un échange inter-laboratoire.....	121
2.4.2. Mise en œuvre du protocole expérimental .....	122
2.5. Méthodologie statistique .....	126
3. Résultats .....	128
3-1. La fidélité (precision) .....	128
3.1.1. Etude de la répétabilité (repeatability, within run precision) .....	128
3.1.2. Etude de la fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire (intermediate precision) .....	128
3.2. La variabilité inter-opérateurs .....	129
3.2.1. Le test ANOVA .....	129
3.2.2. Etude des coefficients de variabilité inter-opérateurs .....	129
3.3. La variabilité intra-opérateur.....	129
3.4. Exploitation graphique des résultats des contrôles internes de qualité.....	131
3.4.1. Le test de variance Bartlett .....	131
3.4.2. Construction de la carte de contrôle de la moyenne des moyennes $\bar{\bar{X}}$ .....	131
3.4.3. Construction de la carte de contrôle des écarts-types $\bar{S}$ .....	133
3.5. La justesse .....	134
3.6. L'étendue de mesure.....	134
3.7. L'incertitude de mesure .....	135
3.7.1. Résultats de la maîtrise des risques .....	135

3.7.2. Estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats d'analyses .....	138
3.8. La contamination inter-échantillons (carry-over).....	139
3.9. Les interférences.....	139
3.10. La spécificité/sensibilité analytique.....	139
3.11. La comparaison de méthode.....	139
3.11.1. Calcul des différences observées entre les deux techniques.....	139
3.11.2. Calcul des différences par la technique de Bland Altman.....	140
3.11.3. Calcul de la droite de régression .....	141
3.12. L'intervalle de référence .....	141
4. Discussion.....	142
<b>Quatrième partie : Discussion générale .....</b>	<b>148</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>153</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>156</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>175</b>

## **Résumé**

**Titre :** Validation des méthodes selon la norme ISO 15189: application aux méthodes de l'assistance médicale à la procréation.

**Auteur :** ABOULMAKARIM Siham

---

L'objectif de ce travail est de contribuer à répondre aux exigences de la norme ISO 15189:2012 en terme de vérification des performances de deux méthodes d'assistance médicale à la procréation (AMP) au niveau du laboratoire AMP du centre d'AMP du Centre de Santé Reproductrice du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina de Rabat.

La première méthode est l'identification morphologique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon dont la validation est basée sur une étude des risques aux trois étapes pré, per et post-analytiques et sur l'habilitation du personnel. Les résultats des indicateurs de performances sont comparables aux moyennes de références avec un taux de fécondation de 71,5%, un taux de clivage embryonnaire de 91,4%, 43% des embryons sont de meilleure qualité et notre taux de grossesse par transfert est de 25 %.

La deuxième méthode est la détermination de la concentration en spermatozoïdes, nous avons travaillé avec deux échantillons de sperme (CIQ) préparés in situ, CIQ1 qui a une concentration spermatique de  $43 \times 10^6$  spz/ml et CIQ2 qui couvre une valeur critique de  $11 \times 10^6$  spz/ml, quatre opérateurs ont procédé à la détermination de la concentration des spermatozoïdes selon deux protocoles différents.

L'étude de la performance de la méthode montre que notre méthode est reproductible pour les deux niveaux de concentrations spermatiques normal et faible avec respectivement des coefficients de variabilités (CV) de 6,72% et 8,7% et qui sont inférieurs aux données de la littérature (CV=13,4% pour Ricos et al 1999). Nos CV de répétabilité sont deux fois plus faibles que les valeurs Ricos pour la concentration normale (moyenne des CV de 10,6%) et faible (moyenne des CV de 15%), donc notre méthode est fidèle avec une bonne reproductibilité intra et inter-opérateurs.

**Mots clés:** Assistance médicale à la procréation, validation des méthodes, norme ISO 15189:2012, concentration des spermatozoïdes, contrôle qualité interne, management de la qualité, comparaison inter-laboratoire, outils statistiques, évaluation externe de la qualité.

## **Abstract**

**Title:** Method validation according to ISO 15189: application of assisted reproductive technology

**Author:** ABOULMAKARIM Siham

---

The objective of this work is to contribute to respect the requirements of ISO 15189:2012 in terms of performance verification of two techniques of medically assisted procreation (PMA), a manual qualitative technique of: morphological identification of the oocyte, the zygote and the embryo first and then the assessment of sperm concentration.

Due to the lack of internal quality control and external quality evaluation, risk control in the three pre-, post- and post-analytical stages becomes decisive, based on the 5M method.

As regards the assessment of sperm concentration, we establish a method for implementation and validation of internal quality controls samples laboratory-made and to use the control charts X bar, S bar and Bland-Altman plot for the graphical exploitation of the first results concerning the determination of the sperm concentration.

Four technicians having similar experiments in spermology determined the sperm concentrations of two semen specimen with low and normal concentrations at  $11 \times 10^6/\text{mL}$  and  $43 \times 10^6/\text{mL}$  using two methods.

Repeatability of our method was established by calculating the CV for the 20 repeats of each ejaculate; our repeatability CVs are 2 times lower than the Ricos values for normal concentration (CV mean of 10.6%) and low concentration (CV mean of 15%). Our method is reproducible for both normal and low sperm concentration levels with CVs of 6.72% and 8.7% respectively and which are lower than the data of the literature (CV=13.4% for Ricos et al 1999), we can conclude that our method is precise with good intra and inter-operator reproducibility.

Comparing our method to the reference method that uses the Neubauer cell proved to us that our method is comparable for spermatoc concentrations higher than 20M / ml, below this value, a control by the reference cell is recommended.

**Key words:** Assisted reproductive technology, validation of methods, retrospective assessment, ISO 15189:2012, sperm concentration, internal quality control, quality management, interlaboratory comparisons, statistical methods, external quality assessment.

## ملخص

**العنوان :** التحقق من صحة طرق التحليل حسب المواصفة **ISO 15189**: تطبيق لتقنيات المساعدة الطبية على الإنجاب

**اسم الباحث:** أبو المكارم سهام

تعد خدمات المختبرات الطبية ضرورية للتشخيص ولا يقتصر هدف المختبر الطبي على إصدار نتيجة فحص دقيقة بل أيضا إجراء الفحص المطلوب على المريض الصحيح ضمن فترة زمنية منطقية طبيياً باستخدام إجراءات مناسبة مع الالتزام بالمعايير الأخلاقية والسرية وسلامة المرضى. قامت المنظمة الدولية للمواصفات بتشكيل لجنة فنية سميت للجنة الفنية، التي أصدرت مواصفة سميت المواصفة ISO 15189 في عام 2012م مختصة بالمختبرات الطبية.

يهدف هذا العمل إلى الإجابة على المعايير الخاصة بالمواصفة ISO 15189 فيما يخص التحقق من كفاءة تقنيتين من تقنيات المساعدة الطبية على الإنجاب على مستوى مختبر المساعدة الطبية على الإنجاب التابع للمركز الوطني للصحة الإنجابية التابع للمستشفى الجامعي ابن سينا بالرباط لإثبات كفاءة المختبر الطبية في إصدار نتائج فحص دقيقة، موثوقة وضمن الوقت.

التقنية الأولى تخص التحديد المرفولوجي للبويضة، الخلية المخصبة والجنين، تظهر نتائجنا لمؤشرات الأداء أن معدل التخصيب هو 71%، معدل الإنقسام الجنيني 91,4% و 43% من الأجنة تعتبر ذات جودة عالية مع معدل حمل حوالي 25%.

التقنية الثانية هي تحديد تركيز الحيوانات المنوية وهي تقنية كمية حيث عملنا على عينتين من المنوي، الأولى ذات تركيز عادي  $43.10^6$  حيوان منوي في المليلتر والثانية ذات تركيز منخفض  $11.10^6$  حيوان منوي في المليلتر حيث قام أربع تقنيين بتحديد تركيز الحيوانات المنوية بإتباع بروتوكولان مختلفان.

دراسة مؤشرات الأداء أظهرت أن تقنيتنا قابلة للتكرار بالنسبة للعينتين مع نسبة اختلاف تبلغ 6,72% و 8,7% كما لاحظنا انخفاض نسبة الاختلاف مرتين أقل من نتائج (ريكوس، 1999) الذي اعتمده كمقياس بالنسبة لنسب التركيز العادية والمنخفضة من الحيوانات المنوية.

**الكلمات الأساسية:** المساعدة الطبية على الإنجاب، التحقق من صحة طرق التحليل، المواصفة **ISO 15189:2012**، تركيز الحيوانات المنوية، مراقبة الجودة الداخلية، إدارة الجودة، مقارنة بين المختبرات، أدوات إحصائية، تقييم خارجي للجودة.

## **Liste des abréviations**

<b>AMDEC</b>	: Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité
<b>AMP</b>	: Assistance Médicale à la Procréation
<b>BdR</b>	: Biologie de la Reproduction
<b>CE</b>	: Conformité Européenne
<b>CEN</b>	: Comité Européen de Normalisation
<b>CEQ</b>	: Contrôle Externe de Qualité
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalo-Universitaire
<b>CIH</b>	: Conférence International sur l'Harmonisation
<b>CIL</b>	: Comparaison Inter-Laboratoire
<b>CIQ</b>	: Contrôle Interne de Qualité
<b>CIQe</b>	: Contrôle Interne de Qualité externalisé
<b>C.N.Q</b>	: Contrôle National de Qualité
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de Carbone
<b>COFRAC</b>	: Comité Français d'Accréditation
<b>CQ</b>	: Contrôle Qualité
<b>CSR</b>	: Centre de Santé Reproductrice
<b>CV</b>	: Coefficient de Variation
<b>CV g</b>	: Variations Biologiques Inter-Individuelles
<b>CVi</b>	: Variations Biologiques Intra-Individuelles
<b>DM-DIV</b>	: Dispositif Médical de Diagnostic In Vitro
<b>DQSM</b>	: Direction de la Qualité et de la Surveillance du Marché
<b>EA</b>	: European Cooperation for Accreditation
<b>EEQ</b>	: Evaluation Externe de la Qualité
<b>EMT</b>	: Ecart Maximal Toléré
<b>EPP</b>	: Evaluation des Pratiques Professionnelles
<b>ESHRE</b>	: European Society of Human Reproduction and Embryology



<b>ET</b>	: Ecart-Type
<b>FI</b>	: Fidélité Intermédiaire
<b>FIV</b>	: Fécondation In Vitro
<b>FORM</b>	: Formulaires
<b>FSH</b>	: Follicle Stimulating Hormone
<b>GBEA</b>	: Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin-Releasing Hormone
<b>GTA</b>	: Guide Technique d'Accréditation
<b>hCG</b>	: hormone Chorionique Gonadotrope
<b>IAF</b>	: International Accreditation Forum
<b>IC</b>	: Indice de Criticité
<b>ICH</b>	: International Conferences on Harmonization
<b>ICSI</b>	: Intracytoplasmic Sperm Injection
<b>IU</b>	: Insémination Intra-Utérine
<b>ILAC</b>	: International Laboratory Accreditation Cooperation
<b>INF</b>	: Documents d'Informations
<b>ISO</b>	: International Organization for standardization
<b>LBM</b>	: Laboratoire de Biologie Médicale
<b>LCS</b>	: Limite de Contrôle Supérieure
<b>LCI</b>	: Limite de Contrôle Inférieure
<b>LSS</b>	: Limite de Surveillance Supérieure
<b>LSI</b>	: Limite de Surveillance Inférieure
<b>MEA</b>	: Mouse Embryo Assay
<b>MRC</b>	: Matériaux de Référence Certifiés
<b>MAD</b>	: Dirham Marocain
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>OP</b>	: Opérateur

<b>PDCA</b>	: Plan, Do, Check, Act
<b>PSM</b>	: Poste de Sécurité Microbiologique
<b>REF</b>	: Document de Référence
<b>SEMAC</b>	: Service Marocain d'Accréditation
<b>SFBC</b>	: Société Française de Biologie Clinique
<b>SH GTA</b>	: Section Humain Guide Technique d'Accréditation
<b>SI</b>	: Système International
<b>SMQ</b>	: Système de Management de la Qualité
<b>Spz</b>	: Spermatozoïdes
<b>ULB</b>	: Université Libre de Bruxelles
<b>VIM</b>	: Vocabulaire International de Métrologie
<b>WHO</b>	: World Health Organization

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Un exemple de la cartographie des processus d'un laboratoire de biologie médicale .....	45
<b>Figure 2:</b> Organisation des différents chapitres de la norme ISO 15189:2012.....	52
<b>Figure 3:</b> Logigramme de vérification / validation des méthodes d'après C. Lelievre .....	58
<b>Figure 4:</b> Les performances d'une technique évaluables à partir des données du contrôle qualité [d'après le SH GTA 06] .....	70
<b>Figure 5:</b> Identification des processus et sous-processus liés à l'activité analytique de la méthode « identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon ». .....	92
<b>Figure 6:</b> Les courbes de Bland et Altman de chacun des quatre opérateurs selon CIQ1 et 2. ....	130
<b>Figure 7:</b> Les cartes de contrôle de la moyenne des moyennes $\bar{\bar{X}}$ des CIQ 1 et 2 .....	132
<b>Figure 8:</b> Les cartes de contrôle des écart-types $\bar{S}$ des CIQ1 et 2 .....	133
<b>Figure 9:</b> Etude de linéarité CIQ3 .....	134
<b>Figure10:</b> Graphe du rapport en % des résultats retrouvés avec la cellule de Makler (Y) et les valeurs théoriques en fonction des dilutions (X) .....	135
<b>Figure 11 :</b> Graphe des différences entre la technique testée et la technique de référence (Yi-Xi vs Xi) .....	140
<b>Figure 12:</b> Graphe des différences entre la technique testée et la technique de référence selon la technique de Bland et Altman .....	140
<b>Figure 13 :</b> Régression de la méthode testée / référence pour la détermination de la concentration des spermatozoïdes .....	141

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Synoptique des documents de référence du COFRAC .....	55
<b>Tableau 2:</b> Expression de la portée d'accréditation des activités AMP selon le COFRAC .....	60
<b>Tableau 3:</b> Paramètres à valider/vérifier pour les méthodes quantitatives .....	63
<b>Tableau 4:</b> Recommandations sur la vérification/validation d'une méthode d'AMP selon le SH GTA 05 .....	64
<b>Tableau 5:</b> Description de la méthode : identification morphologique de l'ovocyte, zygote et de l'embryon suivant le formulaire SH-FORM-44 du COFRAC .....	90
<b>Tableau 6:</b> Les résultats des critères de performance que nous avons choisis au niveau du laboratoire AMP pour les cycles de FIV classique. ....	93
<b>Tableau 7:</b> Maitrise des risques .....	94
<b>Tableau 8:</b> Inventaire physique des équipements du laboratoire d'AMP intervenant dans la méthode « identification de l'ovocyte, zygote et embryon» .....	98
<b>Tableau 9:</b> Planning des maintenances préventives des DMDIV du laboratoire AMP du CSR .....	99
<b>Tableau 10:</b> Résultats de l'évaluation de la criticité par la méthode PIEU .....	100
<b>Tableau 11:</b> Résultats des indicateurs de performance globaux et selon l'opérateur des tentatives de FIV réalisées durant l'analyse rétrospective du 01/01/2015 au 16/04/2016.....	102
<b>Tableau 12:</b> Résultats des indicateurs de performance globaux et suivant l'opérateur des tentatives de FIV réalisées après l'application des actions correctives. ....	103
<b>Tableau 13:</b> Coefficients attribués pour la détermination de la criticité des équipements à la grandeur température selon le temps, l'usage et le coût du contenu.....	104
<b>Tableau 14:</b> Les équipements critiques pour la grandeur température du laboratoire AMP intervenant dans la méthode « identification de l'ovocyte, zygote et embryon ».....	105
<b>Tableau 15:</b> Programme d'étalonnage des équipements critiques à la grandeur température du laboratoire AMP du CSR .....	106
<b>Tableau 16:</b> Description de la méthode «Concentration des spermatozoïdes ».....	118
<b>Tableau 17:</b> Objectifs analytiques de la concentration des spermatozoïdes selon la table Ricos et al.	120
<b>Tableau 18:</b> Moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la répétabilité suivant les deux niveaux de concentration des spermatozoïdes. ....	128

**Tableau 19:** Moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la reproductibilité intra-laboratoire suivant les deux niveaux de concentration des spermatozoïdes..... 128

**Tableau 20:** Moyennes, écarts-types et coefficients de variabilité inter-opérateurs pour les deux niveaux de concentrations spermatiques..... 129

**Tableau 21:** Les valeurs cibles et les limites de contrôles et de surveillances supérieures et inférieures pour les deux concentrations spermatiques CIQ1 et 2..... 131

**Tableau 22:** Evaluation de la justesse ..... 134

**Tableau 23:** Etendue de mesure de notre méthode ..... 135

**Tableau 24:** La maîtrise des risques du sous processus « concentration des spermatozoïdes» ..... 136

## Liste des photos

<b>Photo 1:</b> Evolution embryonnaire in vitro .....	33
<b>Photo 2:</b> Le centre AMP du centre de santé reproductrice du CHU de Rabat .....	39
<b>Photo 3:</b> Incubateur à CO <sub>2</sub> au niveau d'une salle technique du laboratoire AMP .....	40
<b>Photo 4:</b> Hotte à flux laminaire équipée d'un stéréomicroscope, d'une plaque chauffante, d'un incubateur de paillasse et de blocs chauffants au niveau d'une salle technique du laboratoire AMP .....	41

## **Introduction générale**

La compétence d'un laboratoire de biologie médicale (LBM) est conditionnée par la qualité des prestations d'analyses et de conseils rendus à ses clients (patients-prescripteurs), si le concept de la qualité dans les LBM ne constitue pas une nouveauté, le développement de la formalisation du processus à travers plusieurs normes et protocoles a contribué à la mise en place d'un véritable système de management de la qualité dont l'objectif est d'assurer le maintien des compétences techniques, répondre aux exigences des clients et obtenir l'agrément des pouvoirs publics à travers la certification et l'accréditation.

Par conséquent, les laboratoires doivent prendre les dispositions appropriées pour s'assurer qu'ils sont en mesure de fournir des résultats de niveau de qualité requis sûrs et fiables par des méthodes validées dans l'environnement propre du laboratoire.

De nombreux protocoles et recommandations sur la validation des méthodes et sur l'incertitude ont été élaborés, notamment dans les normes de la famille ISO tels que l'ISO/CEI 17025: 2017 (Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) [1] et l'ISO 15189 version décembre 2012 (Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence) [2,3] ainsi que dans les publications de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (CIH) [4].

Et à ce titre, le biologiste est particulièrement impliqué où à côté de l'utilisation des procédures de contrôle interne de qualité CIQ et la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité EEQ, il y'a l'utilisation des méthodes d'analyse validées, [3].

Plus qu'une exigence, la validation des méthodes est une étape essentielle à maîtriser pour connaître ses méthodes, assurer la qualité des résultats et décliner les points critiques qui devront être intégrés dans l'habilitation du personnel [5].

Elle peut être définie comme étant la confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites [2]. Ceci passe par l'ensemble des procédures à mettre en œuvre pour s'assurer que la méthode présente la fiabilité requise pour répondre aux exigences de qualité dans l'état actuel de l'art, qui est la conformité de la situation soumise aux standards [6,7].

Dans un souci d'harmonisation de notre pratique professionnelle au sein du laboratoire d'assistance médicale à la procréation (AMP) du Centre de Santé Reproductrice du Centre

Hospitalier Universitaire Ibn Sina de Rabat et de maîtrise de la fiabilité de nos résultats, nous avons entamé une démarche de validation volontaire de nos méthodes en nous appuyant sur un ensemble de référentiels dont la norme NF EN ISO 15189:2012 et suivant la méthode du comité français d'accréditation COFRAC qui définit et facilite l'application de la norme à travers des guides techniques et des recommandations résultant de l'application des référentiels d'accréditation reconnus comme étant les plus appropriés.

Pour le choix des méthodes à valider, nous avons suivi fidèlement et strictement les recommandations du COFRAC pour l'expression des portées-types (ou nomenclature) recensant les examens classiques de biologie médicale sous la forme d'une liste de compétences et particulièrement le sous - domaine de la biologie de reproduction.

Nous avons donc commencé par la validation de deux méthodes d'AMP, une méthode qualitative qui est l'identification morphologique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon, cette méthode est la méthode principale de la technique fécondation in vitro classique (FIV) réalisée au niveau de notre laboratoire puis une méthode quantitative en amont de la chaîne analytique du spermogramme qui est la détermination de la concentration des spermatozoïdes.

Cette validation reste délicate pour des raisons à la fois liées aux types de méthodes utilisées, majoritairement manuelles dans notre contexte où la qualité des actes biologiques repose donc particulièrement sur la compétence du personnel, mais aussi au type de matrice qui est le prélèvement ovocyttaire qui est un prélèvement précieux qui ne peut être renouvelé [8].

Elle passe par plusieurs étapes qui visent à tester la normalité de la distribution des mesures, à évaluer les performances du processus analytique (fidélité, justesse, exactitude, domaine de mesure, sensibilité aux interférences, limite de détection s'il y a lieu), à les quantifier en suivant un protocole opératoire standardisé puis à les juger par rapport à des critères définis et à définir des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode dans le temps.

La finalité est d'apporter la preuve de la validité des résultats rendus et ce de la phase pré-analytique jusqu'aux conseils sur les résultats, elle doit être initiale, puis se continuer dans le temps à mesure de l'utilisation de la méthode. Le choix des critères de performances doit se faire préalablement.



## **Objectifs**

L'objectif principal de ce travail est de contribuer à répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189:2012 en adoptant la méthode COFRAC en terme d'abord de vérification des performances d'une technique qualitative manuelle d'AMP qui est l'identification morphologique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon puis d'une technique quantitative qui est la détermination de la concentration des spermatozoïdes et ceci au moyen des résultats obtenus à partir de ces deux méthodes d'analyses, le but est l'évaluation de nos compétences à travers la présentation et la discussion des résultats de nos indicateurs de performance et de notre maîtrise de risque en associant la démarche bibliographique et surtout en justifiant nos choix sachant qu'au Maroc, aucune étude sur la validation des méthodes en AMP selon l'ISO 15189:2012 n'a été déjà réalisée.

Afin d'atteindre cet objectif principal, nous avons procédé dans la première partie de notre travail qui est la partie bibliographique au traitement des concepts principaux de la validation des méthodes et son application dans le domaine de la biologie médicale en général et dans la biologie de la reproduction en particulier.

Dans la deuxième et la troisième parties de notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement aux exigences du paragraphe 5.5 « Procédures analytiques » de la norme ISO 15189:2012 [2] où nous avons commencé par l'identification à travers la lecture de ce document de toutes les exigences techniques concernant la validation des méthodes AMP, nous avons ensuite rapporté les moyens que nous avons mis en œuvre pour répondre à ces exigences ainsi que nos résultats pour démontrer que nos méthodes sont adaptées à leurs usages au sein de notre laboratoire.

Dans la première méthode qui est une méthode qualitative manuelle, nous avons procédé principalement à une vérification bibliographique à travers une synthèse de lectures bibliographiques et une étude des données des fournisseurs, cette technique s'appuie sur l'identification morphologique, d'où l'importance de prouver que les opérateurs (biologistes et techniciens) identifient morphologiquement les embryons avec un minimum de subjectivité inter et intra-observateurs, on comprend alors l'importance pour le personnel de bénéficier de procédures adaptées d'habilitation et de formation continue.

Nous avons présenté ensuite notre protocole expérimental et les méthodes statistiques utilisées pour valider la deuxième méthode d'analyse qui est la détermination de la concentration des spermatozoïdes et ceci à travers la mise au point d'un contrôle interne de qualité fait maison et la proposition d'une méthode d'exploitation graphique de ces résultats ainsi que l'organisation d'une comparaison inter-laboratoires.

Dans les deux méthodes d'AMP que nous avons choisies, si l'étude des critères de performance est incontournable, notre analyse des risques nous a permis de mettre en place des moyens cohérents de maîtrise adaptés à notre propre pratique, cette étape est particulièrement importante pour les méthodes manuelles fréquentes en AMP où intervient de nombreux facteurs de variabilité, ce n'est pas non plus la plus facile à réaliser et les recommandations des normes, des fournisseurs, des sociétés savantes et des études de recherche ne sont pas toujours adaptées.

Nous avons consacré la quatrième partie de notre travail à une discussion générale où nous avons discuté nos résultats, la valeur ajoutée des documents COFRAC dans l'application de la norme ISO 15189:2012 ainsi que l'ensemble des difficultés que nous avons rencontrées pour la validation de nos deux méthodes, il est important de noter qu'une validation n'est jamais totalement exhaustive et qu'une amélioration continue est nécessaire.

***Première partie :  
Revue Bibliographique***

## **1. L'assistance médicale à la procréation**

### **1.1. Définition**

L'infertilité est définie, depuis 2009, par l'impossibilité d'obtenir une grossesse après un an de rapports réguliers et non protégés [9], l'un des traitements de l'infertilité est le recours aux techniques d'assistance médicale à la procréation.

L'assistance médicale à la procréation est une discipline de la biologie médicale qui s'intéresse au diagnostic et au traitement des pathologies de la reproduction à travers différentes techniques in vitro pour la prise en charge des patients infertiles, elle comprend les «pratiques cliniques et biologiques permettant la conception in vitro, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle» [9].

Cette définition des pratiques d'AMP n'intègre pas les traitements inducteurs de l'ovulation visant la correction d'un trouble de l'ovulation, cause fréquente d'infertilité chez la femme.

### **1.2. Les techniques d'assistance médicale à la procréation**

Il existe de nombreux protocoles et techniques en AMP, le choix dépend de la cause de l'infertilité, du bilan d'infertilité du couple, des paramètres spermatiques initiaux, du profil des patients, de la qualité de la préparation spermatique finale et des habitudes de chaque prescripteur.

On distingue majoritairement trois techniques : l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation in vitro (FIV) classique et la fécondation in vitro avec injection de spermatozoïde ou ICSI pour intracytoplasmic sperm injection.

#### **1.2.1. L'insémination intra- utérine**

L'insémination intra-utérine consiste à déposer au moment de l'ovulation, du sperme préparé au fond de l'utérus.

Elle est précédée d'une stimulation ovarienne mono- ou pauci-folliculaire de la patiente, par injection sous-cutanée de la FSH (hormone stimulante du follicule).

Le jour de l'IIU, les spermatozoïdes sont traités in vitro afin de les séparer du liquide séminal par un gradient de densité suivi de lavage et centrifugation.

Les spermatozoïdes ainsi préparés sont ensuite déposés dans la cavité utérine au moment de l'ovulation déclenchée le plus souvent artificiellement 36 heures avant une injection d'hCG (hormone chorionique gonadotrope) [9].

### **Les indications de l'IIU :**

Les inséminations intra-utérines sont proposées aux patients avec :

- des troubles de l'ovulation (par exemple les patientes avec un syndrome des ovaires poly-kystiques) après échec des stimulations simples de l'ovulation.
- une glaire cervicale «inadéquate».
- des anomalies spermatiques mineures ou lors d'une infertilité d'origine inexplicée.

Elles s'adressent avant tout à des patientes «jeunes» ayant une réserve ovarienne satisfaisante. La perméabilité des trompes doit être vérifiée préalablement.

Les taux de grossesses échographiques par IIU sont de l'ordre de 12% par tentative [9].

Contrairement aux idées reçues, ce n'est pas la première étape obligatoire de la prise en charge, si la stérilité est sévère ou ancienne, il est parfaitement légitime de programmer directement une FIV ou une FIV / ICSI.

### **Les complications de l'IIU**

Le risque majeur est celui d'une hyperstimulation et/ou d'une grossesse multiple, si le traitement inducteur n'est pas parfaitement contrôlé.

## **1.2.2. La fécondation in vitro classique ou avec micro-injection du spermatozoïde**

Une FIV consiste à reproduire au laboratoire ce qui se passe normalement dans les trompes de la femme dans la première semaine du développement embryonnaire, c'est-à-dire la fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde et le développement embryonnaire pré-implantatoire.

### **Déroulement d'une tentative de FIV/ ICSI**

Ces techniques comprennent :

- Une stimulation ovarienne, classiquement multi-folliculaire à l'aide des gonadotrophines, associées ou non aux analogues agonistes ou antagonistes du GnRH (Gonadotrophine Libération hormone), le protocole et la posologie des traitements dépendent

de l'âge de la patiente, son poids, sa réserve ovarienne, des réponses précédentes aux stimulations et de l'indication de l'AMP (endométriose, syndrome des ovaires polykystiques...).

- Le prélèvement et la préparation des ovocytes : les complexes cumulo-ovocytaires (ovocyte et cellules folliculaires entourant l'ovocyte) sont ponctionnés par voie transvaginales sous contrôle échographique, environ 36 heures après le déclenchement de l'ovulation par l'hCG [9].

Au laboratoire d'AMP, sous stéréomicroscope, le liquide folliculaire aspiré est ensuite examiné, à la recherche des ovocytes entourés d'une couronne de cellules folliculaires qui seront mis en culture dans des conditions précises de température, pH, osmolarité, pression partielle d'oxygène et de gaz carbonique.

- La préparation des spermatozoïdes : le jour de la ponction ovarienne, le sperme est recueilli au laboratoire par masturbation et préparé par lavage et centrifugation avec souvent séparation sélective par un gradient de densité car le sperme éjaculé n'est pas fécondant et ne le devient, in vivo, qu'une fois les spermatozoïdes débarrassés du plasma séminal.

- La mise en fécondation : regroupe deux techniques :

- La fécondation in vitro classique (FIVc) : la fécondation se fait naturellement où les spermatozoïdes préparés sont déposés dans des boîtes de pétri adaptées à la culture embryonnaire avec des microgouttes de milieux de culture contenant les complexes cumulo-ovocytaires (ovocytes et cellules du cumulus qui l'entourent) et sous huile de paraffine hautement purifiée.

- La fécondation in vitro assistée ou intracytoplasmic sperm injection (ICSI) : consiste à l'introduction mécanique d'un spermatozoïde dans l'ovule, les ovocytes sont d'abord découronnés (retrait des cellules du cumulus) chimiquement par une enzyme (hyaluronidase) et mécaniquement à l'aide de pipettes fines d'un diamètre de 130 µm, puis un spermatozoïde est injecté dans chaque ovocyte mature (ovocyte en métaphase de deuxième division méiotique), cette micro-injection est faite sous microscope avec micro-manipulateur qui est un dispositif de grande précision.

Les ovocytes sont ensuite cultivés dans un milieu de culture adapté à 37 ° C, sous atmosphère contrôlée.

- Le développement embryonnaire in vitro : la fécondation est objectivée le lendemain par la présence d'un zygote avec deux pronoyaux.

Une fécondation anormale (par exemple 3 pronucléi) exclut le transfert.

Le premier clivage ou clivage précoce est la première division mitotique survenant avant  $26 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (ICSI) ou  $28 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (FIV), il est corrélé à la meilleure chance d'implantation [10].

Le développement de l'embryon préimplantatoire va se poursuivre par des divisions successives de segmentations qui le partagent en 4 cellules au deuxième jour (J2), en 8 cellules au troisième jour (J3). Au 4<sup>ème</sup> jour post-fécondation (J4), l'embryon devient une morula qui peut se compacter (disparition des limites cellulaires des blastomères externes) puis évoluer en blastocyste à J5 ou J6.

Classiquement, les embryons sont suivis et sélectionnés sur des critères morphologiques et cinétiques relevés à des moments précis de l'évolution embryonnaire.

Au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jours post-fécondation, plusieurs critères sont retenus qui permettent de classer les embryons en fonction de leur potentiel évolutif, il s'agit notamment du nombre de blastomères (typiquement 4 cellules à J2, 8 cellules à J3), de l'homogénéité de taille des blastomères (pour les embryons à 2, 4 et 8 cellules), de la symétrie des clivages, de l'absence de fragments (petites structures cytoplasmiques entourées par une membrane), et la mononucléation des blastomères [9].

- Le transfert embryonnaire : traditionnellement, un ou deux embryons sont replacés dans la cavité utérine soit au stade précoce (J2 / J3), au stade de blastocyste (J5 / J6) après culture prolongée ou au stade zygote. Afin de limiter le risque de grossesses multiples, la tendance est de promouvoir le transfert d'un seul embryon.

Le transfert s'effectue à l'aide d'un cathéter inséré dans le col de l'utérus, par voie vaginale, l'embryon ainsi déposé poursuivra son développement et s'implantera au niveau de la muqueuse utérine.

### **Les indications de la FIV:**

La fécondation in vitro classique s'adresse aux patients après échec d'inséminations intra-utérines, ou en première intention en cas d'obstruction tubaire, de diminution de la réserve ovarienne, d'endométriose sévère, ou d'infertilité masculine modérée.

La FIV avec micro-injection (ICSI) est indiquée en cas d'anomalies spermatiques majeures (oligo-asthéo-téatospermies), d'antécédents inexplicés d'échecs de fécondation ou en cas de vitrification des ovocytes.

En cas d'azoospermies (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat), on peut effectuer des prélèvements testiculaires et / ou épидидymaires.

**Les complications de la FIV:**

Les complications de la stimulation (torsion ovarienne, problèmes hydro-électrolytiques) sont rares, le risque d'hyperstimulation modérée à sévère est de l'ordre de 1-5% des cycles [11], ceux de la ponction (risque anesthésique, péritonite, hémorragie) sont exceptionnelles.





J1 : Zygote (GP : Globule Polaire, PN : Pronucléi) ;

J2 : Embryon à 4 cellules régulières et sans fragmentation ;

J3 : Embryon à 8 cellules régulières et sans fragmentation ;

J4 : Morula compactée ;

J5 : Blastocyste (ICM : *Inner Cell Mass* ou Masse Cellulaire Interne, TE : Trophectoderme).

**Photo 1:** Evolution embryonnaire in vitro [9]

### **1.3. Le cadre juridique de l'assistance médicale à la procréation au Maroc**

La problématique de la stérilité du couple est apparue pour la première fois au niveau de la conférence internationale des nations unies sur la population et le développement du Caire en 1994 où pour la première fois le domaine de la santé reproductive apparaît dans le rapport et les recommandations de la conférence ainsi que la prévention et le traitement approprié de l'infécondité qui sont mentionnés parmi les priorités d'action future.

Depuis lors, de nombreux avancés sont apparus à travers les activités d'assistance médicale à la procréation avec des techniques qui mettent en œuvre de nouvelles technologies dans un domaine sensible où de multiples enjeux éthiques et sociaux sont mobilisés, d'où l'importance de la réglementation de l'utilisation de ces techniques qui sont différemment perçues par les cultures, les religions et les sociétés.

Ainsi , en France, c'est la loi relative à la bioéthique, qui est la loi 2011-814 du 7 juillet 2011 qui fixe les grands principes encadrant le don et l'utilisation d'éléments et produits du corps humain, la génétique humaine, les activités d'assistance médicale à la procréation , le diagnostic prénatal et préimplantatoire et la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires humaines [12].

Ces règles visent au respect de la dignité humaine et interdisent toute pratique commerciale ainsi que toute forme de clonage et de pratiques eugéniques.

Au Maroc, en 2018, le gouvernement marocain a adopté le projet de loi n°47.14 relatif à l'assistance médicale à la procréation [13], très attendue, cette nouvelle loi a comblé un vide juridique en matière des pratiques d'AMP et a renforcé l'arsenal juridique national en la matière.

Ainsi, le recours à l'AMP est réservé uniquement au profit d'une femme et d'un homme mariés, vivants et exclusivement avec leurs propres gamètes, ayant donné un consentement libre et éclairé par écrit.

Ce projet de loi comprend 7 chapitres et 48 articles qui fixent les principes généraux régissant l'assistance médicale à la procréation, les conditions de pratiques de ces techniques avec en tête le respect de la dignité humaine, la préservation de l'intégrité physique et psychologique des personnes et la protection de leur intimité en plus du respect de la confidentialité des données personnelles.

Il interdit le recours à certaines pratiques comme le clonage, les techniques de mère porteuse, le don ou le trafic des cellules et des spermatozoïdes en fixant les conditions relatives à certains actes accomplis sur les gamètes ou les embryons notamment le diagnostic préimplantatoire, la conservation des embryons et des gamètes ainsi que l'importation ou l'exportation des gamètes.

En plus de fixer les conditions de pratique des techniques d'AMP, les établissements de santé agréés à pratiquer l'assistance médicale à la procréation seront soumis à des opérations d'inspection tendant à s'assurer du respect par ces établissements des principes et des conditions précités.

## **2. Le laboratoire d'assistance médicale à la procréation du Centre de Santé Reproductrice**

Le laboratoire d'assistance médicale à la procréation (AMP) fait partie du centre d'AMP du Centre de Santé Reproductrice (CSR) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ibn Sina de Rabat.

Le centre AMP est créé en 2011 et inauguré officiellement en 2016, il s'agit du premier centre d'AMP public au Maroc, d'un investissement de plus de 12 millions de dirhams marocain.

La réalisation de ce centre s'inscrit dans le cadre d'un projet interuniversitaire intitulé : développement, implémentation et évaluation d'un programme de prise en charge accessible au plus grand nombre des problèmes de stérilité du couple dans le secteur public au Maghreb : projet pilote et transfert de technologie.

Ce projet était le fruit d'un travail de coopération entre des partenaires belges, d'une part le laboratoire de recherche en reproduction humaine de la Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles ULB, le service de Gynécologie –Obstétrique de l'Hôpital Erasme et l'Université de Liège, et d'autre part les partenaires marocains à savoir la Faculté de Médecine de Rabat , le Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina et le Centre de reproduction du CHU de Rabat, son domaine d'activité est la biologie de la reproduction.

Ce projet s'intéresse à la problématique de la stérilité du couple, un problème extrêmement présent dans les pays en voie de développement mais longtemps négligé tant au niveau des instances internationales, de la coopération au développement, que dans les pays eux-mêmes. Il est destiné à fournir une aide au transfert de technologies et à l'implémentation d'une structure capable d'offrir des soins de qualité à un tarif accessible à la population générale.

L'objectif du projet consistait à la prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'infertilité du couple de manière structurée dans le service public, la diminution de la souffrance du couple infertile et l'amélioration du statut de la femme infertile.

Ce projet s'est étalé sur cinq ans, la première année a été consacrée à la formation de :

- deux médecins gynécologues pour une durée d'un an afin de maîtriser de manière extensible l'ensemble des technologies et aussi être capable de gérer leurs complications et leurs situations particulières. En effet la sécurité de l'application de ces techniques nécessite une connaissance et une bonne maîtrise de l'ensemble des situations y compris les situations les moins fréquentes.

- deux biologistes médicaux pour une durée d'un an afin de maîtriser les outils de laboratoire y compris l'ICSI.
- deux techniciens de laboratoire, assistants des biologistes pour une durée de six mois.
- une infirmière/ sage-femme afin d'apprendre le travail clinique, l'organisation et la gestion des médicaments.

Les autres années ont été consacrées au lancement du programme clinique et à l'augmentation de l'activité.

Le centre AMP fruit de ce projet assure la prise en charge diagnostique et thérapeutique à moindre coût dans le secteur public marocain du couple marié infertile par tout acte permettant la procréation en dehors d'un processus naturel.

Il possède des locaux à usage exclusif pour les activités AMP, il s'agit d'un bâtiment constitué :

- d'une unité fonctionnelle clinique au rez-de chaussée avec une salle pour prélèvement ovocytaire et deux salles de réveil.
- d'un laboratoire AMP qui occupe le sous -sol du bâtiment.
- des bureaux administratifs, salle de réunion et pharmacie de stockage au premier étage.

Le centre AMP réunit des professionnels avec des parcours variés qui permettent de couvrir de nombreux domaines de compétence, il s'agit d'un médecin gynécologue, d'un professeur en cytogénétique, d'une pharmacienne biologiste, d'une sage-femme gestionnaire du centre, de deux techniciens de laboratoire, de deux infirmiers polyvalents et d'un agent d'entretien.

Le laboratoire d'AMP possède des équipements récents et performants adaptés à ses deux activités qui sont :

- une activité de spermologie thérapeutique avec la réalisation d'insémination intra-utérine (IIU).
- une activité de fécondation in vitro (FIV).

Il dispose d'une salle de recueil de sperme, de deux salles destinées aux activités techniques, d'une salle spécifique pour la conservation des embryons (salle d'azote) et d'une zone administrative.

La salle de recueil de sperme est un local spacieux situé à proximité du laboratoire AMP au niveau du rez de chaussée du centre AMP, il est mis à la disposition des patients pour le recueil de leurs éjaculats. Il est aménagé de façon à préserver l'intimité du patient et il est muni d'un lavabo pour le lavage des mains ainsi que du matériel de désinfection.

Les deux salles techniques sont dotées des équipements suivants :

- deux incubateurs à CO2 Thermo scientific HERA cell®240 i
- une étuve Memmert®Modèle 100-800
- deux Hottes à flux laminaires Thermo scientific Héraguard®, chacune est équipée d'un bloc chauffant Stuart SBH 130 ®, d'un stéréomicroscope avec plaque chauffante Olympus SZX7®, d'une plaque chauffante Labotec Hot plate 062 ® et d'un incubateur de pailleuse à FIVAL (FIV4) K-system ®
- un microscope à contraste de phase avec platine chauffante Olympus IX 71® avec deux micromanipulateurs.
- un microscope optique Olympus CKX41®
- deux cellules de Makler®
- une soudeuse SYMS III ®pour paillettes de vitrification haute sécurité CBS TM
- une étiqueteuse BMP 51 BRADY®

La salle d'azote est destinée au stockage des cuves d'azotes contenant les embryons vitrifiés, elle est dotée de deux cuves d'azote liquide pour stockage des embryons Air –liquide GT 40®ainsi que deux réfrigérateurs LG® destinés à la conservation des milieux de culture et des kits de vitrifications et de dévitrifications.

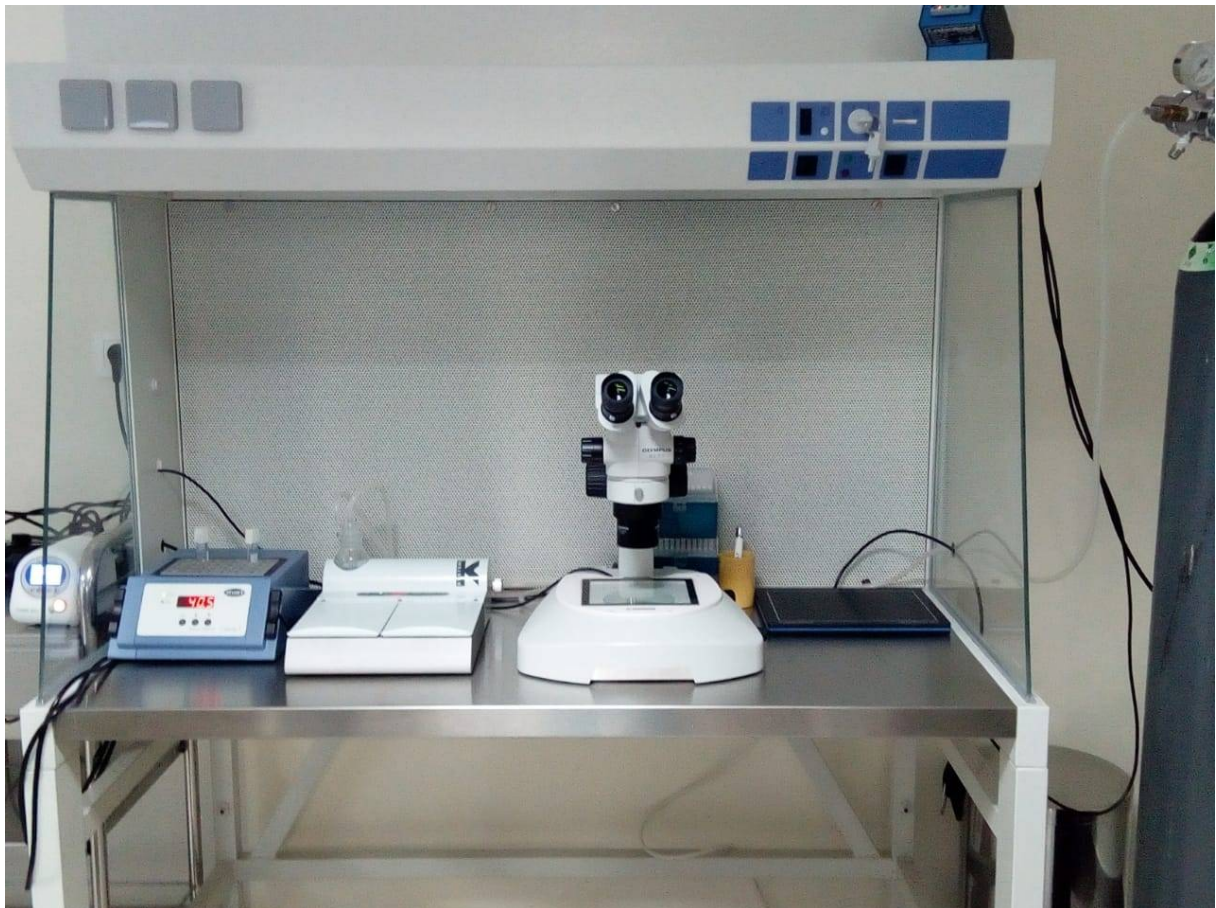


**Photo 2:** Le centre AMP du centre de santé reproductrice du CHU de Rabat



**Photo 3:** Incubateur à CO<sub>2</sub> au niveau d'une salle technique du laboratoire AMP





**Photo 4:** Hotte à flux laminaire équipée d'un stéréomicroscope, d'une plaque chauffante, d'un incubateur de paille et de blocs chauffants au niveau d'une salle technique du laboratoire AMP.

### **3. Assurance qualité, certification et accréditation des laboratoires de biologie médicale**

#### **3.1. Le système assurance qualité aux laboratoires de biologie médicale**

Un système de la gestion de la qualité peut être défini comme les actions coordonnées dirigeant et contrôlant les activités d'une organisation vis-à-vis de la qualité, cette définition est celle utilisée par l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) et par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14] qui sont deux groupes internationalement reconnus comme des organisations de normalisation pour les laboratoires.

Les principes de l'assurance qualité sont l'objet d'une série de normes publiées par l'ISO, qui regroupent les processus dans les catégories « pré-examination », « examination » et « post-examination ». Des termes comparables sont employés dans l'usage courant : processus pré-analytiques, analytiques, et post-analytiques.

La gestion de la qualité est un ancien concept qui prend source dans la satisfaction du client : « tout part du client, tout va vers le client », son bien-fondé n'est plus à démontrer. Faire de la qualité n'est pas seulement contrôlé au stade final si le produit ou le service est bien conforme aux exigences, c'est aussi suivre cette qualité à tous les stades pour chercher à atteindre le « zéro défaut » [15].

L'engagement des biologistes marocains dans l'assurance qualité remonte à 2010, date de publication du guide de bonne exécution des analyses de laboratoire (GBEA) [16], sa mise en place dans les LBM et la reconnaissance des compétences certes peu formalisées sont devenues parmi les priorités qui permettent aux laboratoires de mieux prévoir leurs organisations, d'améliorer la transparence de leurs fonctionnements, une optimisation et une harmonisation des pratiques sont alors attendues [17].

Dans un système de gestion de la qualité, tous les aspects de l'activité du laboratoire, incluant la structure organisationnelle, les processus, et les procédures doivent être étudiés.

La norme NF EN ISO 15189 version 2012, impose un management du système de gestion de la qualité par approche processus.

Un processus est l'ensemble des activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie. Les éléments d'entrée d'un processus sont généralement les éléments de sortie d'autres processus [2].

Cette approche permet de faciliter le pilotage et la surveillance du système par la cellule qualité, à travers des revues de processus et des indicateurs. Ainsi chacun peut se positionner dans l'organisation et comprendre que l'on est tous dépendants les uns des autres, tous des clients internes au sein de l'organisation.

La cartographie des processus présente les différents processus définis au sein du laboratoire de biologie médicale et exigés par la norme ainsi que les procédures obligatoires. Elle permet d'avoir une vision globale des principales activités à gérer et à maîtriser – figure 1- [3].

On peut se baser sur le système d'amélioration continue pour analyser les éléments de ce système qualité selon le principe de la roue de Deming ou le cycle PDCA en anglais ( Plan, Do, Check, Act) qui illustre comment prétendre à une amélioration continue dans n'importe quel processus, il comporte 4 étapes [15,18,19] :

- Plan : préparer, planifier ce que l'on va réaliser, la planification du système qualité avec notamment la rédaction d'un manuel comportant tous les éléments du système qualité ;
- Do : développer, réaliser, mettre en œuvre, c'est la phase de l'action où on a la mise en application des différents éléments planifiés avec la rédaction des procédures, la gestion des documents, la mise à disposition de l'infrastructure, des ressources humaines, de l'équipement et des réactifs ;
- Check : contrôler, vérifier, c'est la phase de la vérification ou le contrôle continu du système avec des audits internes et externes ;
- Act : agir, ajuster, réagir, c'est la phase de correction et d'amélioration où les actions correctives adoptées lors d'erreurs ou de plaintes sont ajustées.

Quel que soit le référentiel retenu, les principes d'un système qualité sont universels, il est implanté sous la responsabilité de la direction.

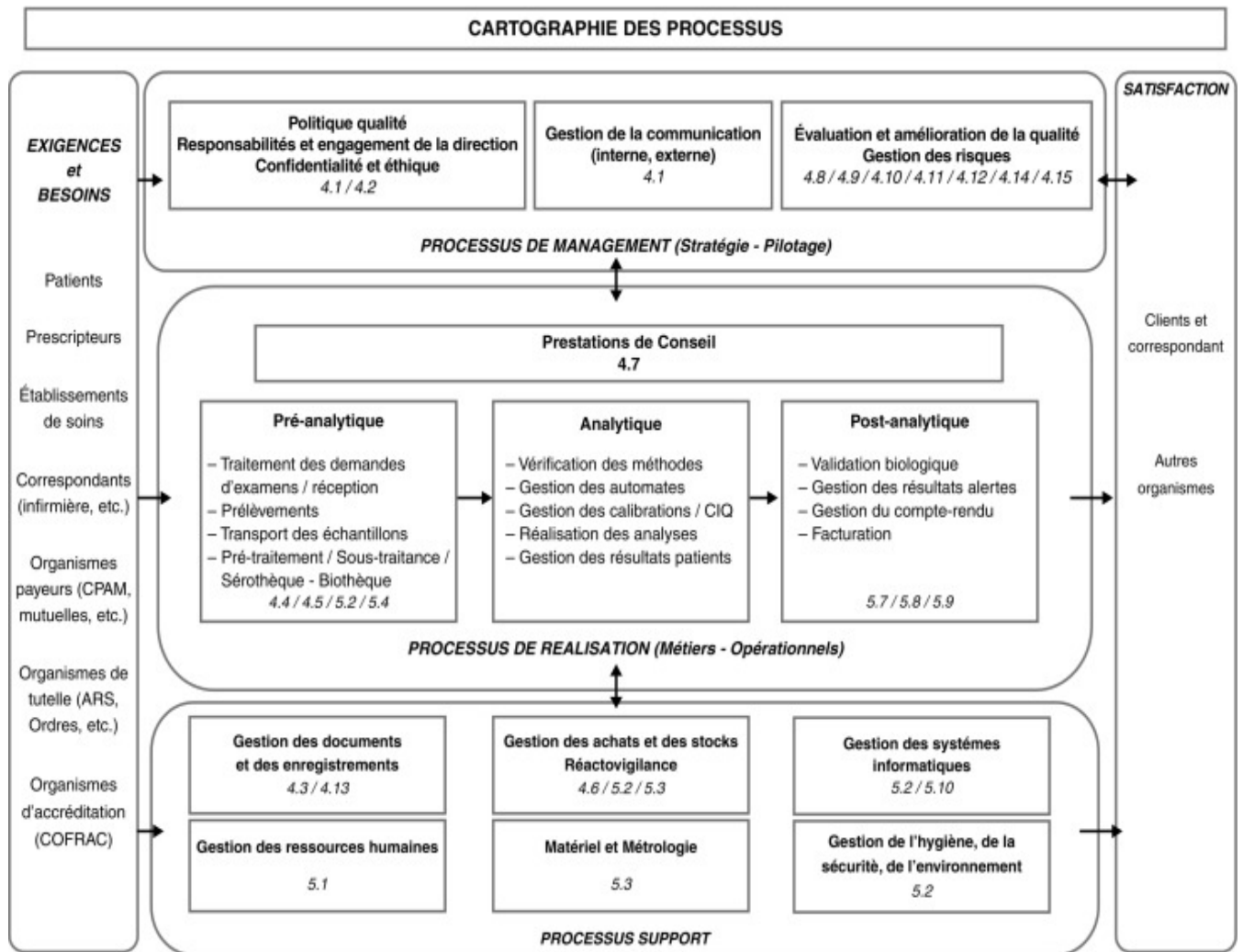
La direction définit la politique qualité et les objectifs en découlant, les responsabilités, l'organisation et les ressources nécessaires, le tout est décrit dans un système documentaire structuré et maîtrisé.

Puis, l'efficacité du système est régulièrement testée par des auditeurs internes et/ou externes dont l'analyse ouvre à des actions correctives [20, 21].

La mise en œuvre du système qualité génère un coût, qui doit être rentabilisé en réduisant les non-conformités (internes et externes) et surtout en éliminant les risques liés à l'utilisation d'un produit chez le client.

Il existe trois axes de rentabilité du système qualité [21] :

- la prévention afin de limiter le nombre de « non-conformités » grâce au bon respect des procédures ;
- la détection qui élimine les produits non conformes lors des contrôles réalisés aux différentes étapes de la vie d'un produit ;
- l'amélioration continue en effectuant une analyse des réclamations et leurs traitements par des actions correctives.



**Figure 1:** Un exemple de la cartographie des processus d'un laboratoire de biologie médicale [3]

### **3.2. Certification et accréditation des laboratoires de biologie médicale**

Les laboratoires de biologie médicale peuvent mettre en place une démarche qualité selon plusieurs modèles. Les normes sont utilisées quand un laboratoire cherche une reconnaissance officielle de ses capacités à réaliser son travail en utilisant des pratiques de qualité [15].

La conformité aux normes peut être une exigence légale ou simplement volontaire.

Au Maroc, à côté des démarches qualité obligatoires (GBEA) [16], les laboratoires peuvent approfondir leur démarche qualité en s'engageant volontairement dans des procédures de :

- certification basée sur la norme NF ISO 9001 : 2015 (Systèmes de management de la qualité - Exigences) [22].
- accréditation basée sur les normes NF ISO/CEI 17025:2017 [1] ou la norme ISO 15189:2012 [2].

L'accréditation et la certification sont deux processus qui permettent de reconnaître qu'un laboratoire répond aux normes désignées.

Selon la norme ISO 9000 : 2015 [23], certifier un laboratoire c'est reconnaître de façon formelle l'aptitude de son organisation pour gérer la qualité. La certification n'impose pas d'exigences techniques spécifiques, mais le laboratoire doit se conformer à toutes les réglementations applicables.

L'accréditation consiste à reconnaître formellement un laboratoire compétent par rapport à une référence normative [24], on évaluera le laboratoire sur la base d'exigences relatives au management de la qualité et sur la base d'exigences techniques avec principalement la maîtrise du processus de mesure dans sa globalité [25,26].

C'est grâce à l'accréditation par des évaluateurs tiers que les clients du laboratoire peuvent avoir confiance dans les mesures, calibrations, inspection, analyses et certification. Cependant, ce n'est pas le but ultime, une fois l'accréditation obtenue, le challenge sera de conserver ce statut.

### 3.3. Les organismes accréditeurs

Un organisme d'accréditation est une organisation ou une agence qui a le droit et l'autorité d'inspecter une installation et de fournir une preuve écrite de sa conformité à une norme (certification) et de sa compétence (accréditation) [22,23].

**En France**, c'est le comité d'accréditation français (COFRAC) qui est le seul organisme accréditeur à travers le rôle d'une section « Santé humaine » dédiée essentiellement à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale et selon une procédure de reconnaissance par les pairs.

Le COFRAC a la double mission d'accréditer les laboratoires, les organismes d'inspection et les organismes certificateurs et de faire reconnaître cette accréditation à l'international pour éviter que les examens, contrôles et certifications soient recommencés [24].

**Au Maroc**, l'accréditation est une démarche volontaire, elle est délivrée par le service marocain d'accréditation (SEMAM).

Le SEMAM est l'unique organisme marocain d'accréditation, mis en place sous la responsabilité finale du Ministre chargé de l'Industrie, du Commerce, de l'Investissement et de l'Economie Numérique, représenté par la division d'accréditation créée au sein de la Direction de la Qualité et de la Surveillance du Marché (DQSM) relevant du Ministère de l'Industrie, du Commerce, de l'Investissement et de l'Economie Numérique.

C'est un organisme gouvernemental et ses responsabilités juridiques découlant de ses activités qui sont couvertes par le gouvernement, conformément aux dispositions légales en vigueur relatives à la responsabilité civile de l'état [27].

On distingue aussi diverses organisations régionales, comme :

- European cooperation for accreditation – EA pour l'Europe : organisme mandaté par la communauté économique européenne avec pour objectif d'harmoniser les pratiques d'accréditation [28].
- International laboratory accreditation cooperation (ILAC) : organisme de coopération entre différents organismes nationaux d'accréditation pour l'accréditation des laboratoires au niveau international [29].
- International accreditation forum (IAF) pour les organismes d'inspection et de certification [30].

Les objectifs d'harmonisation se traduisent généralement par des accords de reconnaissance mutuels entre les différents pays qui permettent de faciliter l'acceptation des données analytiques et techniques d'un pays à un autre [31].

Certains pays, comme l'Angleterre (CPA ou Clinical Pathology Accreditation) et la Hollande (CCKL ou Coördinatie commissie ter bevordering van de kwaliteitsbeheersing van het laboratoriumonderzoek op het gebied van de gezondheidszorg), ont opté pour un système d'accréditation national organisé par la profession.

D'autres ont un système d'accréditation gouvernemental comme les États-Unis avec le CLIA'88 (Clinical laboratory improvement amendments, 1988) [15,32].

### **3.4. Place de la validation des méthodes dans la politique qualité d'un laboratoire de biologie médicale.**

L'évaluation et la validation des techniques utilisées au sein d'un laboratoire de biologie médicale visent à satisfaire des exigences réglementaires, mais peuvent aussi répondre à des critères normatifs [7], elles figurent parmi les mesures reconnues comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de la biologie médicale. C'est une composante essentielle des mesures qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des données analytiques fiables.

La place prise par la validation des méthodes, doit être mise en relation avec le développement de l'assurance qualité dans les laboratoires. Les équipes techniques sont en première ligne pour apporter la preuve de la maîtrise de la qualité de leurs travaux [34].

Les méthodes analytiques doivent être exactes et spécifiques et les résultats de laboratoire doivent être aussi précis que possible, tous les aspects des activités de laboratoire doivent être fiables et le rendu des résultats doit être correct afin d'être utilisé à des fins cliniques ou de santé publique.

Des performances analytiques inadaptées peuvent avoir des conséquences sur le patient, le clinicien ou le système de santé dans sa globalité [35, 33].

Les biologistes sont familiarisés depuis longtemps avec les notions de contrôle de qualité qu'il s'agisse de contrôle de qualité externe ou interne qui sont deux procédures complémentaires [36,175], or la notion de qualité de l'ensemble des phases pré-analytiques et post-analytiques englobant la totalité des procédures, du prélèvement au compte rendu et au dialogue avec le clinicien, est considérée aujourd'hui comme fondamentale.



Si la validation est devenue un élément majeur pour la démonstration de la compétence des laboratoires désirant l'accréditation, elle doit être conduite selon une procédure expérimentale plus stricte où on parle de justesse, de reproductibilité et d'incertitude de mesure.

## **4. Les standards nationaux et internationaux au laboratoire de biologie médicale**

Une norme ou standard est un document établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu qui fournit pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques pour des activités ou leurs résultats, garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné [39].

Les normes peuvent être développées sur un niveau international, national ou local, elles fournissent des lignes de conduite qui forment la base des pratiques qualifiées au laboratoire.

Les normes développées au niveau international peuvent disposer du plus large consensus or celles développées localement peuvent avoir le plus haut degré d'application, mais ne peuvent pas être utiles dans d'autres régions du monde [15].

Afin de prendre en compte la spécificité des activités de laboratoire et la diversité de leurs domaines d'application, il existe au moins quatre référentiels principaux qui expliquent comment organiser l'assurance qualité au laboratoire.

### **4.1. Les référentiels obligatoires**

#### **4.1.1. Le guide de bonne exécution des analyses**

Au Maroc, la démarche qualité des laboratoires de biologie médicale est formalisée par le guide de bonne exécution des analyses médicales (GBEA) défini dans l'article 55 de la loi n° 12-01 susvisé est défini à l'annexe de l'Arrêté du Ministère de la santé N° 2598-10 du 07 septembre 2010 [16], il décrit les conditions d'exécution des analyses et présente l'avantage de donner des détails pratiques.

Il reste le référentiel opposable à tout laboratoire de biologie médicale.

Il contient des références que nous pouvons considérer comme une réflexion et une formalisation des pratiques dans un cadre obligatoire et réglementaire préliminaire à la mise en place d'un système de validation de méthodes tel que la gestion des contrôles internes et externes où il stipule « *Le contrôle interne de qualité est indispensable pour permettre de*

décélérer les anomalies et les erreurs des mesures pour y remédier immédiatement. Il est organisé par le biologiste qualifié chargé d'assurance de qualité ». Il précise: «La participation au programme national d'évaluation externe de la qualité (EEQ) est obligatoire. Tout refus de participation, ou toute insuffisance de participation est susceptible de déclencher des sanctions...».

## **4.2. Les référentiels choisis dans le cadre d'une démarche volontaire de validation des méthodes**

### **4.2.1. Les normes de l'International Organization for Standardization ISO**

L'international organization for standardization (ISO) est une fédération d'organismes nationaux gouvernementaux et non gouvernementaux de normalisation regroupant 162 pays. L'ISO se fonde sur un consensus international entre les experts représentatifs d'un domaine défini, le domaine étant un terme désignant une spécialité technique ou une discipline [40].

Sa compétence n'est pas législative, nous connaissons ces normes sous le nom « ISO », on distingue :

- **La norme NF EN ISO 9001 :2015**: norme de vocabulaire qui ne comporte pas d'exigences. Elle décrit les principes essentiels des systèmes de management de la qualité, objet de la famille des normes ISO 9000, et en définit les termes regroupés par thème : qualité, management, processus et produits, documentation, audit, etc. Elle est donc indispensable à la mise en œuvre d'un système de management de la qualité. Sa lecture est recommandée particulièrement au début et tout au long d'une démarche qualité de type ISO [22, 41].

- **La norme NF EN ISO/CEI 17025:2017** intitulée « Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais », elle est née en mai 2000 de la fusion de la norme EN 45001 et du guide ISO/CEI 25. Ces dispositions générales sont très voisines de la norme NF EN ISO 9001, elle concerne également le vocabulaire et définit des termes de base et des termes spécifiques des laboratoires d'étalonnage et d'essais relatifs à l'évaluation de la conformité concernant la sélection, la détermination, la revue, l'attestation, la surveillance et la facilitation du commerce [1,41] .

Les prescriptions techniques font sa spécificité, tout ce qui concourt au résultat de l'analyse doit être pris en compte.

Elle est conçue pour l'accréditation des laboratoires d'étalonnages et d'essais par des professionnels du secteur.

**-La norme NF EN ISO 15189:2012** (Exigences particulières concernant la qualité et la compétence des laboratoires d'analyses de biologie médicale) [2,41] : c'est le premier référentiel normatif spécifique qui couvre la totalité de l'activité des LBM, elle reprend les exigences de l'ISO/CEI 17025 dans une dialectique plus adaptée à la profession suivant le GBEA.

Cette norme conjugue les exigences du système qualité de la norme NF EN ISO 9001 : [22] 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 NF EN ISO/CEI 17025.

Les exigences techniques concernent les procédures pré-analytiques, analytiques, post-analytiques et le compte-rendu des résultats mais aussi le personnel, les locaux, les conditions environnementales et le matériel de laboratoire.

Son aspect le plus intéressant et le plus novateur concerne surtout une extension du rôle et des responsabilités du biologiste médical à travers son intégration comme participant dans le processus des soins prodigués aux patients et matérialisé par les prestations de conseils au sens très élargie au-delà des prélèvements et des résultats d'analyses.

L'organisation des différents chapitres de la norme est représentée dans la figure 2 [42].

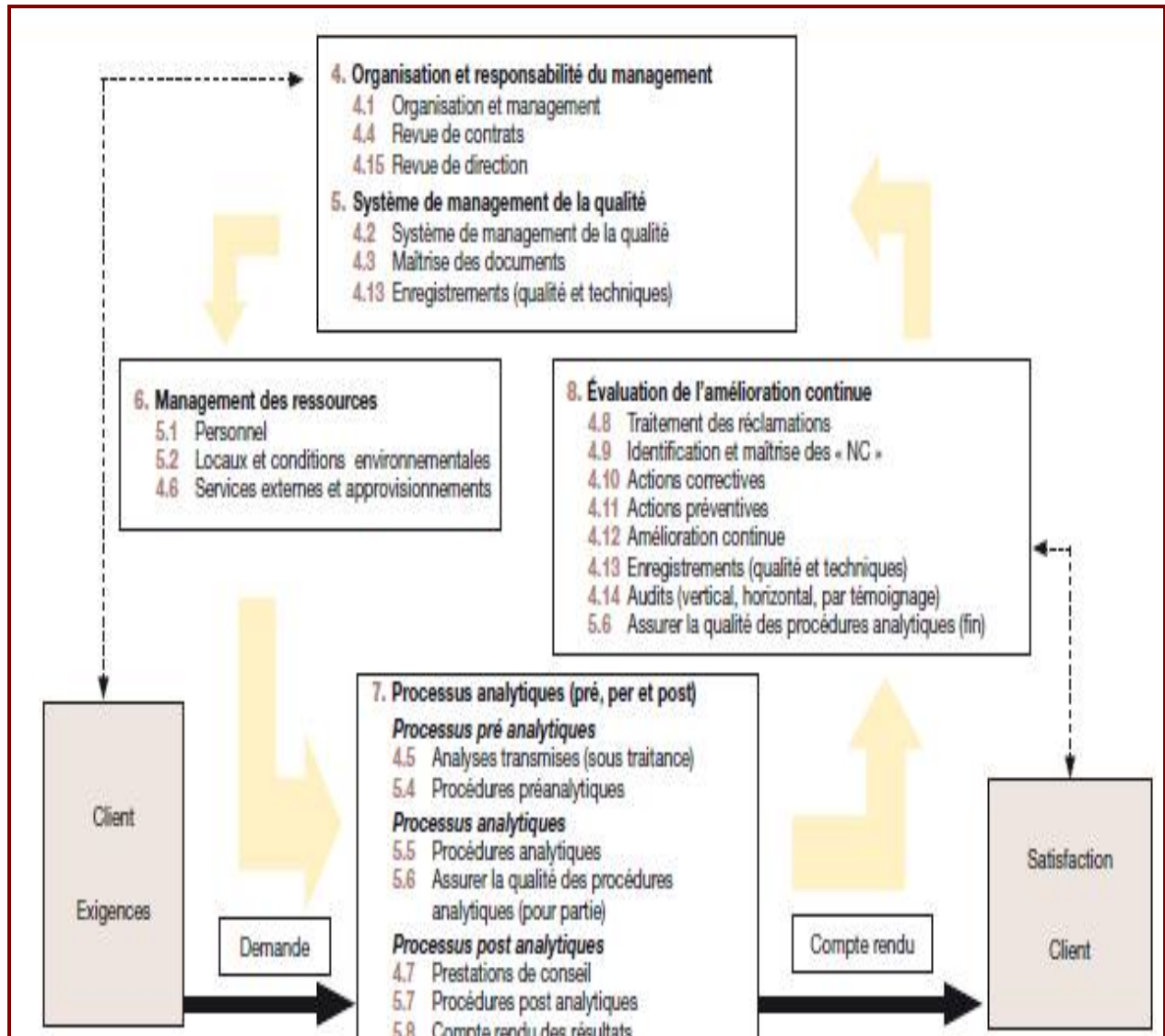


Figure 2: Organisation des différents chapitres de la norme ISO 15189:2012 [42]

#### **4.2.2. Les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute**

Le clinical and laboratory standards institute (CLSI) est une organisation internationale à but non lucratif, développant des normes et promouvant le développement et l'utilisation volontaire des normes et des lignes de conduite par la communauté médicale.

Les documents sont développés par des experts travaillant en sous-comités ou en sous-groupes de travail sous la direction et la supervision d'un comité.

Ses normes sont totalement compatibles avec les normes ISO du laboratoire [15].

Deux documents du CLSI sont très importants pour le laboratoire :

- CLSI/NCCLS. A Quality Management System Model for Health Care; Approved Guideline—Second Edition. CLSI/NCCLS document HS1-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2004 [14].
- CLSI/NCCLS. Application of a Quality Management System Model for Laboratory Services; Approved Guideline—Third Edition. CLSI/NCCLS document GP26-A3. Wayne, PA: NCCLS; 2004.

#### **4.2.3. Les normes du Comité Européen de Normalisation**

Le comité européen de normalisation (CEN) a été fondé en 1975 par les agences nationales de normalisation de l'espace économique européen et des pays associés, l'adoption formelle des normes européennes est décidée par une majorité de vote des membres nationaux du CEN et est applicable à tous [15].

#### **4.2.4. Les publications de l'Organisation Mondiale de la Santé**

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a développé plusieurs normes pour le diagnostic au laboratoire de maladies spécifiques.

Un exemple type est celui de la poliomyélite.

## 5. Le choix de la norme ISO 15189 selon la méthode COFRAC pour la validation des méthodes en AMP

Le choix existe entre la NF ISO/CEI 17025:2017[1] et la norme ISO 15189:2012 [2], ces deux référentiels sont relativement proches dans leurs contenus.

Moins spécifique des LBM, la norme NFEN ISO/CEI 17025:2017 demande des efforts d'adaptation à la pratique de la biologie médicale, la norme NF EN ISO 15189:2012, qui est créée sur l'initiative des biologistes, paraît mieux adaptée aux LBM, elle représente une évolution fondamentale vers une version plus médicalisée par rapport à la norme ISO/CEI 17025:2017 [37,38,20], cependant, elle exige une parfaite maîtrise de la phase pré-analytique et le niveau de détail de ses exigences la rend plus contraignante surtout pour les laboratoires intégrés dans un établissement de soins [41].

Le COFRAC a mis à la disposition des LBM des documents d'application des exigences de la norme 15189:2012 (SH REF 02) [43] ce qui permet d'apporter un supplément de compréhension et d'application en créant un guide technique d'accréditation en biologie médicale et plus particulièrement en techniques d'AMP [44].

Ces documents appartiennent à trois catégories :

**1-Les documents Ref** : contiennent des exigences applicables et opposables qui doivent être remplies, elles justifient des fiches d'écarts en cas de non-respect.

Il s'agit entre autres des documents suivants :

- Le document LAB Ref 08 : aborde l'expression et l'évaluation des portées d'accréditation [8].
- Le document LAB Ref 02 [43].
- Le document GEN Ref 11.

**2-Les guides techniques d'accréditation (GTA)**: utiles aux laboratoires, aux auditeurs et aux fournisseurs afin de traduire et d'appliquer les exigences générales de la norme, on distingue :

-*Le LAB GTA 04* qui porte sur la validation des méthodes en biologie médicale, les recommandations émises dans ce document sont présentées par le COFRAC comme étant les plus appropriées pour répondre aux exigences des normes ISO 17025 comme l'ISO 15189 quant à la vérification des performances dans le laboratoire d'une technique analytique.

La “validation” de l’échantillon biologique n’entre pas dans le domaine d’application des recommandations de ce guide [46].

- *Le LAB GTA 06* concerne les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale, les recommandations émises dans ce document sont présentées par le COFRAC comme étant les plus appropriées pour répondre aux exigences des normes ISO 17025 comme l’ISO15189.

Que le biologiste décide ou non de les appliquer, il devra apporter la preuve que les dispositions prises satisfont pleinement aux exigences de la norme [49].

- *Le LAB GTA 14* [50] traite les recommandations sur les incertitudes de mesure.

A travers ces guides, le COFRAC met en place des préconisations, qui ne donneront lieu à des écarts qu’en cas de non-justification, par opposition aux normes et aux documents dits “Ref”, qui contiennent des exigences.

### **3-Les documents d’informations (INF) et les formulaires (FORM)**

L’ensemble de ces documents est en accès libre sur le site [www.COFRAC.fr](http://www.COFRAC.fr).

Le tableau 1 reprend la synoptique des documents de référence du COFRAC [51].

<b>Tableau 1: Synoptique des documents de référence du COFRAC [51]</b>		
<b>Références</b>	<b>Date de parution</b>	<b>Intitulé des documents</b>
Document SH REF 08	04/08/2010	Expression et évaluation des portées d’accreditation
Document SH REF 02	15/12/2010	Recueil des exigences spécifiques pour l’accreditation des laboratoires de biologie médicale
Document SH INF 50	09/06/2011	Portées types d’accreditation
Document LAB GTA 06	01/07/2005	Les contrôles de qualité analytique en biologie médicale
Document SH GTA 04	23/03/2011	Guide technique d’accreditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale
Document SH GTA 01	25/07/2011	Guide technique d’accreditation en biologie médicale
Document SH GTA 14	26/09/2011	Guide technique d’accreditation pour l’évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale
Document SH GTA 05	26/09/2016	Guide technique d’accreditation en biologie de la reproduction
Document SH FORM 43	23/03/2011	Fiche type quantitatif vérification (portée A) / validation (portée B) d’une méthode de biologie médicale
Document SH FORM 44	23/03/2011	Fiche type qualitatif vérification (portée A) / validation (portée B) d’une méthode de biologie médicale

## 6. Exigences de la norme NF EN ISO 15189 en matière de validation/ vérification des méthodes de biologie médicale

Les exigences de maîtrise analytique de la norme NF EN ISO 15189 s'expriment en ces termes :

-Dans le paragraphe 2 du chapitre 5.5 (Procédures analytiques) : « *Le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaire pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e). Le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation.* ».

Ainsi que dans les deux paragraphes suivants :

- § 5.3.1.2 : « *Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre la performance nécessaire et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. Cette exigence s'applique au matériel utilisé dans le laboratoire, au matériel prêté ou au matériel utilisé dans des locaux associés ou mobiles par des tiers autorisés par le laboratoire.* »

- § 5.5.1.1 : « *Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue.* »

- § 5.5.1.2 : « *Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement* »

« *La vérification indépendante menée par le laboratoire doit confirmer par l'obtention de preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les performances annoncées pour la procédure analytique ont été satisfaites. Les performances annoncées pour la procédure analytique confirmées pendant le processus de vérification doivent être appropriées à l'utilisation prévue des résultats d'examen. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la vérification et enregistrer les résultats obtenus.* »

- § 5.5.1.3 : « *Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes :a) les méthodes non normalisées ;b) les méthodes conçues ou développées par le laboratoire ;c) les méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu ;d) les méthodes validées, puis modifiées. La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles (sous la forme de*



*caractéristiques de performances), que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites. Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la validation et enregistrer les résultats obtenus. »*

En fonction du contexte, six stratégies de vérification/validation pourront être suivies :

**- Cas de l'utilisation d'une méthode avec des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro DMDIV marqués CE qu'elle soit quantitative, semi-quantitative ou normalisée:**

- **Stratégie 1** : vérification des performances annoncées par les fournisseurs ou souhaitées par le laboratoire lors de la mise en application d'une nouvelle méthode d'analyse utilisant notamment des analyseurs automatiques et des trousse de réactifs prêts à l'emploi. L'objectif de cette démarche est d'apporter au biologiste une confirmation in situ et la preuve de la validité des résultats rendus par rapport aux besoins définis.
- **Stratégie 2** : vérification rétrospective des performances dans le cas d'une méthode déjà utilisée par le laboratoire.
- **Stratégie 3** : validation partielle dans le cas de modifications effectuées : changement des conditions d'utilisation, pré-analytiques ou analytiques (par exemple : changement de matrice biologique, d'anticoagulant, d'équipement, de volume d'échantillon pour une adaptation à la pédiatrie, etc.).

**- Cas de l'utilisation d'une méthode mise au point (développée) au laboratoire**

- **Stratégie 4** : vérification ou validation d'une méthode qualitative réalisée pour les méthodes développées au laboratoire.
- **Stratégie 5** : validation d'une méthode semi-quantitative pour les méthodes développées au laboratoire.
- **Stratégie 6** : validation d'une méthode quantitative (portée B) réalisée pour les méthodes développées au laboratoire (immunologique, séparative, spectrométrique, etc.) [52, 53].

## 7. Procédure de validation / vérification des méthodes en biologie médicale.

Pour rappel, seule la phase analytique est envisagée en termes de « validation » de méthode, la phase pré-analytique, essentielle, est abordée notamment à travers la maîtrise des risques.

La figure 3 représente le logigramme de la validation/vérification des méthodes en biologie médicale [47].

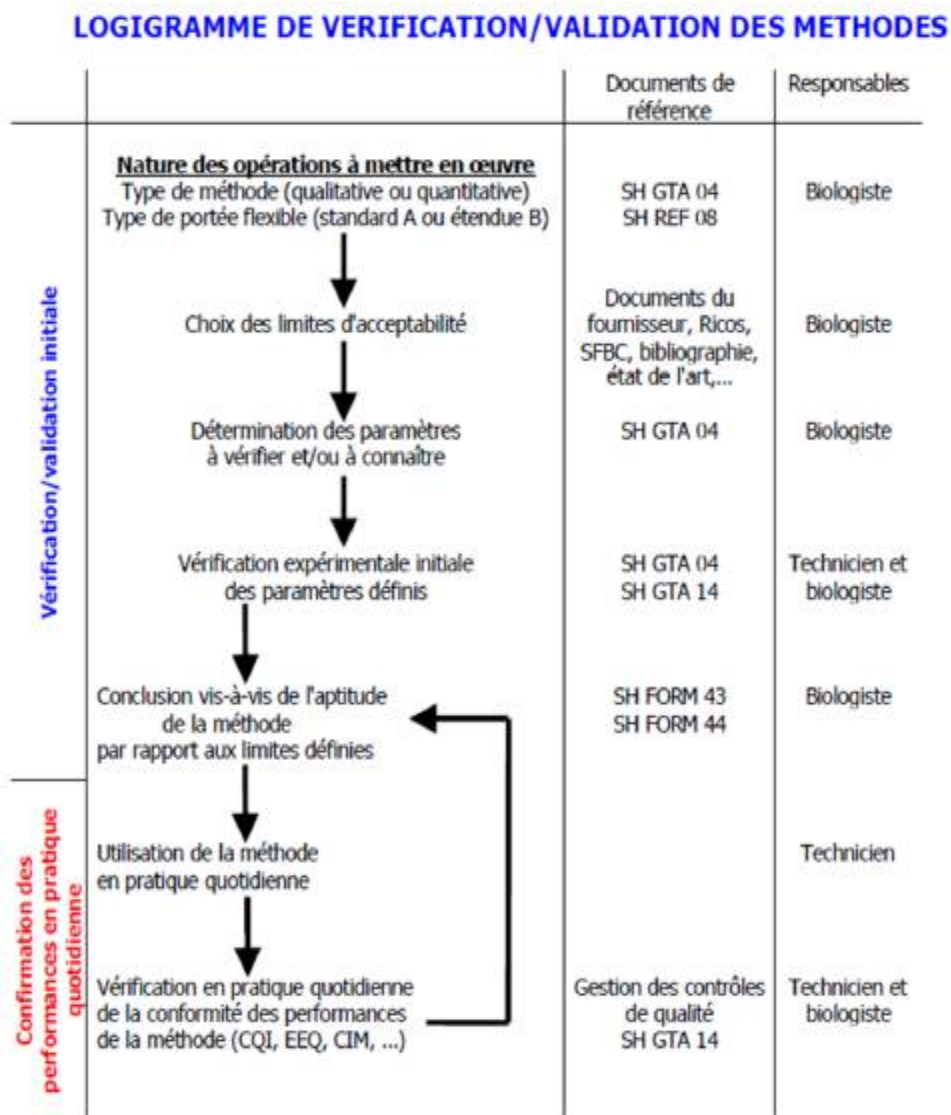


Figure 3: Logigramme de vérification / validation des méthodes d'après C. Lelievre [47]

## **7.1. Contenu d'un dossier validation / vérification des méthodes**

Un dossier de vérification de performance doit être réalisé pour chacun des paramètres mesurés par le laboratoire montrant les différentes étapes et formalisant les résultats, l'objectif est de conclure à la conformité des performances de la technique utilisée au laboratoire [54, 55].

Chaque dossier comporte généralement cinq parties :

- description de la méthode (processus analytique, maîtrise des risques)
- définition des critères de performances à évaluer et les limites acceptables
- vérification bibliographique
- vérification expérimentale
- conclusion
- déclaration d'aptitude de la méthode

## **7.2. Spécification et expression de la portée d'accréditation**

La portée d'accréditation est l'expression des compétences du laboratoire et constitue « un énoncé formel et précis des activités » pour lesquelles le laboratoire est accrédité ou candidat à l'accréditation.

Dans le domaine de la biologie médicale, elle s'exprime par sous-domaine et famille, dont la liste est donnée par le document SH INF 50 [56], et sous forme d'un tableau mentionnant la nature de l'échantillon, l'expression de la nature de l'examen/analyse, le principe et la référence de la méthode d'analyse.

En biologie de la reproduction (BdR) et selon le document SH INF 50 du COFRAC [56], les activités d'AMP concerne le sous-domaine Biologie de la Reproduction (BDR) de la famille Hématologie-Immunologie-BdR et de la sous famille activités biologiques d'AMP (AMPBIOBM) (Tableau 2).

Tableau 2: Expression de la portée d'accréditation des activités AMP selon le COFRAC [56]

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
AP1	Échantillons biologiques d'origine humaine	Recherche et identification des spermatozoïdes, volume, mobilité, concentration	Méthode manuelle Examen direct macro- et microscopique, avec ou sans traitement (centrifugation, gradient,...) sur échantillon frais ou après décongélation	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Préparation de sperme en vue d'AMP (incluant la conservation de gamètes)
AP2	Liquides biologiques d'origine humaine	Détermination de la concentration des spermatozoïdes, mobilité	Méthode automatisée CASA, Cytométrie en flux, examen microscopique avec ou sans traitement (centrifugation, gradient,...)	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Préparation de sperme en vue d'AMP (incluant la conservation de gamètes)
AP3	Échantillons biologiques d'origine humaine	Examen cytologique : - Identification de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon (pronuclei, globules polaires, blastomères et fragments anucléés...)	Méthode manuelle et/ou automatisée Principe général des techniques :  Identification et caractérisation morphologique par microscopie optique sur échantillon frais ou après décongélation	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Suivi du développement de J1 à J6 post-insémination ou post-injection

### 7.3. Choix de la portée A ou B

Selon la norme NF EN ISO 15189: § 5.5.1.1 [2] :

*Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leurs utilisations prévues. L'identité des personnes effectuant les processus analytiques doit être enregistrée. Les exigences spécifiées (spécifications en matière de réalisation) pour chaque procédure analytique doivent faire référence à l'utilisation prévue de cet examen.*

*Note : Les procédures privilégiées sont celles spécifiées dans les modes d'emploi des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro ou celles qui ont été publiées dans des livres établis/faisant autorité, dans des textes ou des journaux revus par des pairs, ou des normes ou instructions de consensus internationales, ou des réglementations nationales ou régionales. »*

En application à ce paragraphe, le COFRAC a distingué deux types de portées [46] :

**La portée A** : concerne les méthodes utilisant des DMDIV marqués CE, la validation par le LBM sera réduite à une « vérification » des performances annoncées par les fournisseurs ou souhaitées par le laboratoire lors de la mise en application d'une nouvelle méthode d'analyse utilisant notamment des analyseurs automatiques et des trousseaux de réactifs prêts à l'emploi.

L'objectif de cette démarche est d'apporter au biologiste une confirmation in situ et la preuve de la validité des résultats rendus par rapport aux besoins définis.

**La portée B** : il n'existe pas de DMDIV ou ils ne sont pas applicables dans le laboratoire ou il a été procédé à une modification critique des conditions d'utilisation.

Il s'agit alors d'une méthode développée par le laboratoire qui nécessitera une validation des performances plus approfondie.

#### **7.4. Choix du type de flexibilité**

Le COFRAC comme organisme accréditeur a mis cette disposition afin de permettre aux LBM des révisions successives des méthodes normalisées ou reconnues dès lors qu'elles n'impliquent pas de nouvelles compétences, ce qui permet au laboratoire de changer d'équipements ou de kits réactifs fournisseur en fonction de l'évolution technologique et de continuer à mettre en œuvre sous accréditation les méthodes, pourvu que le principe de la méthode reste semblable.

On distingue :

**La portée fixe** : une liste de méthodes d'essais/d'étalonnages précisément définies, dont le laboratoire ne peut s'écarter sans accord préalable du COFRAC.

**La portée flexible** : est une portée dont l'expression permet au laboratoire une certaine flexibilité quant à l'utilisation de son accréditation.

Le laboratoire est alors accrédité non pas sur un ensemble d'analyses listées précisément, mais sur un ensemble défini de champs de possibilités techniques et analytiques: ensemble de natures d'échantillon biologique, ensemble de natures d'examen, ensemble de principes de méthode tels que définis dans sa portée d'accréditation.

## **7.5. Choix de la nature de la méthode à valider**

Pour la validation-vérification des méthodes, il est nécessaire de distinguer deux types de méthodes:

- les méthodes de type quantitatif : elles fournissent une information sur la quantité d'un mesurande grâce à la mesure d'un signal sur une échelle continue.
- les méthodes de type qualitatif : le résultat n'apporte aucune information sur la quantité mais seulement sur la présence ou l'absence d'un analyte (cellule ou organisme), ou l'identification de la caractéristique recherchée.

Les résultats des méthodes assimilées comme semi-quantitatives ou semi-qualitatives sont à considérer comme étant des méthodes quantitatives [46].

## **7.6. La description de la méthode**

Pour un analyte ou un mesurande, elle doit définir le principe de la mesure et la méthode de mesure, préciser si les réactifs sont marqués CE ou pas, ce qui influence la nature de la portée flexible (obligatoirement B s'ils ne sont pas marqués CE).

## **7.7. La définition des critères de performances à évaluer**

Les critères de performance sont des indicateurs techniques suivis régulièrement, ils sont l'équivalent du CIQ continue de la biologie polyvalente [96,97], ils déterminent la fiabilité des résultats obtenus d'une période à l'autre et participent également à l'amélioration continue.

Le choix des critères de performances (spécificité, sensibilité...) et limites d'acceptabilité (seuils) pour une méthode donnée doit se faire préalablement à l'étude expérimentale.

Il doit refléter l'état de l'art et la pertinence clinique sans oublier le bon sens et l'expérience et peut s'appuyer sur des recommandations de sociétés savantes, de groupes de travail, de conférences de consensus, de publications scientifiques, sur des valeurs limites utilisées pour la gestion du contrôle interne de qualité (CIQ), sur des résultats de campagnes de comparaisons inter-laboratoire (CIL) et sera confronté aux données du fournisseur [48].

Le tableau 3 regroupe les paramètres à valider en fonction de la nature des méthodes et du choix des portées d'accréditation.

<b>Tableau 3: Paramètres à valider/vérifier pour les méthodes quantitatives et qualitatives (d'après le SH GTA 04 [46])</b>				
<b>Critères à évaluer</b>	<b>Vérification (portée A)</b>		<b>Validation (portée B)</b>	
	<b>Méthode quantitative</b>	<b>Méthode qualitative</b>	<b>Méthode quantitative</b>	<b>Méthode qualitative</b>
<b>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</b>	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Justesse/exactitude (approche)</b>	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</b>	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<b>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire</b>	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Intervalle de mesure</b>	Bibliographie	-	Essai	Essai
<b>Interférences</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Robustesse</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Stabilité réactifs</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Intervalle de référence</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Limite de détection</b>	-	Bibliographie	-	Essai
<b>Spécificité/sensibilité analytique</b>	-	Bibliographie	-	Essai

Des recommandations sur le choix des critères de performance des méthodes AMP sont établies dans le SH GT 05 [44] et figurent dans le tableau 4.

Tableau 4: Recommandations sur la vérification/validation d'une méthode d'AMP selon le SH GTA 05 [44].		
Activité biologique d'AMP	Méthode	Modalités de vérification/validation
Préparation spermatique (numération, mobilité, ...)	Manuelle	Dans le cadre de l'AMP, la validation de méthode de la préparation spermatique concerne à minima la concentration et la mobilité.
Concentration spermatozoïdes	Manuelle	<i>Un des référentiels utilisés peut être le RICOS</i> -Répétabilité -Fidélité intermédiaire -Variabilité inter-opérateurs - Exactitude (EEQ) -Sensibilité et spécificité analytique - Incertitudes - Etendue de mesure (limite basse) -Comparaison de méthode -Interférences -Contamination - Valeur de décision clinique
Mobilité	Manuelle	-Variabilité inter-opérateurs -Contamination -Valeur de décision clinique
Identification des ovocytes : Recherche des complexes cumulo- ovocytaires	Manuelle	Le laboratoire doit mettre en place un protocole de vérification lui permettant de mesurer la sensibilité de sa méthode de recherche.
Identification des ovocytes : évaluation de la qualité des ovocytes, zygotes, embryons	Manuelle	Dans le cadre de l'AMP, la validation de méthode de la <b>sous-famille AMPBIOBM</b> repose essentiellement : - sur la justification des procédures retenues (fournisseurs, publications, référentiels) sur une étude de risque permettant de maîtriser l'ensemble des facteurs impactant l'échantillon à observer -la formation/habilitation du personnel, le maintien des compétences du personnel - le suivi d'indicateurs de performance du personnel et du centre.



## 7.8. La vérification bibliographique

Une vérification bibliographique critique prend toute son importance dans le dossier de validation/vérification, le recueil pertinent des éléments de bibliographie peut se faire à partir des références bibliographiques, standards nationaux et internationaux, notices fournisseurs, documents internes au laboratoire) correctement référencés et accessibles [46].

Le biologiste devra évaluer et apprécier ces informations à la lueur des recommandations ou des textes réglementaires, des critères de performance proposés par des sociétés savantes et des attentes du prescripteur [49].

## 7.9. La vérification expérimentale

Elle consiste à réaliser la validation selon un protocole défini et à exploiter les résultats afin d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions opératoires du laboratoire.

### 7.9.1. La vérification expérimentale des performances d'une méthode quantitative d'AMP

En AMP, les méthodes quantitatives concernent principalement les techniques de spermologie.

Dans une méthode quantitative, la vérification expérimentale passe par l'estimation de l'erreur de justesse, ou biais systématique, et de l'erreur aléatoire, qu'il faut combiner pour vérifier si la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés. Ceci passe par différentes étapes à partir de la vérification de la normalité de la distribution des mesures, estimation des composantes de l'incertitude de mesure, fidélité, justesse, spécificité puis définition des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode [170].

Les critères de performance d'une méthode manuelle quantitative en biologie médicale sont reportés dans le tableau 3 et la figure 4 [58, 59, 57, 60,61], on distingue :

#### - La fidélité (precision) :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre les indications d'une valeur mesurée obtenue par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées [60, 62, 63].

Elle traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires dues au hasard et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

La valeur attendue d'un résultat peut différer sensiblement de la valeur vraie de ce même résultat, cette dernière est obtenue à partir d'une méthode de référence, en revanche la valeur attendue est associée à un protocole opératoire donné.

Pour le paramètre biologique d'un échantillon, il n'existe qu'une valeur vraie, mais autant de valeurs attendues qu'il existe de méthodes de dosage [64].

**- La répétabilité (repeatability, within run precision)**

C'est le degré d'accord entre les résultats individuels provenant d'analyses répétées d'un échantillon utilisant la même méthode et sous des conditions identiques [60] : même procédure de mesure, même opérateur, même système de mesure, mêmes conditions de fonctionnement, même milieu, même objet de mesure pendant une courte période de temps [60, 65, 49].

Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique, les données acquises peuvent être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps.

**- La fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire (intermediate precision)**

Elle est obtenue par l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes [49].

Cette évaluation permet de connaître la variabilité analytique d'une méthode, ces données sont exploitées pour le calcul de l'incertitude de mesure utile à l'interprétation des résultats des patients [66].

**- La justesse / exactitude (accuracy)**

Historiquement, pour l'ICH, il n'y a pas de distinction entre les deux termes "exactitude" et "justesse", ils ont la même définition (I.C.H., 1997) [67] qui est l'écart de l'accord entre la valeur moyenne d'une série de résultats d'essais et une valeur acceptée comme vraie.

Par contre, le COFRAC distingue la justesse de l'exactitude, il définit la justesse comme étant l'écart de l'accord entre la valeur moyenne d'une série de résultats d'essais et une valeur acceptée comme vraie et définit l'exactitude comme l'écart de l'accord entre un résultat d'essais et la valeur de référence acceptée [68, 52].

### **Approche de la justesse**

La justesse est quantifiée par le biais relatif estimé en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de la fidélité intermédiaire à la valeur cible attendue assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé.

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times ((m-v)/v)$$

### **-L'étendue de mesure**

L'évaluation de l'étendue de mesure ou des limites de linéarité permet de déterminer l'intervalle de concentrations à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fidélité et justesse, ces limites (limite inférieure ou limite de quantification et limite supérieure) sont des caractéristiques de la méthode et des conditions dans lesquelles elle est mise en œuvre.

En d'autres termes, c'est la capacité de la méthode à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité.

Son évaluation consiste à déterminer les limites de validité de la relation linéaire existante entre les concentrations observées et les concentrations théoriques des dilutions d'un spécimen, elles sont relatives aux résultats [concentrations calculées = f (concentrations introduites)] [53].

La limite de quantification est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon et qui peut être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une justesse définies, elle correspond généralement à la limite inférieure de linéarité de la méthode.

### **- L'incertitude de mesure**

L'estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats est une exigence de la norme NF EN ISO 15189 (§ 5.5.1.4) :

*« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée... » ; « ...doit définir les exigences de performances pour l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure, et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure » ; « Le laboratoire doit tenir compte de l'incertitude de mesure lors de l'interprétation des grandeurs mesurées. »*

Selon le vocabulaire internationale de métrologie VIM [60], l'incertitude est un paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande, c'est un indicateur de la qualité d'un résultat d'analyse et de la fiabilité qu'on peut lui accorder et c'est une partie de l'expression du résultat de l'analyse.

Cette étape comprend à la fois l'étude des risques et l'estimation de l'incertitude sur les résultats d'analyses.

Différentes méthodes sont utilisables pour évaluer l'incertitude des résultats d'analyse, parmi elles :

- l'approche "essais d'aptitude" (comparaisons inter-laboratoires) : elle se fonde sur l'observation de la dispersion des écarts entre les valeurs individuelles de chacun des laboratoires participants à une comparaison inter-laboratoire (CIL) et une valeur assignée ("valeur cible").
- l'approche "caractéristiques méthode" : se fonde sur l'utilisation des données de validation d'une méthode d'analyse où les principales caractéristiques de la méthode telles que la répétabilité, la reproductibilité et la justesse interviennent dans l'évaluation de l'incertitude d'analyse.
- la combinaison de l'approche "essais d'aptitude" (comparaisons inter-laboratoires) qui correspond davantage aux pratiques des LBM avec l'évaluation externe de la qualité et l'approche "caractéristiques méthode" qui permet d'évaluer la reproductibilité intermédiaire suivant les recommandations du document LAB GTA 14 du COFRAC [50] (utilisation des CV de fidélités intermédiaires obtenues à partir des CIQ et des biais exprimés en pourcentage observés à partir de la CIL).

**- La contamination inter-échantillons (carry-over)**

C'est un phénomène qui résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié.

L'étude de la contamination d'un échantillon de concentration élevée de l'analyte à un autre échantillon de niveau faible (carry-over ou « effet mémoire ») est importante car la contamination des échantillons altère l'exactitude des mesures [71].

### **- La spécificité/sensibilité analytique**

Une méthode d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.

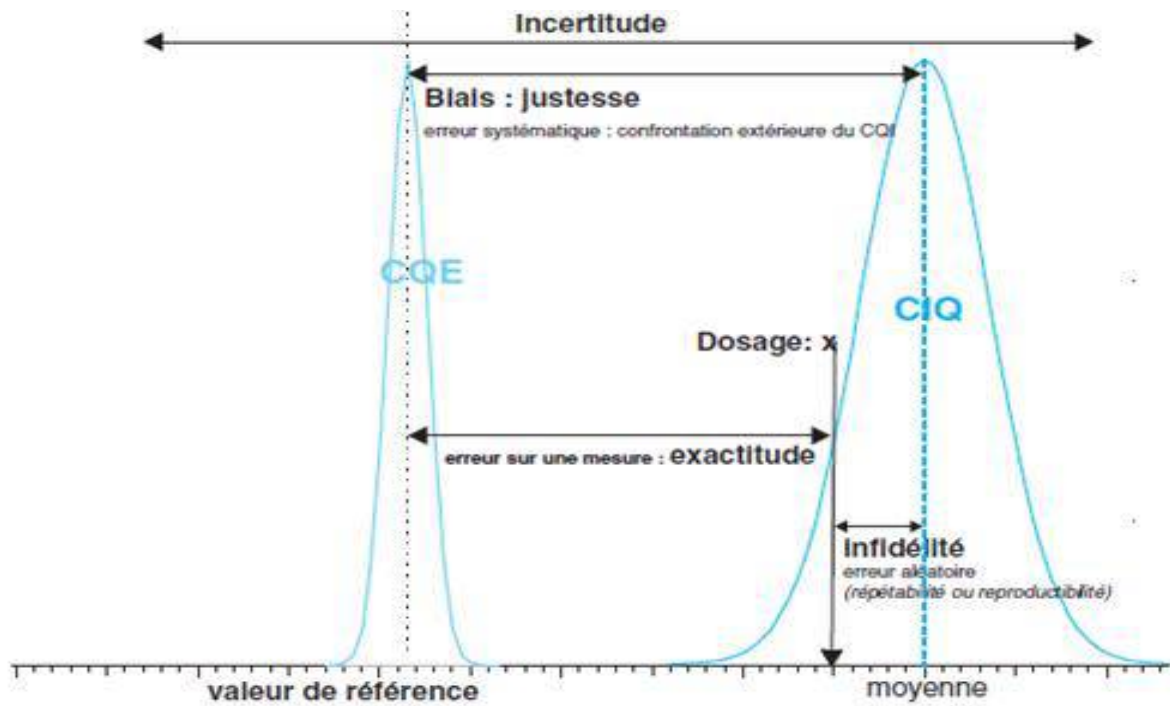
La sélectivité d'une méthode analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents [66,49].

### **- La comparaison de méthode**

Consiste à évaluer les résultats obtenus avec une méthode par rapport à ceux d'une autre méthode, si cette dernière est une méthode de référence, des conclusions sur la justesse de la méthode testée peuvent être formulées.

Cette évaluation est destinée à mettre en évidence des différences qui peuvent nuire à l'interprétation des résultats [6,53].

La comparaison des deux méthodes selon les recommandations de Bland-Altman [70] permet d'estimer les relatives différences entre les deux méthodes en fonction des moyennes des concentrations mesurées par chaque méthode. Cela permet de définir le biais entre les deux techniques, son écart type et son intervalle de confiance à 95 %.



**Figure 4:** Les performances d'une technique évaluables à partir des données du contrôle qualité [d'après le SH GTA 06] [49].

## 7.9.2. La vérification expérimentale des performances d'une méthode qualitative d'AMP

Dans les méthodes qualitatives, la vérification bibliographique critique prendra donc ici toute son importance et inversement, la vérification expérimentale sur site sera plus réduite, et s'appuiera fortement sur l'étude des indicateurs de performances et la maîtrise des risques.

### 7-9-2-1- L'analyse des risques et les composantes d'incertitudes

C'est l'étape la plus importante dans la validation des méthodes qualitatives, la maîtrise des risques relève d'un processus d'analyse, réalisé au préalable, et qui précède la stratégie de mise en place des moyens de contrôle qualité [47].

Il s'agit de dresser l'inventaire des modes de défaillance potentielles et d'établir un plan d'action (exigences relatives au management, le paragraphe 4.1 de la norme NF ISO 15189) en :

- identifiant les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure à travers une analyse de risque ;
- identifiant ceux qui ont une influence significative sur les résultats en précisant les raisons de cette décision.
- apportant la preuve de la maîtrise de ces facteurs [105].

L'étude des risques peut se faire selon différentes approches dont la méthode 5 M (ou diagramme de cause à effet ou diagramme d'Ishikawa), cette méthode permet l'analyse des situations en se basant sur 5 critères qui sont [48,73] :

- **Matières** : en pratique, il s'agit de l'échantillon primaire et des récipients utilisés.
- **Milieu** : c'est le lieu de travail et notamment son aménagement et son organisation, environnement physique, éclairage, bruit, conditions ambiantes requises pour réaliser une manipulation (ex : température, hygrométrie,...).

L'objectif de la norme ISO 15189:2012 est d'avoir une cohérence entre l'organisation des postes de travail dans des locaux existants et la nécessité d'une marche en avant du processus analytique qui garantit à la fois la qualité des prestations et la sécurité des personnes et de l'environnement.

La norme ISO 15189 [2, 110] détermine les exigences suivantes :

- ressources suffisantes pour réaliser les activités du laboratoire et assumer la charge de travail prévue sans compromettre la qualité du travail ;
- conception du laboratoire de manière à assurer l'efficacité de son fonctionnement et optimiser le confort de ses occupants ;
- présence des procédures de maîtrise de la qualité, la sécurité du personnel et les soins prodigués aux patients ;
- zonage des activités afin d'éviter les contaminations croisées.

Elle laisse le laboratoire libre des modalités pour y parvenir.

Pour les conditions environnementales (température, hygrométrie, pression d'air, ...), le laboratoire définit celles susceptibles d'influer sur la qualité des examens, d'après les spécifications fournisseurs ou autres recommandations publiées dans la littérature.

Idéalement, un laboratoire d'AMP est constitué [109,110]:

- **des zones d'activité** avec des zones classées en surpression avec un environnement d'air de classe D et des zones non classées clairement identifiables et font l'objet d'une signalisation adaptée.

Les techniques impliquant la manipulation des gamètes et des embryons doivent être effectuées dans un environnement contrôlé de classe A. Toutefois, s'il est préjudiciable ou impossible d'effectuer une procédure spécifique dans un environnement classe A, elle peut être réalisée dans au moins un environnement de classe D.

Les locaux sont sécurisés en vue de la confidentialité des données et la sécurité des gamètes et embryons conservés.

Les conditions d'accès sont définies et placées sous la responsabilité du responsable clinique ou biologique.

- **d'un local destiné au recueil de l'échantillon de sperme** : pour des raisons de traçabilité, le sperme est recueilli au laboratoire sauf circonstances exceptionnelles documentées dans le dossier médical du patient.

Des locaux privés sont mis à la disposition des patients, ils sont conçus de façon à assurer la confidentialité, le confort et les besoins du patient.



Ces locaux doivent se situés à proximité du laboratoire pour éviter les fluctuations de température et réduire le temps entre la collecte et la réception au laboratoire, ils doivent préserver l'intimité du patient et doivent être munis d'un lavabo pour le lavage des mains.

**Des zones annexes :** comportent les locaux pour le travail administratif, les vestiaires, les réserves destinées au stockage des produits et du matériel, à l'entretien des locaux, les zones réservées aux repas et repos du personnel et qui sont séparées des zones d'activités médico-techniques.

- **Méthodes :** ce sont les instructions, manuels, procédures, modes opératoires et flux d'informations.

**Les procédures analytiques :** le terme « procédures analytiques » qui est employé dans les § 5.5.1 et 5.5.2 et le premier alinéa du § 5.5.3 de la norme ISO 15189 concerne les techniques (méthodes) utilisées au laboratoire tandis que dans la suite du § 5.3, ce même terme concerne cette fois, le(s) document(s) que le laboratoire a lui-même rédigé(s) à propos du principe de fonctionnement, de l'étalonnage, des contrôles de qualité, des conditions de vérification d'un résultat, de la maintenance préventive, etc. conformément aux recommandations du fournisseur (portée flexible A) [107].

**Les modes opératoires:** ils correspondent à des versions abrégées de chacune des procédures principales et sont disponibles en version papier à la paillasse (sous forme de classeur à feuilletter « flyers »).

Le lien avec la procédure doit être identifié.

La revue des modes opératoires doit être réalisée selon une fréquence définie (en général tous les ans, au maximum tous les 2 ans).

Toute modification des pratiques doit entraîner la rédaction d'une nouvelle version, et l'archivage de l'ancienne version, ceci permettra une traçabilité précise et exhaustive des pratiques au sein du laboratoire [11].

**Les instructions :** elles peuvent être indépendantes ou incluses dans les documents ci-dessus. Il s'agit le plus souvent d'écrits relevant de « la conduite à tenir devant... ».

Les modes opératoires et fiches d'instructions décrivent avec le niveau de détail requis pour les besoins du personnel, les activités nécessaires pour assurer la qualité des prestations du laboratoire.

**Les documents des fournisseurs:** chaque système analytique est doté d'un manuel utilisateur, de tableaux de maintenance préventive, et plus généralement des documents nécessaires à la bonne utilisation.

Les trousseaux de réactifs possèdent des fiches descriptives et des recommandations inscrites qui doivent être respectées par l'utilisateur. Ces fiches doivent être revues régulièrement (une modification peut passer inaperçue) [107].

**Les enregistrements:** ce sont les preuves des activités effectuées ou des résultats obtenus, ils peuvent être apportés par l'intermédiaire du dernier niveau des documents qualité les « *formulaires d'enregistrement* » qui deviennent des « *enregistrements qualité* » dès qu'ils sont renseignés.

Tous les documents qualité doivent faire l'objet d'une révision périodique avec un temps prédéfini de 18 à 24 mois et de 12 mois pour les documents techniques.

On distinguera la revue documentaire sans modification du texte de la révision qui prend en compte les changements comme, par exemple, les modifications des modalités techniques ou encore la réactualisation des références bibliographiques [111].

- ***Main-d'œuvre:*** la majorité des activités en AMP est opérateur dépendant d'où l'importance de l'habilitation de l'ensemble des personnels biologistes et techniciens afin d'avoir du personnel qualifié, formé, évalué et habilité.

Ce processus d'habilitation est une obligation, elle passera par un contrôle de l'homogénéité des pratiques au sein du laboratoire.

il faut distinguer d'une part, celle du personnel déjà présent au sein du laboratoire depuis plusieurs années et qui se fera a posteriori sur la base de l'acquis des connaissances, et d'autre part l'habilitation du personnel nouvellement embauché pour lequel il est important de mettre en place une période de tutorat.

On peut distinguer plusieurs étapes dans ce processus :

**La qualification initiale** : c'est la formation initiale prouvée par les diplômes obtenus lors du cursus scolaire ou universitaire.

**La formation interne ou externe.**

**Le plan de tutorat** : c'est une étape importante et peut être le seul moment où des notions très critiques tels que l'hygiène et la sécurité au travail seront traités avec l'agent.

Durant cette période, deux phases vont se succéder :

- une première phase d'observation pendant laquelle le nouvel opérateur va observer les actions réalisées par le référent au poste.
- puis une phase de réalisation pendant laquelle il va effectuer les actions sous la surveillance du référent.

Toutes les preuves du tutorat sont à conserver dans le dossier du personnel.

Après validation de la phase tutorat par la direction, la personne est habilitée à un poste de travail [51].

Les critères de qualification du personnel sont au choix du LBM, ils sont fixés par la direction du laboratoire et varient en fonction de l'activité du laboratoire tout en intégrant la notion de la courbe d'apprentissage en fonction du temps et par comparaison à un référent interne.

Cette habilitation doit être renouvelée à intervalles définis en cas d'absence prolongée (consensus 6 mois), de façon systématique tous les deux ans et en cas d'erreur critique répétée.

- **Matériel** : il s'agit d'équipements et automates, la gestion des équipements passe par :

**1-la rédaction des cahiers des charges** préalable à l'achat d'un matériel où le laboratoire en s'appuyant notamment sur des références bibliographiques justifie ses choix d'équipements, désigne ses besoins réels en termes de fonctionnement, de critères d'acceptation ou de spécifications.

Cette étape sert de base à l'étape suivante dite de qualification initiale.

**2- la qualification** : permet de confirmer l'aptitude au besoin en assurant et en documentant que le matériel réceptionné correspond aux besoins formulés, dans l'environnement du laboratoire [119].

Classiquement, on distingue :

- la qualification d'installation avec la réception et l'installation du matériel, ce processus est accompli par l'ingénieur technique du fournisseur et doit se faire bien entendu en présence du service biomédical, des opérateurs et sous leurs contrôles.
- la qualification opérationnelle où on vérifie que le matériel est en état correct de fonctionnement et que les fonctionnalités générales sont présentes.

- la qualification de performances par laquelle on s'assure qu'effectivement le matériel permet d'atteindre, sur le site du laboratoire, les performances analytiques ou métrologiques requises, et de les maintenir dans le temps. Cet aspect est lié avec le suivi des opérations d'étalonnage et de vérification, ainsi qu'avec la validation des méthodes [112, 117, 118,119].

**3- l'identification univoque et l'inventaire** : c'est une exigence de la norme NF EN ISO 15189:2012 qui ne doit pas relever d'une simple énumération des divers instruments assortis de leurs codifications, mais plutôt d'un véritable recensement par nature, qui facilitera la définition de la politique métrologique et du suivi du parc (utilisation, vérification, renouvellement), on distingue [120,121] :

**Le dossier équipement** : il est utile dès la commande d'un équipement, il contient :

- les articles et les relevés d'évaluation externe de la qualité concernant l'équipement
- les relevés des performances obtenues lors de l'essai de l'équipement
- les doubles des bons de commandes, de livraison, et d'installation

**Le classeur équipement** : comprend la documentation du fabricant ainsi que l'ensemble des documents et instructions nécessaire à la gestion de cet équipement.

**Les documents d'enregistrement** : tous les enregistrements doivent être lisibles, stockés et conservés de façon à être facilement retrouvés.

**La fiche d'identification** : c'est une description comptée de l'équipement : le numéro d'identification à l'inventaire, la marque, le type, le numéro de série, le nom du fabricant et les coordonnées du service après-vente, les caractéristiques techniques, les exigences électriques, fluidiques (gaz, eau) et environnementales (température, humidité).

La rédaction de cette fiche technique ne pose généralement pas de difficultés particulières, le rédacteur se base sur la documentation fournie par le fabricant.

**L'étiquette métrologique** : une étiquette lisible et si possible indélébile doit être opposée sur l'appareil afin de connaître sa situation métrologique, elle peut comporter l'identification de l'instrument, la date de dernier étalonnage, la date du prochain étalonnage et le visa.

Quand l'équipement fait l'objet d'une sous traitance, c'est la société concernée qui oppose sa propre étiquette.

**La fiche de vie :** permet de suivre dans le temps l'évolution de l'équipement et d'assurer la traçabilité des diverses interventions sur le matériel, elle doit être placée à proximité de l'équipement, sur laquelle sont indiqués sous forme d'un tableau la nature et les résultats des différentes interventions métrologiques et tous renseignements jugés utiles pour les utilisateurs.

Grâce à cette fiche, on peut prendre la décision de remplacer un appareil vieillissant.

**Le certificat d'étalonnage et constat de vérification :** l'étalonnage conduit à l'émission d'un certificat d'étalonnage dont l'exploitation permet par application de corrections systématiques de réduire l'incertitude associée aux mesures, il donne lieu à un résultat chiffré associé à un calcul d'incertitudes.

La vérification métrologique est l'opération qui permet de s'assurer que les erreurs de mesure assorties de leur incertitude sont toutes inférieures aux écarts maximaux tolérés (EMT) [122] et de porter ainsi un jugement de conformité ou de non-conformité sur un équipement, elle conduit à l'émission d'un constat de vérification [123] à destination de l'utilisateur lui permettant de connaître le statut de son équipement.

**4- La gestion de la fonction métrologie :** la politique métrologique est la responsabilité principale de la fonction métrologie.

La fonction métrologie au sein du laboratoire a la responsabilité administrative et technique de définir et de mettre en œuvre le système de management de la mesure [131], elle doit définir les orientations et politiques de raccordement au système international (SI), les procédures de gestion des instruments et des processus de mesure et d'assurer l'application et la traçabilité documentaire.

Elle permet l'identification du type de raccordement métrologique utilisé, sa périodicité et la mise en place d'un planning d'étalonnage afin de permettre aux résultats d'être traçables par rapport aux unités du SI selon les recommandations du SH REF 02 [132, 43,118].

En pratique, la fonction métrologie consiste à:

- énumérer les types de raccordements métrologiques employés,
- mettre en place un programme d'étalonnage pour chaque grandeur afin d'assurer la traçabilité au SI,
- effectuer la confirmation métrologique des équipements des mesures critiques (déclaration d'aptitude).

### **7-9-2-2- Définition des indicateurs de performances**

Le choix de ces indicateurs devra être en adéquation avec les références internationales et les seuils calibrés en rapport à une population de référence.

### **7-10- Conclusion**

Consiste à rédiger le compte rendu de la validation en y déclarant l'aptitude, en introduisant le calcul de l'incertitude de mesure et des éléments de maîtrise de l'assurance qualité des résultats et en prévoyant la prise en compte systématique de toute évolution et modification à venir [76] .

Si lors de la validation des méthodes, ces étapes sont toutes respectées, le laboratoire pourra :

- appliquer sa méthode sereinement en rédigeant les modes opératoires adaptés aux risques.
- organiser la formation et l'habilitation de son personnel à l'application de la méthode.
- gérer l'assurance de la qualité de ses résultats.

## **8. La confirmation des performances en routine**

La vérification d'une méthode comprend une phase initiale, avant sa mise en œuvre effective en routine et une phase de vérification continue et de confirmation des performances dans le cadre du fonctionnement normal et quotidien du laboratoire, il s'agira de prouver formellement en continu les performances initialement démontrées [46].

### **8.1. Le suivi des performances des méthodes quantitatives d'AMP.**

Pour maîtriser pleinement une méthode, l'utilisation, la gestion et le suivi des contrôles de qualité internes (CIQ) et externes (EEQ) si disponibles, sont indispensables [77].

#### **8.1.1. La gestion des contrôles qualité en spermologie**

Les contrôles qualité représentent sans doute l'opportunité la plus intéressante à plusieurs niveaux : technique (validation/vérification de méthodes), pour le personnel (maintien des compétences), et humain (favorise les échanges au sein du laboratoire).

La conception et la mise en œuvre du contrôle de qualité (CIQ /EEQ) sont destinées à assurer la maîtrise nécessaire et suffisante à un coût raisonnable, et à permettre une détection rapide et efficiente des anomalies, sans alerte inutile [49].

Ils permettent en appréciant l'erreur aléatoire d'assurer la qualité des procédures analytiques et des résultats (validation analytique, vérification des performances, évaluation des réactifs, des méthodes, comparaisons inter-laboratoires, etc.),

La finalité des contrôles qualité (CQ) est de maîtriser le processus analytique.

On distingue :

**Le contrôle interne de qualité** : ensemble de procédures destinées à être conduites dans un laboratoire pour surveiller les performances de ce laboratoire.

Elles sont mises en place par la direction du laboratoire pour surveiller en continu les opérations et les résultats des mesures et pour décider si les résultats sont suffisamment fiables pour être communiqués [78, 79, 65,80].

**Le contrôle interne de qualité externalisé (CIQ externalisé)** : c'est un CIQ qui est réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles, les résultats des différents laboratoires peuvent être confrontés entre eux en établissant les moyennes et en estimant la justesse (biais) [49].

Le CIQ externalisé n'est pas considéré comme une évaluation externe de la qualité [43].

**Le contrôle externe de qualité (CEQ) ou évaluation externe de la qualité (EEQ)** : procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter-laboratoires réalisée par une tierce organisation.

Les matériaux de contrôle externe de la qualité sont ceux utilisés dans ce cadre.

Même si cela semble assez logique, les EEQ ne peuvent être en principe validées que si la structure les réalisant est elle-même accréditée par la même norme, ceci conduit à limiter le nombre de structure réalisant une EEQ reconnue par l'organisme d'accréditation [81].

### **8.1.2. Les différents types d'échantillons de contrôle de qualité en spermiologie**

En spermiologie, plusieurs types de CQ peuvent être utilisés:

**Les contrôles qualités commerciaux** : ce type de contrôle est fourni avec sa valeur moyenne ainsi que les limites de contrôle, son avantage est la possibilité d'évaluer la fidélité et la justesse mais avec un inconvénient majeur qui est le cout élevé ainsi que la disponibilité.

**Les contrôles qualités préparés in situ** : ils peuvent être générés spécifiquement pour les besoins du laboratoire avec un coût réduit.

De nombreux échantillons, couvrant un large éventail de résultats, peuvent être conservés pendant de longues périodes. Leurs inconvénients résident dans leurs valeurs cibles inconnues.

**Les contrôles qualités conservés (commerciaux ou préparés in situ) :** leurs valeurs cibles sont connues (pour les échantillons commerciaux) ou estimées à partir de plusieurs mesures de sorte que des erreurs systématiques peuvent être détectées [82, 83,84].

### **8.1.3. Choix des niveaux de concentrations et des fréquences de contrôles.**

Idéalement, le contrôle qualité porte sur différents niveaux de concentrations (au minimum 2) et notamment proche des seuils de décision clinique.

La fréquence est déterminée en fonction du risque accepté, de la stabilité des performances du système analytique et des règles d'interprétation utilisées (taux de détection des non-conformités) [65].

### **8.1.4. Exploitation des contrôles qualité**

Les résultats sont colligés dans un rapport « référent » qui permet le calcul des moyennes, écarts types et coefficient de variation (CV) des techniciens, ainsi que les biais.

Une interprétation régulière de l'ensemble des contrôles par les biologistes et les techniciens est recommandée, la direction du laboratoire doit en effet participer à la mise en œuvre des actions correctives lorsque les critères de maîtrise ne sont pas respectés [49].

## **8.2. Suivi des performances d'une méthode qualitative d'AMP**

En AMP, il n'existe pas de contrôle de qualité interne au sens classique de la biologie polyvalente. L'évaluation des performances analytiques doit s'effectuer par le suivi des indicateurs de performance déjà établis et la maîtrise des risques aux trois étapes pré, per et post-analytiques ainsi que la gestion des compétences humaines à travers l'évaluation et le suivi des performances des opérateurs techniciens et biologistes [5,44].



***Deuxième partie : Vérification  
des performances de la méthode  
qualitative d'AMP  
« Identification morphologique  
de l'ovocyte, du zygote  
et de l'embryon »***

## **1. Objectifs**

L'objectif de la vérification de la méthode « identification morphologique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon » est de :

- contribuer à répondre aux exigences de la norme ISO 15189: 2012 en terme de vérification des performances d'une méthode qualitative en portée flexible B ;
- démontrer que notre méthode fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire, qu'elle donne des résultats sûrs et fiables pour les patients et les cliniciens ;
- rédiger un manuel de prélèvement propre au laboratoire d'AMP du CSR ;
- présenter et discuter les résultats des indicateurs de performance que nous avons choisis pour notre méthode appliquée dans les conditions opératoires du laboratoire,
- présenter les résultats de notre maîtrise de risque,
- présenter les moyens mis en place pour l'implémentation de la fonction métrologie au sein du laboratoire AMP,
- prouver que les opérateurs (biologistes et techniciens) identifient morphologiquement les embryons avec un minimum de subjectivité inter et intra-observateurs.

## **2. Méthodologie**

### **2.1. Identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon**

#### **2.1.1. Matériel**

La méthode identification morphologique de l'ovocyte, zygote et de l'embryon est une méthode d'identification et de caractérisation morphologique par microscopie optique qui requiert le matériel et les milieux suivants :

- boîtes de pétri en polystyrène transparent traitées pour cultures cellulaires avec un diamètre de 60 mm × 15 mm stériles par irradiation gamma destinées à la culture des gamètes et des embryons, non embryotoxiques, marquées CE.

- boîtes de pétri en polystyrène transparent traitées pour cultures cellulaires avec un diamètre de 35 mm × 10 mm stériles par irradiation gamma destinées à la culture des gamètes et des embryons, non embryotoxiques, marquées CE.
- dénudant pipettes d'un diamètre de 135 µm pour dé-coronisation des ovocytes, stériles par irradiation gamma, destinées à la fécondation in vitro, marquées CE.
- tubes à fonds ronds de 14 ml à bouchon d'aération en polystyrène transparent stériles par irradiation gamma avec aplats et graduations, marqués CE.
- tubes coniques de 15 ml en polypropylène transparent stériles par irradiation gamma : bouchon vissant avec graduations et plage d'écriture, marqués CE.
- microscope à contraste de phase avec platine chauffante Olympus IX 71
- stéréomicroscope avec plaque chauffante Olympus SZX7
- plaque chauffante Labotec® Hot plate 062
- incubateurs à CO<sub>2</sub> Thermo scientific HERAcell®240 i
- milieu de culture embryonnaire Global®
- milieu de fertilisation Fertipro®
- huile de paraffine Fertipro®

### **2.1.2. Méthodes**

À la suite du recueil ovocytaire, les ovocytes lavés sont mis en fécondation par une fécondation in vitro classique où la fécondation de l'ovocyte engendrera une série de divisions cellulaires jusqu'au stade quatre cellules à J<sub>2</sub> [86].

La culture embryonnaire est réalisée dans des microgouttes individuelles de 30µL de milieu de culture universel sous huile minérale et dans un environnement contrôlé à 5 % de CO<sub>2</sub> [87, 88, 89].

De tous les moyens d'appréciation de la viabilité des embryons conçus in vitro, la morphologie observée au microscope tient une place de choix du fait de sa spécificité et de son caractère non invasif [90].

L'objectif est de choisir l'embryon qui a la meilleure qualité et le potentiel implantatoire le plus élevé à travers un scoring et une classification à J<sub>2</sub> [91].

La classification en catégories des embryons à J<sub>2</sub> repose sur le nombre des cellules, l'aspect typique des blastomères (régulier, irrégulier) et les fragments anucléés évalués en proportion du volume intra-pellucidaire.

Nous utilisons au niveau de notre laboratoire d'AMP, le scorage embryonnaire à J2 que l'équipe du laboratoire a appris lors de sa formation à l'Hôpital Erasme, ainsi un embryon de 2-3 cellules à un score maximum de 4 points, celui à 4 cellules à 6 points.

Un point est retiré du score en présence d'une fragmentation inférieure à 30% du volume de l'embryon et deux points sont retirés si la fragmentation est supérieure ou égale à 30 %.

Un point est retiré si les blastomères présentent une forme irrégulière.

## **2.2. Validation de la méthode**

### **2.2.1. Référentiels de la validation de notre méthode**

La documentation bibliographique a une importance capitale dans la vérification des méthodes manuelles, nous nous sommes appuyés principalement sur:

- la NF ISO 15189:2012 [2].
- les recommandations (guidelines) de l'International Conference on Harmonization « *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)* [4],
- le guide de bonne exécution des analyses (GBEA) marocain [16],
- les guides techniques d'accréditations du COFRAC,
- le guide d'interprétation de l'ISO 15189 édité par le service marocain d'accréditation (SEMAC) [94],
- les publications scientifiques, les groupes de travail et les conférences de consensus [43,49, 76,20],
- les notices fournisseurs de tous les dispositifs marqués CE qui ont un double rôle, d'une part préciser les préconisations d'utilisation puis indiquer les performances annoncées par le fournisseur [95].

### **2.2.2. Détermination de la portée d'accréditation et du type de flexibilité**

Nous nous sommes basés sur les recommandations du COFRAC exprimées dans le document SH REF 08 [8] pour la détermination de notre portée d'accréditation et le type de flexibilité.

### **2.2.3. Détermination de nos critères de performance**

Nous avons choisi les indicateurs suivants sur la base des résultats de la méthode par rapport à la pertinence clinique et aux objectifs du laboratoire ainsi qu'en adéquation avec les références internationales [96, 97,74] :

- l'âge des patientes : paramètre important dans l'interprétation de nos résultats, l'augmentation de l'âge de la femme est associée à des modifications quantitatives et qualitatives de la réserve ovarienne.

La vitesse de disparition des ovocytes (déplétion ovocytaire) varie d'une femme à l'autre mais s'accélère à partir de 38 ans [98]. À cette diminution du nombre de follicules restants avec l'âge s'associent des altérations qualitatives des ovocytes.

Les techniques d'AMP ne parviennent pas à compenser le déclin naturel de la fertilité avec l'âge où selon le groupe de travail de l'ESHRE 2005, moins de 30 à 50 % de la perte de fertilité liée au retard à concevoir serait corrigée par l'AMP [99]

- le nombre d'ovocytes recueillis par ponction ovocytaire [100] ;
- le taux de fécondation défini par le nombre d'ovocytes fécondés au premier jour de développement embryonnaire sur le nombre d'ovocytes mis en fécondation ;
- le score moyen des embryons transférés ;
- le taux des embryons de qualité optimum (score > 5) : défini par le nombre d'embryons avec score > 5 par rapport à l'ensemble des embryons ;
- le taux de congélation embryonnaire défini par le nombre des tentatives avec congélation embryonnaire sur le nombre total des tentatives avec remplacement embryonnaire ;
- le taux de clivage défini par le nombre d'embryons à J<sub>2</sub> par rapport à l'ensemble des ovocytes fécondés [101,102] ;

- le taux de grossesse par transfert : défini par le nombre de  $\beta$  HCG positifs \*100 / nombre de transferts embryonnaires, le suivi de ce taux au cours des tentatives permet de mieux comparer les résultats entre les praticiens en diminuant les variations liées à l'âge des patientes, aux indications et à la qualité embryonnaire. Cet indicateur sert de témoin et d'alerte dans la surveillance de notre activité [103 ,104].

#### **2.2.4. La maîtrise des risques**

Notre étude de risque est faite selon l'approche 5M où les causes des risques sont classées en 5 familles à savoir : main d'œuvre, matière, matériel, méthode et milieu.

À cette méthode, nous avons associé une autre approche de l'analyse des risques qui est l'AMDEC (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité) [105].

Elle consiste à évaluer la criticité des risques et à hiérarchiser les défaillances potentielles ce qui facilite la recherche et la prise d'actions prioritaires.

Pour chaque mode de défaillance, nous avons déterminé :

- sa (ses) cause(s) ;
- sa fréquence (F), cotée de la façon suivante :
  - 1 pour une fréquence de 0 à 1 fois par an,
  - 2 pour une fréquence de 2 à 3 fois par an
  - 3 pour une fréquence supérieure à 3 fois par an ;
- sa sévérité (indice de gravité G) sur le processus analytique et ses incidences sur le traitement :
  - 1 pour aucune incidence,
  - 2 pour une incidence probable
  - 3 pour une incidence certaine
- son indice de détection D : la probabilité de détecter l'anomalie au cours du processus analytique incluant la phase pré et post-analytique :
  - 1 pour une anomalie détectable au cours du processus analytique,
  - 2 pour une anomalie dont la détection peut être possible
  - 3 pour une anomalie non détectable au cours du processus analytique.

La cotation est établie d'après la littérature, l'indice de criticité (IC) est calculé par la formule:  $IC = F \times G \times D$  [48].

La priorité sera alors de maîtriser les effets qui ont le plus haut niveau de criticité [48].

### **2.2.5. Evaluation de la criticité des équipements au niveau du laboratoire AMP**

Pour évaluer la criticité des équipements, nous avons choisi la méthode PIEU (P=pannes, I=importance des équipements, E=état de l'équipement, U= utilisation) [115] qui définit avec précision et par notation la criticité. - tableau 9-

La criticité est exprimée par la formule suivante :  $C = P \times I \times E \times U = 0 \text{ à } 81$

La notation 0 détermine un dispositif très critique et 81 un dispositif peu ou pas critique.

### **2.2.6. Détermination du niveau de criticité des équipements du laboratoire AMP à la grandeur température**

En se basant sur la bibliographie, nous avons utilisé trois critères pour définir le niveau de criticité à la grandeur température : le temps autorisé hors plage, l'usage qui est fait de l'équipement et le coût de son contenu [147, 174].

**Le temps autorisé hors plage** : c'est la durée que le contenu de l'équipement peut supporter du moment où l'équipement tombe en panne et ne régule plus sa température sans se dégrader. Plus l'équipement est critique, plus ce temps est court et plus le contenu qu'il renferme est soumis au risque d'être détérioré.

Un coefficient est attribué pour une tranche donnée de temps autorisé hors plage [147].

**Le facteur usage** : reflète son utilisation dans le fonctionnement du laboratoire.

**Le facteur coût** : la valeur du contenu d'un équipement va directement influencer sur le niveau de criticité à accorder à cet équipement et sur la traçabilité et sécurité à lui associer. Pour les produits biologiques, non chiffrables en valeur financière, mais qui représentent une valeur scientifique irremplaçable en cas de perte, nous avons affecté le maximum coefficient coût.

**L'indice de criticité à la grandeur température** : nous avons calculé la criticité en faisant la somme des coefficients des trois facteurs divisée par trois, arrondie à l'entier supérieur [174].

### **2.2.7. Détermination des écarts maximaux tolérés à la grandeur température**

L'écart maximal toléré (EMT) est une valeur extrême de l'erreur de mesure, par rapport à une valeur de référence connue, qui est tolérée par les spécifications ou règlements pour un mesurage, un instrument de mesure ou un système de mesure donné [62].

Ce sont des exigences métrologiques spécifiées c.à.d. les niveaux d'incertitude et plages d'utilisation des équipements selon les spécifications des méthodes.

Nous avons défini ces écarts en se basant spécialement sur les données de la littérature.

### **2.2.8. Evaluation des pratiques professionnelles**

Nous avons choisi la méthode d'évaluation des pratiques professionnelles (EPP) basée sur le benchmarking [127] à travers la mesure des écarts entre la pratique et un référentiel interne ce qui consiste surtout à vérifier l'homogénéité des pratiques avec l'idée de corriger les intervenants ayant des pratiques délétères pour les ramener au niveau de ceux qui ont les meilleurs résultats [128].

Notre étude s'est déroulée durant la période du 01/01/2015 au 01/02/2017 au sein du laboratoire AMP en 3 temps :

1- premièrement, nous avons mené une analyse rétrospective des indicateurs de performance globaux du laboratoire puis en fonction de trois opérateurs (OP) ayant le même niveau d'expérience durant la période du 01/01/2015 au 16/04/2016.

Chaque opérateur a réalisé un nombre similaire des tentatives de FIV.

2- deuxièmement, nous avons choisi deux paramètres biologiques à améliorer à savoir le taux de fécondation et le taux de vitrification embryonnaire, des actions d'amélioration ont été proposées et mises en place suite à cela, elles sont déclinées en :

- un axe formatif afin de favoriser la mise en œuvre des recommandations de bonnes pratiques, le respect des modes opératoires à travers un consensus des opérateurs lors des réunions avec des relectures en groupe des différents modes opératoires validés, la révision des procédures relatives à l'insémination des spermatozoïdes où des différences dans le choix du taux des spermatozoïdes qui doit être inséminé ont été relevées, l'implication de l'ensemble des opérateurs dans les contrôles qualité réalisés, particulièrement le suivi des paramètres influençant la culture embryonnaire à savoir la température et le pH ainsi que l'auto-chronométrage des différentes manipulations opérateurs dépendants ;



- un axe routinier à travers une analyse des pratiques et une étude prospective des dossiers.

3- puis, une évaluation sur une durée de dix mois de l'impact des actions correctives a été menée.

Nous avons étudié sur cette période les indicateurs de performance biologiques globaux et opérateurs-dépendants suivants [74]:

- l'âge moyen des patientes ;
- le taux de recueil des complexes cumulo- ovocytaires ;
- le taux moyen de fécondation ;
- le taux des embryons top qualité ayant un score supérieur ou égale à 5 ;
- le taux de grossesse par transfert ;
- le taux de congélation embryonnaire par technique de vitrification ;

### 3. Résultats

#### 3.1. Description de la méthode suivant le formulaire SH-FORM-44 du COFRAC:

Elle est reproduite dans le tableau 5.

<b>Tableau 5: Description de la méthode : identification morphologique de l'ovocyte, zygote et de l'embryon suivant le formulaire SH-FORM-44 du COFRAC [85]</b>	
<b>Analyte/ mesurande</b>	Echantillon biologique : ovocyte, zygote et embryon
<b>Principe de la mesure</b>	Examen cytologique : identification morphologique par microscopie optique de l'ovocyte, du zygote et de l'embryon.
<b>Méthode de la mesure</b>	Microscopie optique
<b>Marquage CE (Oui/Non)</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe)</b>	Non appliqué au Maroc
<b>Mise en œuvre</b>	
<b>Opérateurs (Habilitation)</b>	Biologistes médicaux et techniciens du laboratoire AMP du CSR
<b>Procédure de validation</b>	PO – VAL- Identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon
<b>Période d'évaluation</b>	Du 01/01/2015 au 01/02/2017.
<b>Date de mise en service</b>	01/01/2015
<b>Autorisation par</b>	Biologistes médicaux du laboratoire d'AMP

#### 3.2. Portée d'accréditation et type de flexibilité

Notre méthode est une méthode fournisseur reconnue dans son domaine d'application où tous les milieux de culture et dispositifs médicaux qui entrent en contact avec les embryons sont stériles par irradiation gamma, à usage unique, marqués CE-IVD, non embryotoxiques, non cytotoxiques, ayant subi un test MEA (Mouse Embryo Assay) et favorisant le développement normal de l'embryon avec des lots et des dates de péremption

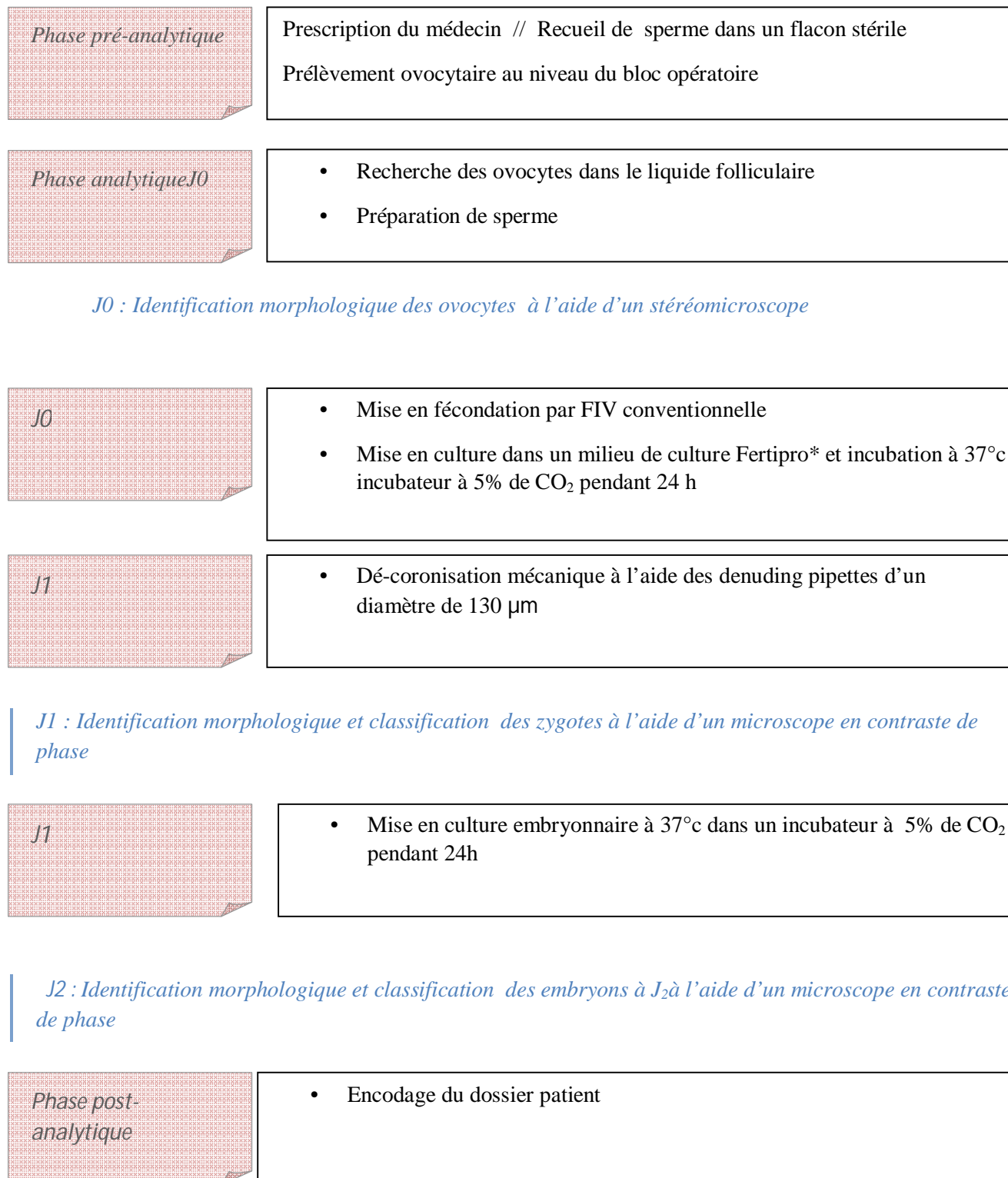
mais le fait que notre méthode est basée sur l'identification par microscopie optique, nous étions obligés d'adopter les recommandations préconisées dans le document d'information SH INF 50 [56] et le document SH REF 08 [5] et à procéder à une vérification des performances sur site selon la portée flexible B, elle comporte à côté de la phase initiale, une phase de vérification continue et de confirmation des performances dans le cadre du fonctionnement normal et quotidien du laboratoire.

### **3.3. Détermination de la nature de la méthode**

Notre méthode est manuelle, fournit un résultat qui n'apporte pas d'information sur la quantité d'analyte mais seulement sur l'identification de la caractéristique recherchée donc selon la définition de l'ISO15189: 2012 [85, 2], il s'agit d'une méthode qualitative.

### **3.4. Identification des processus et sous-processus liés à l'activité analytique**

Elle est reproduite dans la figure 5.



**Figure 5:** Identification des processus et sous-processus liés à l'activité analytique de la méthode « identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon ».

### 3.5. Résultats des critères de performance

Les résultats de ces indicateurs dans notre laboratoire sont présentés dans le tableau 6.

<b>Tableau 6: Les résultats des critères de performance que nous avons choisis au niveau du laboratoire AMP pour les cycles de FIV classique.</b>		
<b>Critères de performance</b>	<b>Résultats</b>	<b>Seuils classiques d'un laboratoire AMP en % [8]</b>
Nombre de ponctions ovocytaires	81	Variable en fonction de l'activité du laboratoire
Age des patientes	33.8 ans	Variable en fonction de la politique du laboratoire
Nombre d'ovocytes prélevés par ponction	9.07	Variable en fonction de l'activité du laboratoire
Taux de fécondation	71.5%	>60 [8]
Embryon de qualité optimum (score>5)	43%	>30 [8]
Taux de congélation	53%	>40 [8]
Taux de clivage	91.4%	>80 [8]
Taux de grossesse par transfert	25.97%	30% [8]

### 3.6. Résultats de la maîtrise des risques selon la méthode 5M.

Le tableau 7 rapporte l'analyse des risques que nous avons réalisée au niveau du laboratoire d'AMP.

**Tableau 7: Maitrise des risques**

5M	Points critiques	F	G	D	IC	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise
<b>Matière (Échantillons)</b>	Identito-vigilance	1	3	1	3	-Formation du personnel -Double contrôle à la réception des prélèvements par deux personnes différentes	-Procédure d'identito-vigilance du laboratoire -Procédure de gestion des non conformités -Formulaire de recueil des effets indésirables
	Préparation du patient	2	2	1	4	-Formation du personnel -Information des patients	-Instructions de recueil de sperme -Procédures d'envoi des échantillons vers le laboratoire de PMA
	Type de récipient matériel de ponction (milieu, seringues, flacons, ...)	1	2	1	2	-Conformité par rapport aux exigences du laboratoire AMP -Cyto-toxicité -Embryo-toxicité -Test MEA (Mouse Embryo Assay) -Type de stérilisation	-Procédure de gestion de stocks -Procédure de gestion des solutions et milieux de culture -Procédure de gestion des consommables -Procédure de gestion des non conformités
	-Nombre de tubes contenant le liquide folliculaire -Respect des conditions de transport du liquide folliculaire au laboratoire PMA	1	2	1	2	-Contrôle à la réception -Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	-Procédure de réception des échantillons biologiques au niveau du laboratoire AMP -Feuille de liaison de l'échantillon de sperme -Dossier de liaison de la ponction ovocytaire -Procédure de gestion des non conformités -Formulaire de recueil des effets indésirables -Fiche de suivi des températures
<b>Milieu (laboratoire)</b>	Conception et architecture du laboratoire	1	2	1	2	-Superficie adéquate -Unicité des locaux -Aménagement des locaux techniques en tenant compte du circuit des échantillons -Peinture à base d'eau -Laboratoire à proximité du bloc opératoire et de la salle du transfert -Zone technique séparée physiquement de la zone administrative et de la zone d'archivage -Vestiaire aménagé -Salles techniques adaptées au volume d'activité en suppression, - Locaux cloisonnés -Accès aux personnes handicapés -Zones d'activités clairement identifiables -Calme aux moments des opérations délicates	Cahier de charge
	Maitrise des conditions environnementales des salles techniques	2	2	2	8	-Pression négative des salles techniques -Traitement d'air : filtre, vitesse de ventilation -Température ambiante de 22±2°C -Taux d'humidité fixe -Eclairage adéquat	-Cahier de charge -Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur -Climatisation -Procédure de contrôle microbiologique de l'air -Fiche de suivi des températures -Procédure de maintenance préventive -Procédure de maintenance corrective -Planning de maintenance -Procédures de gestion documentaire
	Conception et maitrise des conditions environnementales des salles de	1	3	1	3	-Zone adaptée -Sécurité des locaux -Taux d'oxygène -Niveau d'azote liquide dans les cuves de stockage des embryons	-Cahier de charges -Accès sécurisé -Remplissage automatique des cuves d'azote -Porte anti-panique -Feuille de recueil des effets indésirables

	stockage des cuves d'embryons et des cuves d'azote liquide						-Procédure de gestion des non conformités
	Maitrise des conditions environnementales des salles d'archivage	1	2	1	2	-Sécurité des locaux contre les risques naturels : incendie, dégâts des eaux, nuisibles -Confidentialité des informations médicales	-Cahier de charge -Accès limité et sécurisé -Double support (électronique et papier) -Eviter l'archivage en sous-sol -Extincteurs de feu -Surveillance caméra -Procédure de gestion des risques -Instructions d'archivage -Procédure de gestion documentaire
	Hygiène et entretien des locaux	1	2	1	2	-Nature des produits d'hygiène utilisée -Fréquence de nettoyage -Formation du personnel responsable -Tri des déchets -Circuit des déchets	-Liste des produits d'hygiène et de décontamination autorisés. -Instructions des fournisseurs -Instructions de nettoyage du sol -Procédures de contrôle des surfaces et de l'air dans les salles de culture -Instruction de nettoyage des hottes à flux laminaire -Instruction en cas d'expositions accidentelles au sang.
<b>Matériel (équipement)</b>	Installation et fonctionnement optimale de l'équipement technique	1	3	2	6	-Nombre des équipements adapté au volume de l'activité (nombre de ponction annuelle) -Agencement des équipements (respecter la ventilation) -Maîtrise de l'équipement (planification des maintenances Préventives et correctives) -Étalonnage des équipements et matériels de mesure -Décontamination et hygiène	-Cahier de charge -Inventaire de l'ensemble du parc équipement présent au laboratoire en fonction de sa criticité -Procès-verbal de conformité à l'installation de l'équipement -Fiche d'identification de chaque équipement -Classeur équipement : documentation du fabricant, instructions d'étalonnage, instructions d'utilisation, contrôle de maintenance) -Étiquette métrologique -Fiche de vie de l'équipement : traçabilité des diverses interventions : étalonnage, vérification, maintenance) -Certificat de contrôle qualité -Procédure des maintenances préventives de l'équipement -Procédure des maintenances correctives de l'équipement -Planning des maintenances préventives -Processus de confirmation métrologique -Instruction d'archivage -Procédure de gestion de documentation -Feuille de recueil des éléments indésirables -Instruction de nettoyage -Procédure de gestion des déchets. -Procédure de gestion des risques
	Dégradation des conditions de culture embryonnaire par dérive des paramètres critiques de l'équipement : température, pH	1	3	2	6	-Identification des équipements critiques -Identification des grandeurs critiques pour l'ensemble du matériel -Maintenance/métrologie des équipements -Confirmation métrologique par étalonnage et vérification -Suivi métrologique	-Procédure de maintenance corrective -Procédure de maintenance préventive -Procédure des besoins propres du laboratoire en métrologie (Définition des grandeurs critiques: température, pH, vitesse de ventilation, température ambiante dans les salles de culture). -Processus du contrôle métrologique interne -Mode opératoire du contrôle métrologique interne -Fiche de suivi des températures -Fiche de suivi du pH

						-Planning d'étalonnage -Certificats d'étalonnage	
<b>Matériel (réactifs)</b>	Critères de choix des solutions, milieux de culture et consommables	1	3	2	6	-Embryotoxicité, -Cytotoxicité -Méthode de stérilisation	-Etude bibliographique -Sélection et évaluation des fournisseurs -Documentation du fournisseur -Certificat de contrôle qualité -Marquage CE -Test MEA (Mouse Embryo Assay) -Procédure de gestion des solutions et milieu de culture -Procédure de gestion des consommables -Procédure de gestion documentaire
	Conformité des solutions et milieux de culture à la réception	1	3	1	3	- Quantité suffisante en fonction de l'activité -Respect de la chaîne de froid -Certificat de qualité	-Procédure de gestion des stocks -Fiche de stock -Inventaire et main courante -Fiche de vie du produit : fournisseur, numéro de lot, date de péremption -Feuille de recueil des effets indésirables -Procédure de gestion des non conformités -Instruction d'archivage -Procédure de gestion documentaire
	Conservation et conditions d'utilisation des solutions et milieux de culture	1	3	1	3	-Traçabilité des milieux -Température des réfrigérateurs	-Documentation fournisseur -Fiche de suivi des températures -Fiche de vie des milieux
	Supplémentation Et aliquotage des milieux de culture	1	2	2	4	-Instructions de reconstitution -Formation du personnel	-Documentation fournisseur -Modes opératoires techniques -Respect des bonnes pratiques -Procédure d'habilitation du personnel -Fiche de poste -Fiche de fonction
<b>Méthode</b>	Adaptation des méthodes à l'environnement propre du laboratoire	1	3	2	6	Validation technique de la méthode	-Procédure de vérification/validation d'une méthode -Définition et suivi des indicateurs de performance de la méthode retenue -Procédure de préparation de sperme -Procédure de recherche et recueil des ovocytes -Procédure d'insémination par FIV conventionnelle -Procédure d'identification de l'ovocyte, zygote et embryons -Procédure de vitrification des embryons -Procédure de dévitrification des embryons -Procédure du transfert embryonnaire -Instructions d'encodage -Instructions d'archivage -Procédure de la gestion documentaire
<b>Main d'œuvre</b>	-Gestion des compétences du personnel -Vérification, évaluation et maintien des compétences du personnel	1	3	2	6	Procédure de formation et habilitation du personnel, plan de formation	-Dossier individuel du personnel -Fiche de poste -Fiche de fonction -Fiche d'évaluation trimestrielle des opérateurs en fonction des critères de performance -Planning d'évaluation des compétences -Procédure d'accompagnement des nouveaux techniciens



### **3.6.1. 5 M : Matière**

Il s'agit du liquide folliculaire et de l'échantillon de sperme.

Nous avons procédé à la rédaction d'un manuel de prélèvement (annexe 1) qui est un prérequis indispensable en se basant sur les recommandations du groupe de travail de la société française de biologie clinique (SFBC) [106, 107,108] concernant la maîtrise de l'étape de prélèvement des échantillons biologiques.

Ce manuel permet de s'assurer de la mise en place d'une logistique sans faille concernant l'identification et l'intégrité du prélèvement qui pour des raisons évidentes est précieux et ne peut être renouvelé [84,8], ainsi que les conditions de son acheminement vers le laboratoire qui doit se faire en respectant les paramètres métrologiques.

### **3.6 .2. 5 M : Milieu**

C'est le laboratoire d'AMP qui dans le cadre d'un centre clinico-biologique possède des locaux spécifiques à ces activités à proximité immédiate de la réalisation des actes cliniques [11].

Concernant les exigences environnementales, le laboratoire d'AMP du centre de santé reproductrice dispose de ses locaux au sous-sol du centre AMP dont le nombre et l'agencement sont conformes aux recommandations, en revanche il ne dispose pas de moyens de climatisation ni un système conforme de filtration d'air ambiant.

### **3.6.3. 5M : Méthodes**

Ce sont les instructions, procédures, modes opératoires et flux d'informations.

### **3.6.4. 5M : Matériel**

Nous avons commencé par la réalisation d'un inventaire physique des équipements intervenant dans notre méthode que nous avons reporté dans le tableau 8.

**Tableau 8: Inventaire physique des équipements du laboratoire d'AMP intervenant dans la méthode « identification de l'ovocyte, zygote et embryon»**

<b>Equipement</b>	<b>Marque</b>	<b>Description</b>	<b>Fonction</b>
Une étuve	Memmert® Modèle 100-800	Chauffe à la pression atmosphérique	Température
Deux Hottes à flux laminaires	Thermo scientific Héraguard®	Protège le produit par une extraction d'air	Débit du flux d'air
Trois blocs chauffants	Stuart SBH 130 D®	Maintient le produit à 37°C	Température
Un microscope à contraste de phase avec platine chauffante	Olympus IX 71®	Permet de voir les cellules à 37°C	Optique et température
Deux stéréomicroscopes avec plaques chauffantes	Olympus SZX7®	Permet de voir les cellules à 37°C	Optique et température
Deux plaques chauffantes	Labotec Hot plate 062®	Maintient le produit à 37°C	Température
Deux incubateurs à CO2	Thermo scientific HERAcell®240 i	Maintient le produit à 37 °C sous 5% de CO2 et 100% de saturation d'eau	Température, taux de CO2 et humidité.
Deux incubateurs de paillasse à FIVAL (FIV4)	K-system®	Maintient le produit à 37°C sous gaz FIVAL	Température, taux de CO2 et taux de N2
Deux réfrigérateurs	LG®	Maintient les milieux de culture à 6° C	Température
Deux cuves d'azote liquide pour stockage des embryons	Air –liquide®  GT 40	Maintient les embryons à -196°C	Température

Puis, en suivant les recommandations des manuels techniques fournis par nos fournisseurs, nous avons proposé un planning de maintenance préventive pour les équipements intervenants dans notre méthode dont les résultats sont reportés dans le tableau 9.

**Tableau 9: Planning des maintenances préventives des DMDIV du laboratoire AMP du CSR**

<b>Equipement</b>	<b>Marque</b>	<b>Quantité</b>	<b>Type de maintenance</b>	<b>Périodicité de la maintenance</b>
Incubateur à CO <sub>2</sub>	Thermo scientific HERAcell ®240 i	2	Exécuter la fonction auto-start.	Trimestrielle
			Effectuer des contrôles comparatifs de mesure de la température et de la teneur en CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Trimestrielle
			Changer le filtre d'entrée du gaz.	Annuelle
Hotte à flux laminaire	Thermo scientific Héraguard	2	Changement du pré-filtre	Trimestrielle
			<b>Qualification :</b> - L'intégrité des filtres - La mesure de l'empoussièrement dans l'enceinte à atmosphère contrôlée. - La mesure des vitesses de soufflage - La visualisation du sens du flux, de l'absence de perturbation et de zones mortes - le contrôle des paramètres de sécurité. - Vérification des alarmes visuelles et/ou sonores.	Annuelle
Incubateurs de paillasse à Fival	K-system	2	- Vérification du niveau d'eau	Mensuelle
			- Effectuer des contrôles comparatifs de mesure de la température et de la teneur en CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Annuelle
Les appareils optiques : - Microscope optique - Stéréomicroscope	Olympus CKX41  Olympus SZX7	4	- Nettoyage et graissage des mouvements mécaniques. - Nettoyage des lentilles du trajet optique - Vérification de convergence des trajets optiques - Réglage de la parfocalité (mise au point conservée sur toute la plage de grossissement)	Annuelle

En interne, le laboratoire procède à une décontamination journalière des hottes à flux laminaires, des incubateurs de paillasse et des plaques chauffantes selon un mode opératoire précis.

### 3.6.4.1. Résultats de l'évaluation de la criticité des équipements au niveau du laboratoire AMP

Les résultats de l'évaluation de la criticité des équipements au niveau du laboratoire AMP selon la méthode PIEU sont reportés dans le tableau 10.

<b>Tableau 10: Résultats de l'évaluation de la criticité par la méthode PIEU [116]</b>				
<b>Critères Poids</b>	<b>Incidence des pannes en cas d'arrêt du système</b>	<b>Importance des DM</b>	<b>Etat du dispositif</b>	<b>Taux d'utilisation</b>
<b>0,01</b>	Répercussion grave sur la conformité	Stratégique	À renouveler / à reformer	Sature
<b>1</b>	Répercussion sur la qualité des soins	Important	À réviser	Élevé
<b>2</b>	Répercussion légère sur la qualité des soins	Secondaire	À surveiller	Moyen
<b>3</b>	Aucune répercussion	Équipement de secours	À l'état spécifié	Faible
<b>Incubateurs à CO2</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Stéréomicroscopes</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Plaques chauffantes</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Incubateurs à FIVAL</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Microscope optique</b>	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>Microscope inverse</b>	0.01	0.01	2	0.01
<b>Hotte à flux laminaire (embryons)</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Hotte à flux laminaire (sperme)</b>	0.01	0.01	2	1
<b>Centrifugeuse</b>	2	1	3	1
<b>Etuve</b>	2	1	3	1
<b>Réfrigérateurs</b>	2	1	3	1
<b>Cuve d'azote pour conservation des embryons</b>	2	1	3	1

### **3.6.4.2. Résultats de la gestion des consommables et des milieux de culture**

Au laboratoire AMP, les procédures de réception et d'utilisation des milieux de culture et des solutions entrants en contact avec les gamètes et les embryons sont conformes aux spécifications du fabricant.

En outre, l'intégrité de l'emballage et les conditions de livraison notamment le respect de la chaîne de froid sont vérifiées.

La documentation des tests de contrôle de qualité est fournie pour tous les milieux de culture.

Les solutions, les milieux de culture et les consommables sont utilisés avant la date d'expiration du fabricant [20,124].

Malheureusement, le choix des fournisseurs dans notre cas est restreint puisque le laboratoire AMP est rattaché à une structure publique où tout achat est encadré par le code des marchés publics et passe par des appels d'offres.

### **3.6.5. 5M : Main-d'œuvre**

Concerne la qualification, formation et expériences du personnel.

#### **3.6.5.1. Résultats de notre processus de vérification et maintien de la compétence**

A côté de l'habilitation initiale, il faut donner au personnel les moyens de maintenir ses compétences et de le prouver, nous avons proposé plusieurs options :

- la vérification et l'évaluation des performances réalisées en fonction de l'activité réelle, ce qui permet d'intégrer la notion des courbes d'apprentissage en fonction du temps.
- la mise en place d'un contrôle qualité basé sur l'étude d'images numérisées d'embryons à J<sub>2</sub> et J<sub>3</sub>, l'objectif est de choisir l'embryon de très bonne qualité et de déterminer pour chaque opérateur le pourcentage des réponses correctes par rapport au *scoring* préétabli. Au-delà de 20 % de fausses réponses, des actions complémentaires sont mises en place (formation complémentaire, relectures en binôme. . .).

- le suivi des indicateurs de performance de chaque opérateur : c'est l'option qui a une valeur ajoutée indéniable pour la qualité dans un laboratoire s'il s'accompagne d'un minimum de respect des personnes et de relationnel humain, ce suivi est trimestriel, les résultats obtenus par chaque opérateur sont comparés à la moyenne du service et aux résultats nationaux.

Ce contrôle interne entre manipulateurs participe également à l'amélioration continue.

### 3.6.5.2. Résultats de l'évaluation des performances et des pratiques professionnelles.

81 tentatives de FIV avec ponctions ovocytaires ont été réalisées durant la période du 01/01/2015 au 01/02/2017.

Lors de l'analyse rétrospective, nous avons retenu 51 dossiers dont les résultats des indicateurs de performance biologiques globaux et ceux en fonction de l'opérateur sont représentés dans le tableau 11.

<b>Tableau 11: Résultats des indicateurs de performance globaux et selon l'opérateur des tentatives de FIV réalisées durant l'analyse rétrospective du 01/01/2015 au 16/04/2016</b>				
<b>Indicateur de performance</b>	<b>Résultats globaux</b>	<b>OP1</b>	<b>OP2</b>	<b>OP3</b>
Nombre de ponction	51	17	17	17
Moyenne d'âge des patientes (an)	33.6	32.4	33.4	33.3
Taux de recueil ovocytaire%	67.4	66	94	59.7
Taux de fécondation %	64.4	58.6	75.2	72
Embryon de qualité optimum (score>5)%	55.6	52.6	50	62
Taux de congélation embryonnaire (%)	41.1	27	42	25
Taux de grossesse clinique par transfert (%)	27.08	30	14	18

Après l'analyse de ces résultats, nous avons proposé un ensemble d'actions correctives pour améliorer les résultats individuels des opérateurs.

L'évolution des résultats après l'application des actions est représentée dans le tableau 12.

<b>Tableau 12: Résultats des indicateurs de performance globaux et suivant l'opérateur des tentatives de FIV réalisées après l'application des actions correctives.</b>				
<b>Indicateur de performance</b>	<b>Résultats globaux</b>	<b>OP1</b>	<b>OP2</b>	<b>OP3</b>
Nombre de ponction	30	10	10	10
Moyenne d'âge des patientes (an)	34.13	32.1	34.2	35.3
Taux de recueil ovocytaire %	75	83.6	80	68.6
Taux de fécondation %	78.6	81	95	81
Embryon de qualité optimum (score>5)%	40	62.5	85	74
Taux de congélation embryonnaire (%)	66.6	62.5	16	20
Taux de grossesse clinique par transfert (%)	24.14	10	35	28

### **3.7. La politique métrologie au sein du laboratoire AMP**

#### **3.7.1. Résultats de la détermination des besoins et exigences métrologiques du laboratoire AMP**

Nous avons déterminé nos besoins en métrologie à partir d'une analyse de risque où nous avons identifié les équipements critiques qui ont une influence sur la qualité et la fiabilité des résultats de la méthode à valider à partir de l'ensemble des équipements présents au laboratoire d'AMP.

Nous avons conclu qu'il existe deux paramètres métrologiques majeurs qui influencent la qualité de nos résultats, il s'agit de la température et du pH.

### 3.7.2. La grandeur température

#### 3.7.2.1. Résultats de la détermination du niveau de criticité des équipements du laboratoire AMP à la grandeur température

Nous avons utilisé trois critères pour définir le niveau de criticité des équipements à la grandeur température : le temps autorisé hors plage, l'usage qui est fait de l'équipement et le coût de son contenu avec des coefficients attribués à chacun de ces trois critères suivant le tableau 13 [147, 174].

Tableau 13: Coefficients attribués pour la détermination de la criticité des équipements à la grandeur température selon le temps, l'usage et le coût du contenu					
Temps autorisé hors plage	Coefficient temps	Usage	Coefficient usage	Coût estimé en MAD	Coefficient coût
$t \leq 2$ h	4	Conservation	4	Non chiffrable	4
$2 \text{ h} < t < 8 \text{ h}$	3	Incubation	3	Supérieur ou égal à 15000	4
$8 \text{ h} < t < 12 \text{ h}$	2	Stockage et usage # conservation	2	Entre 10000 et 15000	3
$t \geq 12 \text{ H}$	1	Stérilisation	1	Supérieur à 3000 et inférieur à 10000	2
		Séchage	1	Inférieur ou égal à 3000	1
		Autre	1		



Le tableau 14 regroupe ces équipements en fonction de leurs indices de criticité.

<b>Tableau 14: Les équipements critiques pour la grandeur température du laboratoire AMP intervenant dans la méthode « identification de l'ovocyte, zygote et embryon ».</b>					
<b>Phase opérationnelle</b>	<b>Equipement critique</b>	<b>Temps hors plage</b>	<b>Usage</b>	<b>Coût</b>	<b>Indice de criticité</b>
Phase pré analytique	Etuve	3	3	1	3
	Blocs chauffants	4	4	4	4
	Les réfrigérateurs	3	2	3	3
Phase analytique	Les incubateurs à CO <sub>2</sub>	4	4	4	4
	Les incubateurs de paillasse	4	4	4	4
	Les stéréomicroscopes	4	4	4	4
	Les plaques chauffantes	4	4	4	4
	Les blocs chauffants	4	4	4	4
	La platine du microscope inversé	4	4	4	4
	Les réfrigérateurs	3	2	3	3
Phase post-analytique	Les cuves d'azote	4	4	4	4

### **3.7.2.2. Résultats de la détermination des écarts maximaux tolérés de la grandeur température.**

Nous avons utilisé la vérification bibliographique et nous avons retenu les valeurs suivantes des EMT en fonction de l'équipement:

- enceintes thermiques contenant les embryons :  $37 \pm 0,5$  °C [132] ;
- réfrigérateurs :  $5 \pm 3$  °C [132] ;
- sonde du thermomètre de surveillance: 0,75 °C selon la règle du quart utilisée.

La règle du quart constitue un compromis satisfaisant qui permet de réaliser une métrologie cohérente, économiquement raisonnable en regard du besoin [117,133].

### 3.7.2.3. Définition des modalités de raccordement métrologique des équipements du laboratoire AMP

Nous avons exploité les données de littérature pour proposer un programme d'étalonnage concernant les équipements critiques que nous avons reporté dans le tableau 15. La périodicité du raccordement est fixée selon les recommandations générales, mais peut évoluer en fonction de la durée et la fréquence d'utilisation de l'équipement et les éventuelles dérives observées ou constatées.

Selon les recommandations du SH GTA 01 [139] et le référentiel ISO 15189:2012 [2], l'incertitude recherchée est inférieure ou égale à ¼ de l'EMT.

<b>Matériel</b>	<b>Type de raccordement</b>	<b>Modalités de raccordements</b>
Incubateurs à CO <sub>2</sub>	Externe	Cartographie initiale – ensuite 1 fois/an
Etuve	Externe	Cartographie initiale – ensuite 1 fois/5 ans
Incubateurs de pailleuse (FIV4)	Externe	Contrôle de température initiale ensuite 1 fois/an
Plaque chauffante	Externe	Contrôle de température initiale– ensuite 1 fois/an
Thermomètre	Externe	1 fois/an
Blocs chauffants	Externe	Cartographie initiale – ensuite 1 fois/an
Réfrigérateurs	Externe	Cartographie initiale – ensuite 1 fois/5 ans

### **3.7.2.4. Le suivi métrologique de la grandeur température en interne**

Hormis l'importance d'un raccordement métrologique de ces équipements, un suivi métrologique en interne est capital d'autant plus que nous n'avons pas de CIQ ou d'EEQ pour nous alarmer sur une dérive métrologique.

Il diffère selon la nature de l'enceinte, pour les blocs chauffants et les malles de transport, nous procédons au début et à la fin du transport [132] à un relevé manuel de température dans des tubes à fonds ronds remplis de 10 ml du milieu de culture afin de mimer les mêmes conditions de transport du liquide folliculaire. La mesure est faite à l'aide d'un thermomètre de référence étalonné annuellement par une société accréditée.

Pour les incubateurs à CO<sub>2</sub> et les incubateurs de paillasse de type Fival, les plaques chauffantes et la platine du microscope à contraste de phase, le relevé manuel de température est fait au début de chaque série de ponctions à l'aide du thermomètre de référence associé à une microsonde, permettant de réaliser des mesures de température dans les micro-volumes des milieux de culture [132,140, 141].

L'ensemble de ces mesures est enregistré dans des fiches de suivi de température propre à chaque équipement et archivé dans le dossier équipement.

Le mode opératoire ainsi que la fréquence des tests du suivi métrologique réalisés au sein du laboratoire sont consignés par écrit.

### **3.7.3. L'environnement gazeux à l'intérieur des incubateurs à CO<sub>2</sub>**

En absence d'antériorité pour définir les EMT concernant le pH des milieux de culture incubés, nous avons utilisé les spécifications de la documentation technique du fournisseur (notices, fiches techniques), elles préconisent un pH de  $7,00 \pm 0,25$  [148] pour les deux milieux de culture utilisés jusqu'au stade J<sub>2</sub> dans notre méthode.

### **3.7.4. Autres grandeurs**

#### **a. Volume**

Pour les appareils volumétriques tels que les pipettes, selon l'ISO 15189:2012 [2], une vérification métrologique s'impose avant tout démontage de pipettes (ce qui valide la conformité passée) et après maintenance (ce qui valide l'efficacité de la maintenance et des ajustages éventuels). Néanmoins, puisque notre technique est qualitative, nous avons considéré que cette composante est faible en regard du besoin réel combiné aux incertitudes liées à l'utilisation.

## **b. Optique**

Pour les stéréomicroscopes et les microscopes à contraste de phase, aucun raccordement au SI n'est nécessaire [44].

### **3.8. Evaluations internes et externes de la qualité - organisation et gestion des contrôles qualités.**

En AMP, il n'existe pas de CIQ au sens classique de la biologie polyvalente, les matériaux biologiques ne peuvent pas être utilisés comme matériaux de contrôle (non étalonnables).

Les CIQ que nous avons mis en place concernent les performances des opérateurs.

### **3.9. Estimation des incertitudes de mesure**

En AMP, il n'y a pas de calcul d'incertitude possible (pas de tests autorisés sur les embryons).

### **3.10. Comparaisons inter-laboratoires**

Les comparaisons inter-laboratoires permettent d'évaluer, sur une période donnée, les performances de la méthode et fournissent des indications pour la résolution des problèmes analytiques.

Selon les recommandations du COFRAC, l'utilisation des banques d'images répond à cette exigence.

## **4. Discussion**

La méthode « identification de l'ovocyte, zygote et embryon » est une méthode qualitative dont la validation est effectuée selon la portée B puisqu'elle est basée sur la microscopie optique malgré que l'ensemble des milieux de culture et des consommables est marqué CE ( attestation indiquant que le dispositif médical est conforme à des exigences essentielles de sécurité, relatives à la conception, à la construction et à l'information) et que notre méthode de culture embryonnaire suit les recommandations des fournisseurs.

Sa validation est basée sur la vérification bibliographique qui est prédominante alors que la vérification expérimentale est réduite, l'incertitude de mesure n'étant pas quantifiable du fait de l'absence de données chiffrées, elle s'appuie fortement sur l'étude des indicateurs de performances et la maîtrise des risques qui permet la mise en place de facteurs de maîtrise pertinents en termes d'efficacité et de réalisation.

L'identification des processus et sous-processus liés à l'activité analytique nous a permis de cadrer le travail à mener et les dispositions à prendre pour maîtriser les points critiques identifiés ayant une incidence sur les résultats d'analyses.

En biologie de la reproduction, le liquide folliculaire est précieux, son prélèvement fait partie des situations pré-analytiques où le clinicien est à l'origine de l'échantillon, la validation de la qualité de l'échantillon tient dans le fait que le clinicien AMP est reconnu compétent pour cet acte par sa formation et son expérience.

Les conditions opératoires du laboratoire ne sont pas forcément simples , plusieurs facteurs pouvant affecter ses performances tels que l'absence d'échantillons de contrôles, la lourdeur de la phase pré-analytique qui implique toutes les étapes clinico-biologiques depuis la prise en charge du couple infertile en préalable à la tentative, le recueil/prélèvement des gamètes, les conditions d'expédition et de stockage des milieux de culture , les conditions ambiantes du laboratoire, la métrologie de l'ensemble des équipements jusqu'aux compétences de l'opérateur.

Les critères de performance ne sont pas forcément aussi bien définis que pour les méthodes automatisées quantitatives, nous les avons choisis en adéquation avec les références internationales et les seuils calibrés en rapport à une population de référence.

Dans notre interprétation de ces critères de performance, nous avons exploité les résultats de la méthode lorsqu'elle était déjà appliquée en routine, sans avoir procédé initialement à la vérification, sachant toutefois qu'il n'y a pas eu de modifications sur le processus analytique.

Cette interprétation reste délicate au regard du faible nombre des ponctions dû au jeune âge du laboratoire.

Néanmoins, nos résultats restent comparables aux moyennes classiques d'un laboratoire d'AMP [8,74] :

- l'âge moyen des patientes qui est un facteur pronostic très important [104] est de 33,8 ans ;
- le taux de fécondation est de 71,5 % contre un taux habituel de 60 % ;
- le taux de clivage (91,4 % contre 80 %) et la proportion d'embryons de meilleure qualité (43 % contre 30 %) sont supérieurs à la moyenne classique d'un laboratoire d'AMP ;
- le taux de grossesse par transfert est de 25 %.

Ces indicateurs sont analysés par le laboratoire au moins une fois par quadrimestre ou par an selon la variable concernée.

Le taux d'implantation est quant à lui contrôlé tous les 50 transferts, il est jugé alarmant au-dessous de 25 % ; au-dessous de 20 %, une révision complète de toute la chaîne analytique s'impose [164].

La validation de la compétence technique du laboratoire AMP passe par le contrôle de l'homogénéité des pratiques de ces opérateurs, ceci est d'autant plus intéressant que les activités biologiques en AMP sont opérateurs dépendants.

Pour s'assurer de la compétence de son personnel et le prouver, nous nous sommes basés sur la formation initiale et la formation externe des opérateurs, les opérateurs ont tous bénéficié d'une formation en AMP d'une durée variante de 6 mois à un an dans un centre de référence.

Le transfert de la formation interne acquise est réalisé au niveau du laboratoire par l'évaluation des embryons en contexte clinique, cette situation s'est avérée problématique du fait de l'augmentation du temps d'exposition des embryons à l'environnement du laboratoire, pour pallier à cette contrainte, nous avons proposé l'utilisation d'une banque d'images numérisées [103, 125].

D'un autre côté, notre évaluation de la pratique professionnelle individuelle a concerné l'ensemble des biologistes et techniciens, elle est réalisée par comparaison régulière des pratiques réelles et des résultats obtenus, avec les pratiques attendues au sein du laboratoire, la finalité n'est pas l'évaluation mais bien l'amélioration des pratiques [126].

Nous avons constaté durant cette démarche une hétérogénéité dans les résultats inter-opérateurs, nous avons choisi de commencer par l'amélioration de deux paramètres qui sont le taux de fécondation et le taux de vitrification embryonnaire avec le choix de l'OP<sub>2</sub> qui avait les meilleurs taux comme référentiel interne.

Nous avons proposé pour cela, un ensemble d'actions correctives à travers un axe formatif et un axe routinier, suite à cela nous avons constaté une amélioration de l'ensemble des résultats des opérateurs et par conséquent du résultat global du laboratoire où le taux de fécondation s'est amélioré (78.6 % au lieu de 64.4 %) ainsi que le taux de vitrification (66.4% au lieu de 41.4%).

A noter que la comparaison inter-opérateurs doit prendre en compte la spécificité des cas, car il n'est pas rare que les cas les plus difficiles ou dont le pronostic est mauvais soient réalisés de façon systématique par les mêmes intervenants surtout qu'aucune donnée n'apparaît fiable concernant la courbe d'apprentissage des opérateurs [129].

Concernant nos équipements ou DMDIV, leurs gestions concernent toutes les étapes du cycle de leurs vies afin d'en assurer la maîtrise [112], c'est un domaine qui est partiellement sous la responsabilité du service biomédical, en effet, les objectifs de la direction biomédicale et celle des laboratoires sont convergents en termes de qualité et fiabilité dans le choix des équipements [113].

Nous avons commencé par une évaluation de la criticité, selon la norme ISO 15189:2012 [2], un équipement critique est défini comme « susceptible d'affecter directement ou indirectement les résultats d'examen ».

Cette évaluation permet de prioriser les efforts d'amélioration afin d'assurer la fiabilité et la disponibilité optimale des DMDIV critiques, de justifier le choix d'acquérir des appareils spécifiques pour effectuer les maintenances et les contrôles qualités et d'évaluer la périodicité du suivi métrologique et des prestations de maintenance, elle va également influencer sur la réactivité du prestataire de maintenance [114].

Nous avons constaté que 90% des équipements présents au niveau du laboratoire sont critiques, ce qui engendre un suivi régulier de la maintenance et la nécessité d'avoir un parc d'appareils de secours pour pallier à toute défaillance par le remplacement du dispositif.

Les dispositifs médicaux les plus "critiques" font l'objet d'une maîtrise toute particulière que ce soit dans la traçabilité de la maintenance effectuée qu'en garantie de continuité des soins s'il survient une panne ou un dysfonctionnement qui en empêcherait l'usage.

Concernant la criticité à la grandeur température, sa détermination nous a permis dans un deuxième temps de définir les besoins en traçabilité, nous avons constaté que l'ensemble de notre équipement critique à la grandeur température à un indice de criticité  $\geq 3$ , la traçabilité métrologique qui s'organise entre raccordement externe faisant intervenir les organismes de métrologie et raccordement interne au laboratoire [122], nécessite donc un enregistrement continu des températures.

Ce raccordement métrologique consiste à la comparaison de l'instrument de mesure à une valeur de référence délivrée par un étalon ou un matériau de référence, ou encore un autre équipement étalonné.

Le raccordement au SI est réalisé par étalonnage de l'équipement [134].

Pour nos enceintes thermiques tels que les incubateurs à CO<sub>2</sub> et les étuves, un raccordement en externe est nécessaire afin d'effectuer une cartographie de l'enceinte concernée et définir les modalités de mise en service.

La cartographie permet de caractériser par l'étude de la répartition et de la fluctuation des températures internes, l'homogénéité et la stabilité de l'enceinte et permet de définir les zones d'utilisation et par conséquent de déterminer sa conformité par rapport aux spécifications du constructeur ou aux exigences définies par le laboratoire.

En terme de périodicité, le guide technique du COFRAC SH GTA 1 [139] propose de cartographier les enceintes avant leurs mises en service puis préventivement tous les 5 ans au maximum, sauf en cas de besoin, dans un contexte curatif (après panne, réglage...), ou suite à une dérive ou un décrochage significatif de la courbe de surveillance de la température.

Après réparation, réglage, ou en cas de doute sur les performances de l'enceinte, la logique voudrait qu'une nouvelle cartographie soit effectuée afin de vérifier que la conformité précédemment établie ne soit pas altérée.

La cartographie est effectuée en 9 points pour un volume de travail de moins de 2 m<sup>3</sup>, en 15 points pour des volumes supérieurs et jusque 20 m<sup>3</sup>, au-delà le nombre de points est à adapter à la taille de l'enceinte, aucun point ne doit être en dehors des EMT acceptables [135, 136]

Pour les incubateurs de paille et les plaques chauffantes, la faisabilité d'une cartographie en plusieurs points est limitée, la température à laquelle les gamètes et les embryons sont exposés est le point particulier qu'on surveille (température du milieu) [44].



Pour les réfrigérateurs, notre laboratoire dispose d'appareils à usage domestique dont les caractéristiques sont plus aléatoires et difficiles à maîtriser.

Actuellement, on procède uniquement à un suivi de la température par un relevé manuel (et donc discontinu) à heure fixe qui même avec un thermomètre adapté ne nous donne aucune information sur les variations éventuelles de la température entre deux relevés et particulièrement pour les enceintes dont le fonctionnement est permanent alors que toute panne sera constatée a posteriori, au moment du dernier relevé et le contenu de l'appareil peut être perdu.

Les besoins en temps pour le suivi manuel des températures des enceintes est aussi conséquent et il est intégré dans le travail courant d'un technicien de laboratoire, l'idéal est d'acquérir d'un système d'enregistrement des températures comportant des sondes installées dans les enceintes et reliées à un enregistreur en continu [137] où l'enregistrement des températures est automatique et le transfert des données sur un poste informatique se fait en temps réel [138] sans intervention humaine. C'est la technique la plus fiable mais aussi la plus onéreuse car chaque enceinte doit avoir une sonde et un émetteur.

À cela s'ajoute la difficulté de respecter l'EMT de la température à 0,5 °C autour de 37 °C, qui est acceptée comme la meilleure température dans toutes les méthodes impliquant la manipulation des embryons humains [146], ce qui nous a conduit à élargir notre écart à  $\pm 1$  °C, ce suivi métrologique qui est une source fréquente d'écart est d'autant plus important que nous n'avons pas de contrôle interne de qualité pour nous alarmer sur une dérive métrologique.

Concernant l'environnement gazeux à l'intérieur des incubateurs, la littérature montre que, dans une large série d'embryons humains [143], le pH est plutôt de 7.12, mais variable au cours du développement embryonnaire.

Le pH dans les gouttes du milieu de culture dépend de deux facteurs essentiels, à l'extérieur de l'incubateur, il est en fonction du temps de manipulation et du volume du milieu de culture or à l'intérieur de l'incubateur, il dépend du degré hygrométrique [144].

Dans notre pratique, l'incubation des embryons est réalisée dans des incubateurs dont l'environnement gazeux est constitué de 5 % de CO<sub>2</sub> et 95% d'air ambiant avec un taux d'hygrométrie supérieur à 90 % grâce à une réserve d'eau pure et stérile [145,146].

Le contrôle du taux de CO<sub>2</sub> se fait par mesure de pH du milieu de culture à l'aide d'un pH-mètre étalonné.

L'étalonnage des pH-mètres doit être réalisé à chaque utilisation à l'aide des solutions de référence certifiées ou MRC (matériau de référence certifié).

Les activités du laboratoire d'AMP du CSR ne nécessitent pas l'implantation d'une cellule de métrologie au sein de l'hôpital, donc pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189:2012, deux choix sont possibles, soit une réalisation en interne des opérations de surveillance du matériel à contrôler par le service biomédical qui doit être lui-même certifié selon la norme ISO 17025, ce qui nécessite l'achat du matériel nécessaire à l'étalonnage et à la maintenance et l'organisation des formations qualifiantes accompagnés de garanties formelles en termes de raccordements aux étalons.

L'autre possibilité, plus coûteuse est le recours à des prestataires externes accrédités du domaine concerné notamment pour la sous-traitance des cartographies des enceintes thermiques dont l'incertitude de mesure établie par le laboratoire nous a paru élevé.

En l'absence de prestataires accrédités, par exemple, en cas d'exclusivité des opérations de maintenance et de vérifications métrologiques par les fabricants, une évaluation documentée de ces derniers est réalisée pour les fournisseurs critiques [133].

***Troisième partie : Validation  
de la méthode quantitative  
« concentration des  
spermatozoïdes » du processus  
spermogramme.***

## **1. Introduction**

Le spermogramme est le premier élément d'appréciation de la fertilité masculine, souvent pratiqué en première intention [150], il permet d'évaluer les caractéristiques macroscopiques (aspect, viscosité, volume, pH) et microscopiques du sperme (agglutination et agrégation des spermatozoïdes, numération des éléments cellulaires autres que les spermatozoïdes, mobilité, vitalité et concentration spermatique) [151].

L'analyse des paramètres spermatiques peut être réalisée manuellement ou de manière automatisée, l'utilisation d'un système informatisé permet une analyse rapide sur un grand nombre de cellules, l'influence de l'opérateur sur l'évaluation des cellules étudiées étant réduite, les paramètres étudiés le sont de façon plus objective et plus reproductible, toutefois l'examen manuel reste actuellement la méthode de référence malgré la présence d'une grande variabilité inter et intra-laboratoire d'où l'importance de la standardisation des procédures et la participation à des contrôles internes et externes de qualité [152,153].

Cette étude a pour objectifs :

- fournir des réponses aux exigences de la norme ISO15189:2012 [2] en matière de validation d'une technique quantitative en portée B.
- la mise en place d'un contrôle interne de qualité fait maison au sein du laboratoire.
- la proposition d'une méthode d'exploitation graphique des résultats du contrôle interne de qualité.
- l'évaluation et l'harmonisation des pratiques de lecture au sein du laboratoire d'où l'importance de l'habilitation du personnel.

## **2. Méthodologie**

### **2.1. Matériel**

La détermination de la concentration en spermatozoïdes nécessite la manipulation du sperme dans une hotte à flux laminaire et le matériel suivants :

- cellule de comptage type Makler® Réf : CDM
- microscope optique Olympus CKX 41 équipé d'objectifs à faible et fort grossissements.
- flacon de recueil de sperme stérile à ouverture large en plastique non toxique pour les spermatozoïdes Réf G000166

- micropipettes Réf P10 Gilson® 066002
- embouts stériles Réf : Eppendorf®

## **2.2. Méthodes**

C'est une méthode manuelle de type quantitatif par examen microscopique.

Le sperme est recueilli au laboratoire, par masturbation, le comptage des spermatozoïdes est réalisé à l'aide d'une cellule de Makler, après homogénéisation de l'échantillon de sperme liquéfié à 37°C et non dilué, on prélève à l'aide d'une micropipette une goutte de sperme qu'on dépose sur la cellule, on pose dessus la lamelle ronde et on tourne celle-ci sur le sperme pour qu'il s'étale uniformément (arc-en-ciel sur les bords) en prenant soin d'éviter la capture ou la formation des bulles d'air entre lame et lamelle.

Ces conditions de préparation permettent d'uniformiser l'épaisseur du sperme sous la lamelle pour faciliter le calcul de la concentration et on laisse reposer 5 minutes [82, 159].

On observe au microscope optique, l'ensemble de la chambre afin de vérifier l'homogénéité du dépôt et l'absence des bulles d'air puis on procède au comptage des spermatozoïdes à l'objectif x40.

Si on compte 10 carrés, le nombre de spermatozoïdes comptés correspond au nombre de million de spermatozoïdes /ml.

Chaque opérateur doit compter à la minimum 100 spermatozoïdes.

## **2.3. Validation de la méthode en portée B**

### **2.3.1. Description du processus analytique**

Le spermogramme fait partie de la sous-famille « Spermologie diagnostique » du sous-domaine Biologie de la Reproduction (BdR) de la famille hématologie-immunologie-biologie de reproduction selon le document SH INF 50 du COFRAC [56].

Il s'agit d'un processus analytique complexe constitué de l'enchaînement de plusieurs méthodes faisant appel à des techniques quantitatives et qualitatives, il peut être composé de quatre sous processus (concentration en spermatozoïdes, mobilité des spermatozoïdes, viscosité et volume du sperme).

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la validation du sous processus « concentration des spermatozoïdes » du fait qu'elle est la première étape utilisée dans la spermologie thérapeutique au niveau du laboratoire AMP, nous avons éliminé les cas particuliers tels que les crypto-zoospermies et les biopsies testiculaires qui requièrent une analyse des risques et une habilitation particulière [44].

### 2.3.2. Description de la méthode suivant le modèle SH-FORM-43 du COFRAC [154]:

Elle est reproduite dans le tableau 16.

<b>Tableau 16: Description de la méthode «Concentration des spermatozoïdes »</b>	
L'analyte	Spermatozoïdes
Nature de l'examen	Recherche et identification des spermatozoïdes et détermination de la concentration des spermatozoïdes.
Référence de la méthode	Méthodes reconnues, adaptées
Type d'échantillon primaire	Sperme éjaculé frais
Type de récipient, additifs	Flacon stérile adaptée au prélèvement de sperme pour activité AMP
Prétraitement de l'échantillon	Aucun
Unités	Millions/ml
Critères d'interprétation	Recommandations de l'OMS (WHO 2010) [82]
Marquage CE (Oui/Non)	Oui
Codage C.N.Q.(s'il existe)	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellule de comptage type Makler Réf : CDM®</li> <li>- Microscope optique Olympus® CKX 41 équipé d'objectifs à faible et fort grossissements.</li> <li>- Flacon de recueil de sperme stérile à ouverture large en plastique non toxique pour les spermatozoïdes Réf G000166</li> <li>- Micropipettes Réf P10 Gilson® 066002</li> <li>- Embouts stériles Réf : Eppendorf®</li> </ul>
Référence du réactif	Aucun
Matériau d'étalonnage (références)	Aucun

<b>MISE EN ŒUVRE</b>	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode	Dr Aboulmakarim siham
Mode opératoire	MO – Détermination de la concentration des spermatozoïdes
Procédure de gestion de la portée flexible	PO – G 01
Période d'étude	Du 01/01/2015 au 01/02/2017.
Date de 1 <sup>ère</sup> utilisation	01/01/2015

### **2.3.3. Définition de la portée d'accréditation, du type de flexibilité et de la nature de la méthode**

La numération spermatique à l'aide d'une cellule de Makler est une méthode adaptée, par le laboratoire par rapport à la méthode de référence qui est la numération spermatique par la cellule de Neubauer [155], donc il s'agit d'une portée flexible type B, le laboratoire évalue, pour sa validation l'ensemble des critères de qualité de la méthode susceptible d'en démontrer la maîtrise.

C'est une méthode quantitative qui fournit un résultat issu de données numériques.

### **2.3.4. Détermination des critères de performance à vérifier**

Dans le cas de validation d'une méthode quantitative de type B, et selon les recommandations du COFRAC dans son document GTA SH 05 [44,156], les paramètres à vérifier sont :

- Répétabilité
- Fidélité intermédiaire
- Variabilité inter-opérateurs
- Exactitude
- Sensibilité et spécificité analytique
- Incertitudes
- Etendue de mesure
- Comparaison de méthode
- Interférences
- Contamination
- Valeur de décision clinique

Ils sont déterminés à partir des contrôles qualités.

### 2.3.5. Détermination des limites acceptables des paramètres à vérifier.

Nous nous sommes basés sur le référentiel Ricos et al [157] pour la détermination des critères d'acceptabilité ou les limites analytiques, les objectifs analytiques selon Ricos et al concernent l'infidélité (imprécision), le biais et l'erreur totale.

Ils sont calculés en fonction des variations biologiques intra-individuelles (CV<sub>i</sub>) et inter-individuelles (CV<sub>g</sub>) pour chaque analyte et sont représentés dans le tableau 17.

Paramètre	Variation biologique		Objectifs de performance		
	CV <sub>i</sub>	CV <sub>g</sub>	Infidélité (%)	Biais (%)	Erreur totale (%)
Concentration des spermatozoïdes	26.8	56.4	13.4	15.6	37.7

### 2.3.6. Choix des référentiels de la validation de notre méthode

Nous nous sommes appuyés sur les recommandations de trois référentiels clés qui décrivent la méthode de référence pour le calcul de la numération spermatique : les recommandations de l'OMS dans sa cinquième édition de 2010 [82], le cahier Bioforma [158] et le guide sur l'examen et la préparation de sperme publié par l'ordre professionnel des technologues médicaux du Québec [159].

## 2.4. Protocole expérimental et mise en œuvre au laboratoire d'AMP

### 2.4.1. La mise en place des contrôles qualité

#### 2.4.1.1. La mise en place d'un contrôle interne de qualité fait maison

##### a. Préparation des échantillons de contrôle interne de qualité CIQ 1 et 2

Les deux contrôles internes de qualité CIQ 1 et 2 sont deux prélèvements de sperme frais provenant de deux hommes adressés au centre AMP pour exploration d'une infertilité du couple, ces prélèvements ont été recueillis au laboratoire par masturbation après un délai d'abstinence de 4 jours.



En suivant les recommandations de l'OMS [82], nous avons choisi de travailler avec deux niveaux de concentrations spermatiques, une concentration dite normale CIQ1 de  $43 \times 10^6$  spz/mL et une concentration faible CIQ2 couvrant une valeur critique de  $11 \times 10^6$  spz/mL. Chaque échantillon CIQ provenant du même éjaculat est réparti en 10 aliquotes anonymes.

Quatre opérateurs ( $n = 4$ ) ayant des expériences similaires en spermiologie et participant à l'activité du laboratoire ont procédé à la détermination de la concentration spermatique dans les mêmes conditions opératoires quotidiennes du laboratoire, et avec le même microscope optique.

Deux protocoles ont été utilisés :

- protocole 1** : le comptage des spermatozoïdes est réalisé sur des montages différents des dix aliquotes de CIQ1 puis des 10 aliquotes de CIQ 2.
- protocole 2** : chacun des opérateurs a procédé à une numération dupliquée du même montage des dix aliquotes de sperme pour les deux concentrations pour évaluer la répétabilité des mesures de chaque opérateur.

#### **b. Préparation de l'échantillon CIQ 3**

Le CIQ 3 est un échantillon de sperme qui a une concentration des spermatozoïdes de 200 M/ml, il nous a servi à l'estimation de l'étendue de mesure de notre méthode.

#### **c- Préparation de l'échantillon CIQ4**

Le CIQ 4 est un échantillon de sperme qui a une concentration des spermatozoïdes de 120 M/ml, il nous a servi à comparer notre méthode à la méthode de référence et l'étude de la contamination inter-échantillons.

#### **2.4.1.2. La mise en place d'un échange inter-laboratoire**

Selon la norme NF EN ISO 15189:2012, en l'absence d'organisateur de comparaisons inter-laboratoires pour un examen donné, le laboratoire pourra mettre en place des comparaisons par des échanges avec d'autres laboratoires.

Afin de calculer notre incertitude de mesure et en l'absence de contrôle externe de qualité pour le spermogramme, nous avons mis en place une comparaison inter- laboratoire.

Trois laboratoires connus pour leurs compétences en matière de spermogramme ont reçu chacun un échantillon de sperme à concentration faible dilué selon des conditions prédéterminées afin d'avoir des conditions pré-analytiques similaires.

Nous avons réalisé au total 5 échanges inter-laboratoires pour un seul niveau critique de concentration des spermatozoïdes (CIQ 5) de 3.3M spz/ml.

## **2.4.2. Mise en œuvre du protocole expérimental**

### **- Etude de la fidélité (precision)**

Nous avons évalué la fidélité par l'étude de la répétabilité selon le protocole 2 et de la fidélité intermédiaire ou la reproductibilité intra-laboratoire selon le protocole 1 pour CIQ 1 et 2 [175,161].

### **- Etude de la répétabilité (repeatability, within run precision)**

Nous avons évalué la répétabilité suivant le protocole 2 ou l'analyse de l'échantillon a été réalisée dans les mêmes conditions : même opérateur, même cellule de comptage, même microscope optique.

### **- Etude de la fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire (intermediate precision)**

Nous avons obtenu la fidélité intermédiaire par l'analyse du même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier l'opérateur et le montage des cellules de Makler.

Elle est évaluée pour les deux niveaux de concentration selon le protocole 1 et quantifiée par un coefficient de reproductibilité de chaque CIQ.

### **- Etude de la variabilité inter-opérateurs**

Nous avons estimé la variabilité inter-opérateurs à travers une étude des variances avec le test ANOVA et une étude des coefficients de variabilité, les CIQ 1 et 2 sont analysés selon le protocole 1.

### **- Etude de la variabilité intra-opérateur**

Nous avons étudié la variabilité intra-opérateur par la méthode de Bland et Altman en exploitant les résultats des CIQ 1 et 2 étudiés selon le protocole 2.

### **- Exploitation graphique des résultats du CIQ**

Nous avons exploité graphiquement les résultats de nos CIQ sous forme de deux cartes de contrôles [160,162] :

- la carte de contrôle de la moyenne des moyennes  $\bar{\bar{X}}$  qui permet de détecter des résultats très différents de la valeur cible ou une augmentation globale de la variation.
- la carte de contrôle des écarts-types  $\bar{S}$  qui permet d'étudier la fidélité, elle détermine, si les quatre opérateurs produisent des résultats très variables.

Chaque carte comporte une ligne centrale qui présente selon la carte soit la valeur de la moyenne des moyennes ou la valeur de la moyenne des écarts- types des dix aliquotes de spermes analysés suivant le protocole 1, ce qui permet la visualisation des différents comptages sous forme condensée et représentative.

Les limites de contrôle et de surveillance sont des limites statistiques fixées à partir de la performance de la méthode [169].

#### **-Construction de la carte de contrôle de la moyenne des moyennes $\bar{\bar{X}}$**

Pour chaque niveau de concentration, on détermine :

- 1-  $\bar{\bar{X}}$  : la moyenne des moyennes des quatre opérateurs
- 2-  $\bar{S}$  : la moyenne des écarts types des dix aliquotes de sperme.
- 3- les limites de contrôle supérieure (LCS) et inférieure (LCI) : limitent l'intervalle où les mesures varient avec un niveau de confiance de 99.8%.

Elles sont calculées selon la relation :  $\bar{\bar{X}} \pm A_{3,n} \times \bar{S}$  : pour 3 écarts-types.

- 4- les limites de surveillance supérieure (LSS) et inférieure (LSI) : sont calculées par la relation :  $\bar{\bar{X}} \pm A_{2,n} \times \bar{S}$  : pour 2 écarts-types.

Les coefficients  $A_{3,n}$  et  $A_{2,n}$  sont des paramètres pré-calculés qui dépendent de la taille des échantillons et du type de graphe utilisé, pour quatre opérateurs, leurs valeurs sont respectivement de 1.085 et 1.628 [82].

### **- Construction de la carte de contrôle des écarts-types $\bar{S}$**

Pour chaque niveau de concentration, on détermine :

-  $\bar{S}$ : la moyenne des écarts types des dix aliquotes de sperme.

- Les limites de contrôle supérieure (LCS) et inférieure (LCI) : sont calculées respectivement par les deux relations suivantes :

$$\bar{S} \times S_{0.001,4} = \bar{S} \times 2.527 (10^6 / \text{ml}) \text{ et } \bar{S} \times S_{0.999,4} = \bar{S} \times 0.098 (10^6 / \text{ml})$$

- Les limites de surveillance supérieure (LSS) et inférieure (LSI) :

$$\bar{S} \times S_{0.025,4} = \bar{S} \times 1.916 (10^6 / \text{ml}) \text{ et } \bar{S} \times S_{0.975,4} = \bar{S} \times 0.291 (10^6 / \text{ml})$$

Les coefficients  $S_{2,n}$ ,  $S_{3,n}$  sont des paramètres pré-calculés dépendant de la taille des échantillons  $n=4$  opérateurs et du type de graphe utilisé [82].

### **- Approche de la justesse**

Nous avons établi la justesse à partir des résultats du contrôle interne couplé à la comparaison inter-laboratoire où nous avons comparé la valeur trouvée à la valeur cible attendue (la moyenne des participants) assimilée à la vraie valeur de l'échantillon testé.

L'écart observé correspond au biais :

$$\text{Biais en \%} = (x - v) / v \times 100 \text{ avec :}$$

-  $x$  : valeur retrouvée par le laboratoire lors de la CIL

-  $v$  : moyenne des participants.

### **- Détermination de l'étendue de mesure**

Nous avons procédé à la détermination de la concentration des spermatozoïdes dans 10 dilutions indépendantes du CIQ3 avec de l'eau physiologique.

Chaque dilution a été analysée en triple.

Nous avons évité les dilutions en cascade pour éliminer tout défaut de justesse qui surviendrait après une erreur dès la première dilution.

### **- Estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats d'analyses**

Nous nous sommes basés sur le guide SH GTA 14 [50] pour l'estimation des incertitudes des mesures de notre méthode en utilisant la combinaison des résultats du contrôle interne de qualité et de la comparaison inter-laboratoire.

L'incertitude de la mesure, qui caractérise la dispersion, est exprimée sous la forme d'un écart-type  $s$  qui est la racine carrée de la somme de l'ensemble des variances associées aux sources d'erreur.

Il existe deux composantes d'incertitude, évaluées à partir du contrôle interne de qualité et de la comparaison inter-laboratoire.

Par l'application de la loi de propagation des variances, on obtient alors un calcul d'incertitude composée sous la forme suivante :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(K EEQ)}$$

Avec :

- $u(C)$  : l'incertitude composée
- $u^2(CIQ)$  représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du contrôle interne de qualité.
- $u^2(K EEQ)$  qui est la variance liée à la justesse (biais), qui se quantifie lorsque c'est possible par la différence entre la moyenne des résultats du laboratoire  $X_{lab}$  et une valeur assignée ("valeur cible")  $X_{ref}$  que nous avons assimilé à la moyenne des résultats des laboratoires participant à cette comparaison.

$$\text{Avec } u^2(K EEQ) = \sqrt{\left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + S^2}$$

On appelle erreur de justesse,  $E = X_{lab} - X_{ref}$

Si  $n$  le nombre de comparaisons étudiées, la moyenne de l'écart est :  $\bar{E} = \frac{\sum_i (X_{lab} - X_{ref})}{n}$

$$\text{Et l'écart type des écarts } S : SE = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

$$\text{Donc, } u(c) = \sqrt{\left(\frac{CV \cdot m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + SE^2}$$

#### - Calcul de l'incertitude élargie $U(c)$

C'est l'incertitude-type multipliée par un facteur d'élargissement  $k$ , généralement pris égal à 2 (correspondant à un intervalle de confiance d'au moins 95 %, si la loi de distribution est normale).

### **- Etude de la contamination inter-échantillons (carry-over)**

Nous avons étudié la contamination inter-échantillon par l'analyse du CIQ4 qui a une concentration de spermatozoïdes de 120 M/ml, trois fois (E1, E2, E3) puis après lavage de la cellule de Makler, on a procédé à la numération d'un échantillon d'eau physiologique trois fois consécutives (B1, B2, B3) et nous avons vérifié l'absence de spermatozoïdes dans l'échantillon d'eau.

Cette opération est répétée trois fois.

$$\text{Contamination \%} = 100 \times (B1m - B3m) / (Em - B3m)$$

B1m = moyenne des B1

B3m = moyenne des B3

Em = moyenne des E

### **- La comparaison de méthode**

Nous avons comparé la détermination de la concentration en spermatozoïdes par la cellule de Makler qui est la méthode testée à une méthode de référence qui est la cellule de Neubauer [82] sur 14 échantillons de sperme.

Ces échantillons sont obtenus par dilutions successives de l'échantillon CIQ 4 qui a une concentration des spermatozoïdes de 120 M/ml, ces dilutions couvrent un intervalle de 500.000 spz /ml à 120 millions de spermatozoïdes /ml.

La détermination de la concentration en spermatozoïdes est réalisée au même moment par un seul opérateur pour les 14 échantillons.

### **- L'intervalle de référence**

Nous nous sommes basés sur les références bibliographiques consensuellement reconnues pour déterminer les valeurs de décision clinique et nous avons retenu les valeurs décrites dans le manuel de l'OMS dans sa dixième édition [82].

## **2.5. Méthodologie statistique**

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel statistique XLSTAT, les moyennes, les déviations standards et les coefficients de variabilités ont été utilisés pour analyser les variables continues [160]:

$$\text{- La moyenne } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n},$$

- L'écart-type  $s : \sqrt{\sum_i (X_i - m)^2 / n - 1}$  pour  $n < 30$

- Le coefficient de variation  $CV\% = \text{écart-type} / \text{moyenne}$ , ce dernier est utilisé pour comparer les dispersions indépendamment des valeurs de la variable, il permet aussi de comparer la précision des différentes mesures effectuées avec la même personne.

- Une analyse de variance ANOVA à un facteur équilibré (le nombre de répétitions est le même pour les différents groupes) a été effectuée afin de déceler la présence d'une différence significative dans les résultats des quatre opérateurs.

- Les courbes de Bland Altman [70], cette méthode consiste à réaliser un graphe comportant en ordonnée la différence entre les concentrations obtenues par deux comptages successifs du même opérateur (soit OP-OP') et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux comptages soit (OP+ OP')/2.

Cette moyenne représente une estimation acceptable au plan technique en l'absence de connaissance préalable du biais existant entre les deux séries de données [162], on ajoute une droite représentant la moyenne des différences  $d$  ou biais, et deux droites pointillées représentant les limites de concordance supérieure et inférieure qui sont calculées selon :  $d \pm 2 \text{ sdd}$  avec  $\text{sdd}$  est l'écart-type des différences et qui englobe l'intervalle dans lequel sont comprises 95 % des différences sachant que la distribution de nos valeurs suit une loi normale.

### 3. Résultats

**La valeur cible** : après avoir vérifié l'absence de valeurs aberrantes, nous avons considéré que la moyenne des lectures des quatre opérateurs est la valeur cible ou la vraie valeur.

#### 3.1. La fidélité (precision)

##### 3.1.1. Etude de la répétabilité (repeatability, within run precision)

Nous avons calculé les moyennes, les écarts- types et les CV de répétabilité puis nous les avons confrontés aux CV de Ricos et al que nous avons choisi comme référentiel [157], les résultats sont reportés dans le tableau 18 .

Tableau 18: Moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la répétabilité suivant les deux niveaux de concentration des spermatozoïdes.							
CIQ				CV % selon RICOS [157]	Conclusion		
CIQ1	Moyenne M	Ecart-type SD	CV%		Conforme		
	44.6	3.93	8.81				
CIQ2	12.15	1.69	13.9	26.8			

##### 3.1.2. Etude de la fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire (intermediate precision)

Elle est quantifiée par un coefficient de reproductibilité de chaque CIQ, les résultats sont reportés sur le tableau 19.

Tableau 19: Moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la reproductibilité intra-laboratoire suivant les deux niveaux de concentration des spermatozoïdes.						
CIQ	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV%	Limite souhaitable du CV selon la table de Ricos [157]	Conclusion
CIQ1	40	43.1	2.9	6.72	13.4	Conforme
CIQ2	40	11.7	1.02	8.7		



## 3.2. La variabilité inter-opérateurs

### 3.2.1. Le test ANOVA

Permet la comparaison de la variance des moyennes de la concentration spermatique chez chacun des quatre opérateurs, les résultats sont les suivants :

- 83% de la variabilité est expliquée par le type de l'opérateur
- on remarque que l'intervalle de confiance pour l'effet des quatre opérateurs contient le 0 ce qui indique qu'ils ne sont pas significativement différents.
- le test de turkey HSD a été appliqué à l'ensemble des couples d'opérateurs de différences possibles avec un intervalle de confiance de 95%, il nous a permis de conclure en l'absence d'une différence significative entre les quatre opérateurs.

### 3.2.2. Etude des coefficients de la variabilité inter-opérateurs

La moyenne des coefficients de variabilités inter-opérateurs pour les dix aliquotes analysées est de 8 % (de 7.5 % à 9.5%) pour la concentration normale et de 12,5% (de 9.9 % à 16.2%) pour la concentration faible comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

CIQ	OP 1			OP2			OP3			OP4			Variabilité inter-opérateurs	
	M	SD	CV%	M	SD	CV%	M	SD	CV	M	SD	CV%	Moyenne	CV%
CIQ1	44.1	4.2	9.5	44.2	3.4	7.6	42.6	3.2	7.5	41.8	3.2	7.6	43.1	8
CIQ2	12.1	1.5	12.3	12	1.4	11.6	12.1	1.2	9.9	11.1	1.8	16.2	11.8	12.5

## 3.3. La variabilité intra-opérateur

Les résultats des dix déterminations de concentrations des spermatozoïdes réalisées par chaque opérateur pour chaque niveau de concentration CIQ 1 et 2 sont reproduits selon des courbes de Bland et Altman et représentés dans la figure 6.

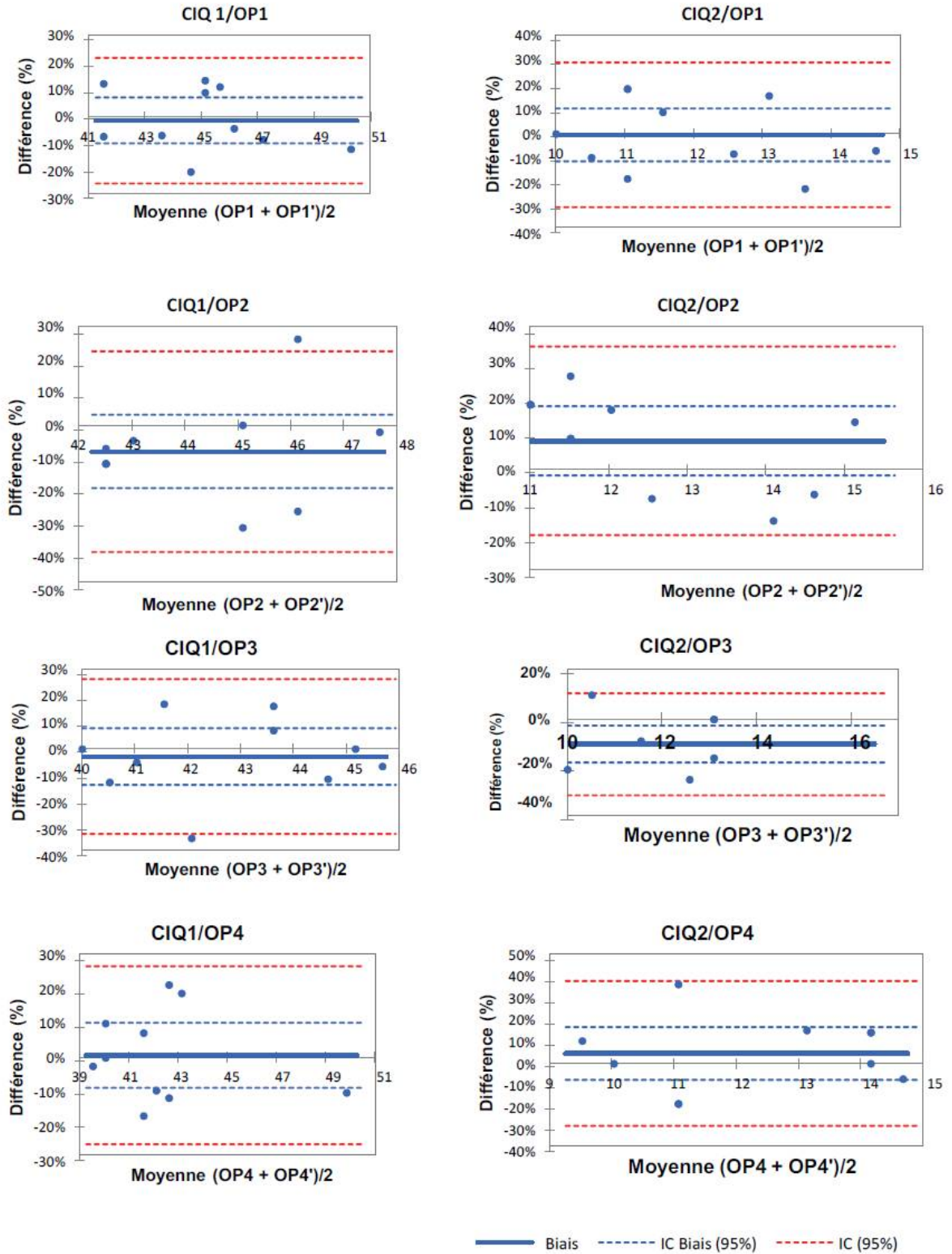


Figure 6: Les courbes de Bland et Altman de chacun des quatre opérateurs selon CIQ1 et 2.

### 3.4. Exploitation graphique des résultats des contrôles internes de qualité.

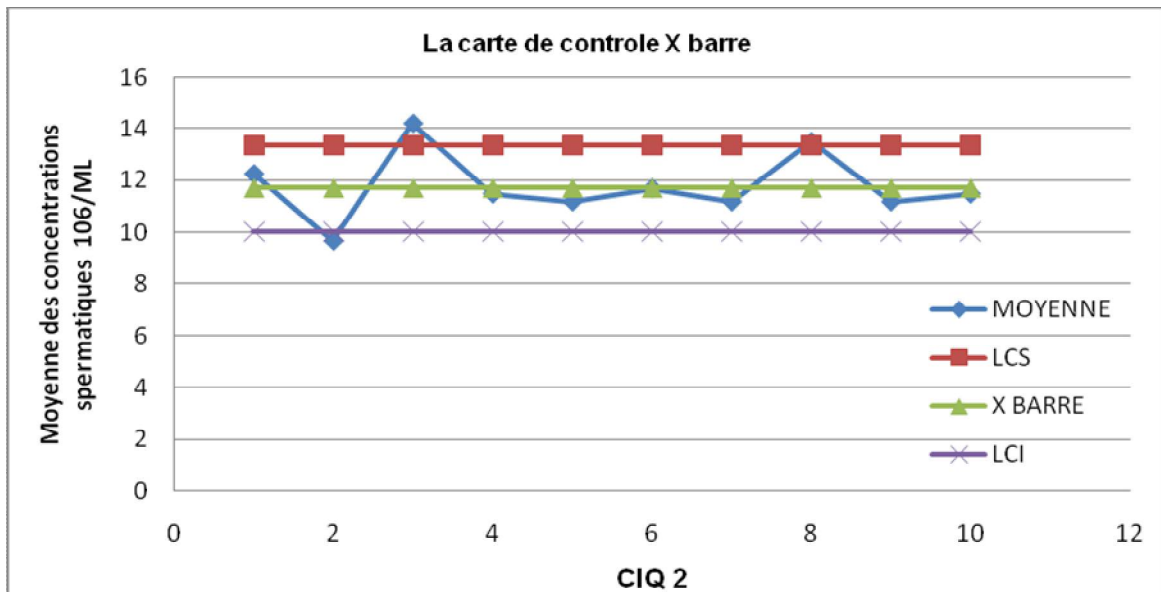
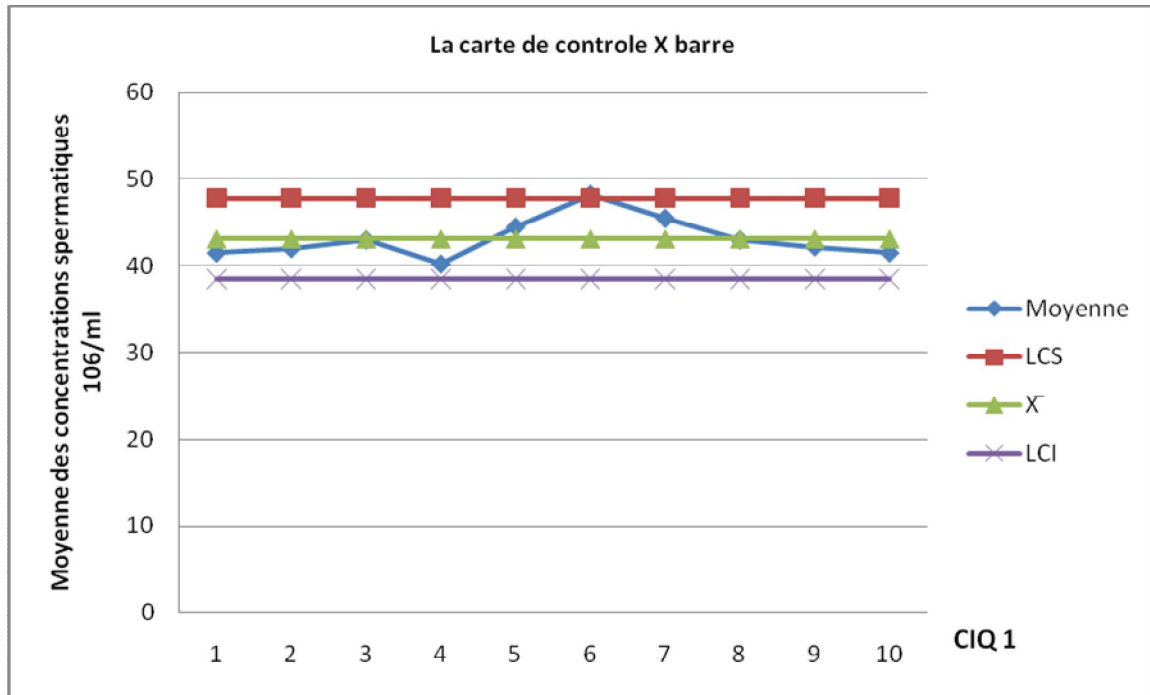
#### 3.4.1. Le test de variance Bartlett

Ce test nous a donné un p value de 0.9 largement supérieure au p value de 0.05 donc, nos variables sont distribuées selon une loi normale, cette propriété nous permet de construire nos cartes de contrôle  $\bar{X}$  et  $\bar{S}$ .

#### 3.4.2. Construction de la carte de contrôle de la moyenne des moyennes $\bar{X}$ -Figure 7-

Les valeurs cibles  $\bar{X}$  et  $\bar{S}$  ainsi que les limites de contrôles et de surveillances supérieures et inférieures pour les deux concentrations spermatisques sont reportées dans le tableau 21.

Tableau 21: Les valeurs cibles et les limites de contrôles et de surveillances supérieures et inférieures pour les deux concentrations spermatisques CIQ1 et 2.										
	$\bar{X}$	LCS	LCI	LSS	LSI	$\bar{S}$	LCS	LCI	LSS	LSI
<b>CIQ 1</b>	43.1	47.8	38.4	46.2	40	2.9	7.3	0.29	5.5	0.84
<b>CIQ 2</b>	11.7	13.36	10.04	12.8	10.6	1.02	2.57	0.1	1.95	0.29



**Figure 7:** Les cartes de contrôle de la moyenne des moyennes  $\bar{X}$  des CIQ 1 et 2

### 3.4.3. Construction de la carte de contrôle des écarts-types $\bar{s}$ -

Figure 8-

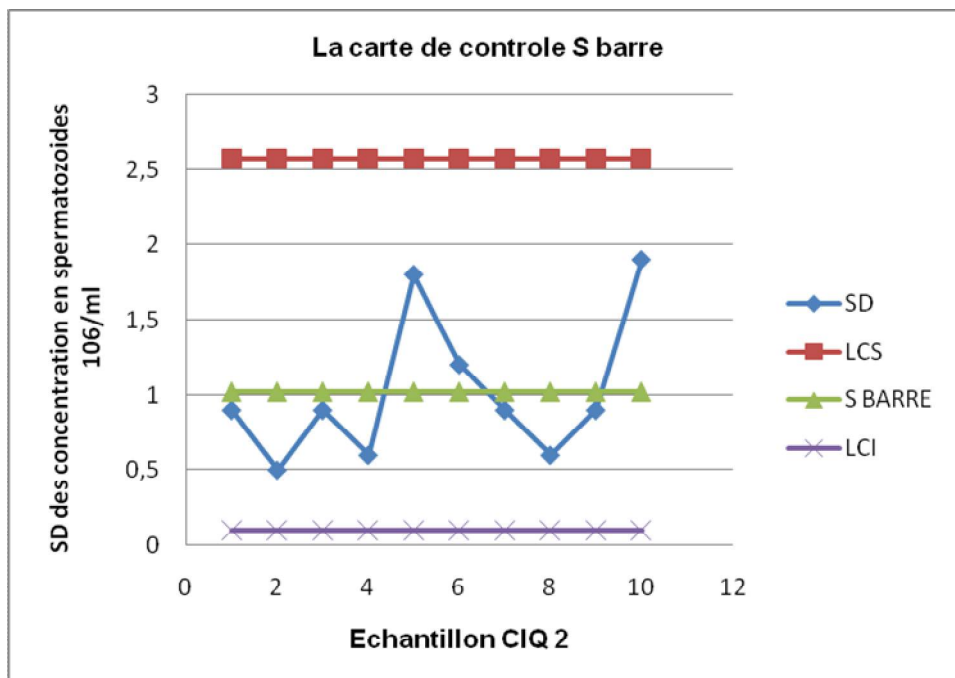
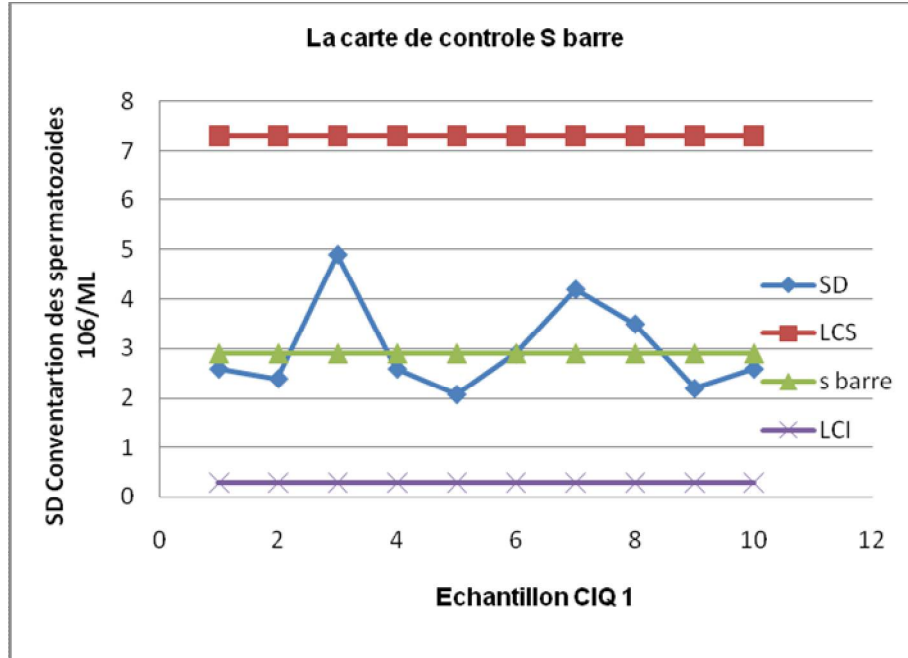


Figure 8: Les cartes de contrôle des écarts-types  $\bar{s}$  des CIQ1 et 2

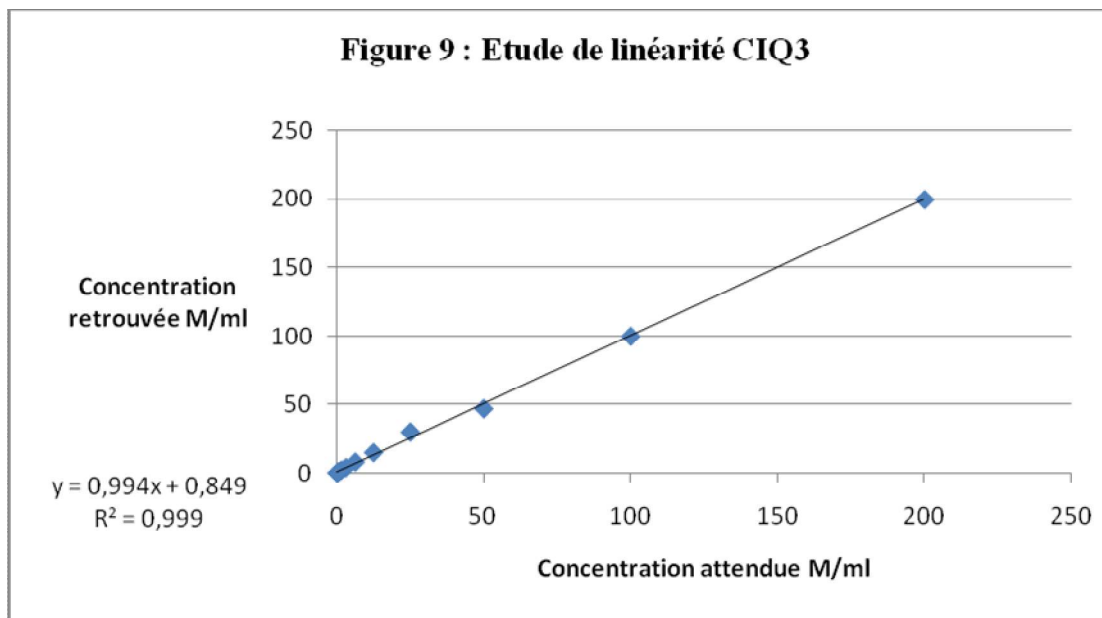
### 3.5. La justesse

Les résultats de l'évaluation de la justesse sont reportés dans le tableau 22.

Tableau 22: Evaluation de la justesse							
Echantillon	Valeur labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (Toute technique)	Biais % (groupe de pairs)	Biais % (toute technique)	Biais limite	Conclusion
CIQ 4	3.4	3.3	3.6	3%	5.5%	NA	CONFORME

### 3.6. L'étendue de mesure

Les résultats sont reportés sur deux graphes, le premier est un graphe  $y_i = f(x_i)$  avec en abscisse les concentrations ( $x_i$ ) attendues et en ordonnée la moyenne des valeurs retrouvées pour chaque dilution ( $y_i$ ) puis la droite correspondante a été tracée (Figure 9), le deuxième graphe représente le rapport en % des résultats retrouvés avec la cellule de Makler (Y) et les valeurs théoriques en fonction des dilutions (X) (figure 10).



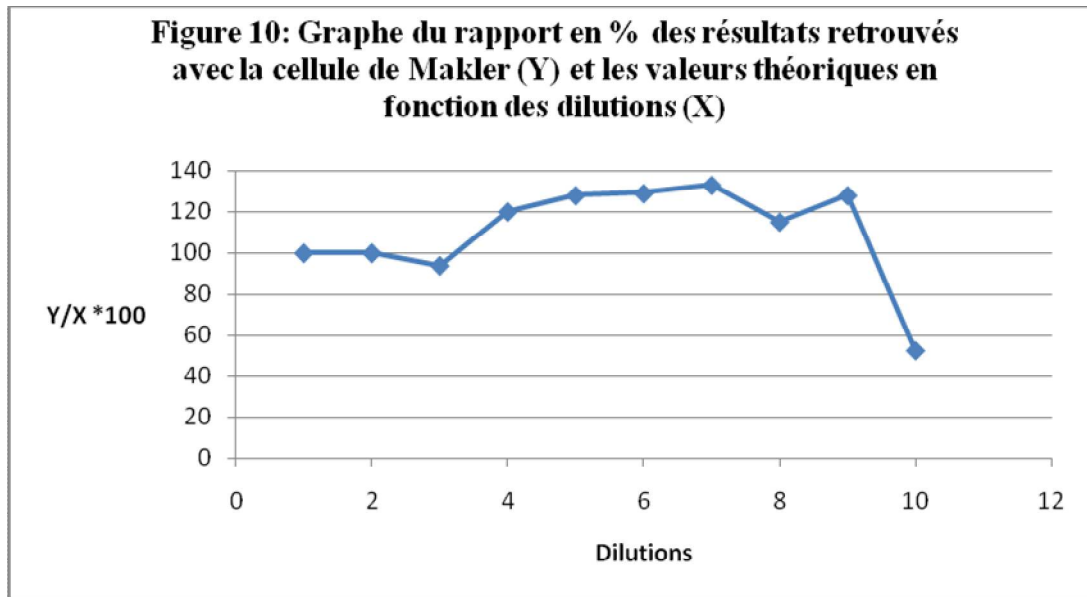


Tableau 23: Etendue de mesure de notre méthode	
La linéarité	$y = 0,994x + 0,849$
Limite de quantification	Pas d'intérêt clinique
Etendue de mesure	600 000 spz/ml à 200 M/ml

### 3.7. L'incertitude de mesure

#### 3.7.1. Résultats de la maîtrise des risques

Les résultats de l'analyse des risques sont reportés dans le tableau 24.

Tableau 24: La maîtrise des risques du sous processus « concentration des spermatozoïdes»

M	Points critiques	F	G	D	IC	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise
Matière (Échantillons)	Identito-vigilance	1	3	1	3	-Formation du personnel -Double contrôle à la réception des prélèvements par deux personnes différentes	-Procédure d'identito-vigilance du laboratoire -Procédure de gestion des non conformités
	Préparation du patient	2	2	1	4	-Formation du personnel -Information des patients	-Manuel de prélèvement -Procédures d'envoi des échantillons vers le laboratoire d'AMP
	Type de récipient	1	2	1	2	-Conformité par rapport aux exigences du laboratoire AMP :  - Usage unique  -Type de stérilisation	-Procédure de gestion de stocks -Procédure de gestion des solutions et milieux de culture -Procédure de gestion des consommables -Procédure de gestion des non conformités
	-délai avant analyse < 30 min	1	2	1	2	-Contrôle à la réception  -Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	-Procédure de réception des échantillons biologiques au niveau du laboratoire AMP -Feuille de liaison de l'échantillon de sperme - Procédure de gestion des non conformités -Fiche de suivi des températures
Milieu (laboratoire)	Conception et architecture du laboratoire	1	2	1	2	-Zone technique séparée physiquement de la zone administrative et de la zone d'archivage	Cahier de charge
	Hygiène et entretien des locaux	1	2	1	2	-Nature des produits d'hygiène utilisée -Fréquence de nettoyage -Formation du personnel responsable -Tri des déchets -Circuit des déchets	-Liste des produits d'hygiène et de décontamination autorisés. -Instructions des fournisseurs -Instructions de nettoyage du sol -Instruction de nettoyage des hottes à flux laminaire -Instruction en cas d'expositions accidentelles au sang.
Matériel (équipement)	Installation et fonctionnement optimale de l'équipement technique	1	3	2	6	-En l'absence de PSM, les hottes à flux laminaires sont acceptables. - Maîtrise de l'équipement (planification des maintenances Préventives et correctives) -Etalonnage des équipements et matériels de mesure -Décontamination et hygiène	-Cahier de charge -Inventaire de l'ensemble du parc équipement présent au laboratoire en fonction de sa criticité -Procès-verbal de conformité à l'installation de l'équipement -Fiche d'identification de chaque équipement -Classeur équipement -Etiquette métrologique -Fiche de vie de l'équipement -Certificat de contrôle qualité -Procédure des maintenances préventives et correctives de l'équipement -Planning des maintenances



**Tableau 24: La maitrise des risques du sous processus « concentration des spermatozoïdes»**

M	Points critiques	F	G	D	IC	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise
							préventives -Processus de confirmation métrologique -Instruction d'archivage -Procédure de gestion de documentation - Instruction de nettoyage -Procédure de gestion des déchets. -Procédure de gestion des risques
<b>Méthode</b>	Adaptation des méthodes à l'environnement propre du laboratoire	1	3	2	6	Validation technique de la méthode	-Procédure de vérification/validation d'une méthode - -Procédure de préparation de sperme -Instructions d'encodage -Instructions d'archivage -Procédure de la gestion documentaire
<b>Main d'œuvre</b>	-Gestion des compétences du personnel -Vérification, évaluation et maintien des compétences du personnel	1	3	2	6	Procédure de formation et habilitation du personnel, plan de formation	-Dossier individuel du personnel -Fiche de poste -Fiche de fonction -Fiche d'évaluation trimestrielle des opérateurs en fonction des critères de performance -Planning d'évaluation des compétences -Procédure d'accompagnement des nouveaux techniciens

### 3.7.2. Estimation de l'incertitude de mesure sur les résultats d'analyses

#### Exploitation des CIQ – concentration des spermatozoïdes

Effectif = 40	M/ ml
Moyenne	11.7
Ecart-type	2.9
CV%	6.72

#### Exploitation des résultats de la CIL

Effectif du groupe de pairs	3
Nombre de valeurs obtenues par le laboratoire	5
Nombre de valeurs obtenues par l'ensemble du groupe de pairs	15
Valeur assignée (moyenne des pairs)	3.3 M/ml
Valeur trouvée par le Laboratoire (sur le moins bon résultat des 5 échantillons pour avoir le biais max)	3.6 M/ml
Biais max "absolu" ou erreur de justesse (max  Ei )	3.6-3.3= +0.3 M/ml
Biais moyen "absolu" ou moyenne des écarts $\bar{E}$	0.06
Ecart type des différences (SE)	0.057

$$\text{Donc : } u(c) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + SE^2} = 0.7 \text{ M/ml}$$

**Calcul de l'incertitude élargie U(c) :**  $U(C) = 2 \times u(C) = 1.4 \text{ M/ml}$

Les résultats du calcul de l'incertitude sont exprimés de la façon suivante :

$C \pm U$  (k=2) en millions de spermatozoïdes par mL.

Estimation de l'incertitude sur le niveau bas	U%	U% (Ricos et al)
$3.4 \pm 1.4 \text{ M spz/ml}$	41%	37.7%

### **3.8. La contamination inter-échantillons (carry-over)**

La contamination inter-échantillons = 0 %

### **3.9. Les interférences**

Pour le sperme, il n'existe pas de composé dont la présence est susceptible d'entraîner un résultat inexact [82].

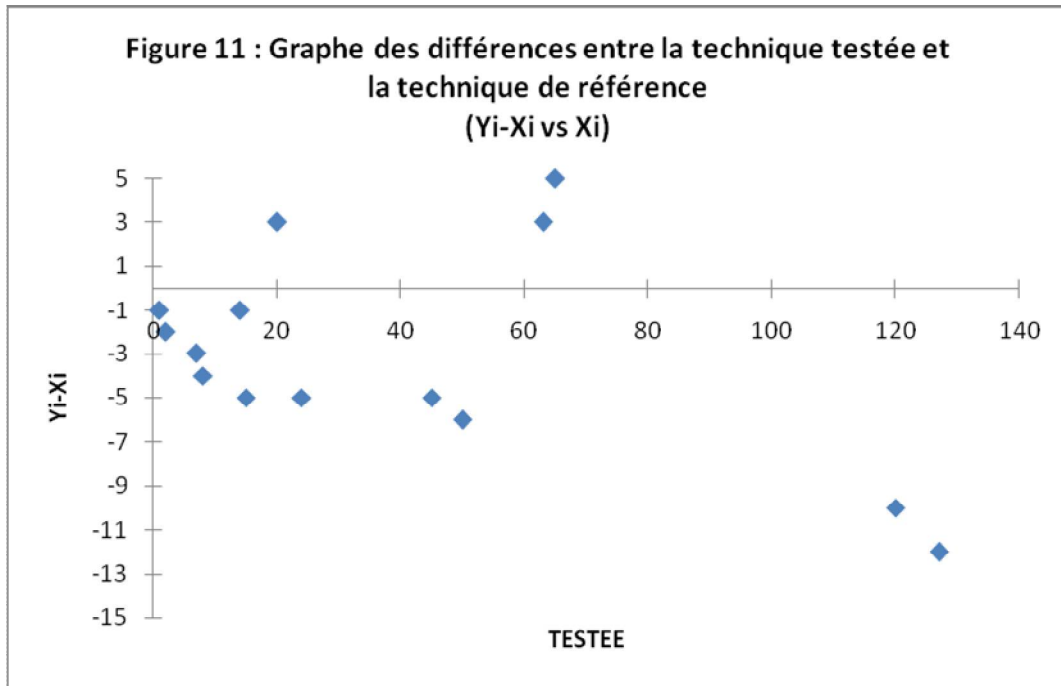
### **3.10. La spécificité/sensibilité analytique**

Non adaptées à notre technique manuelle.

### **3.11. La comparaison de méthode**

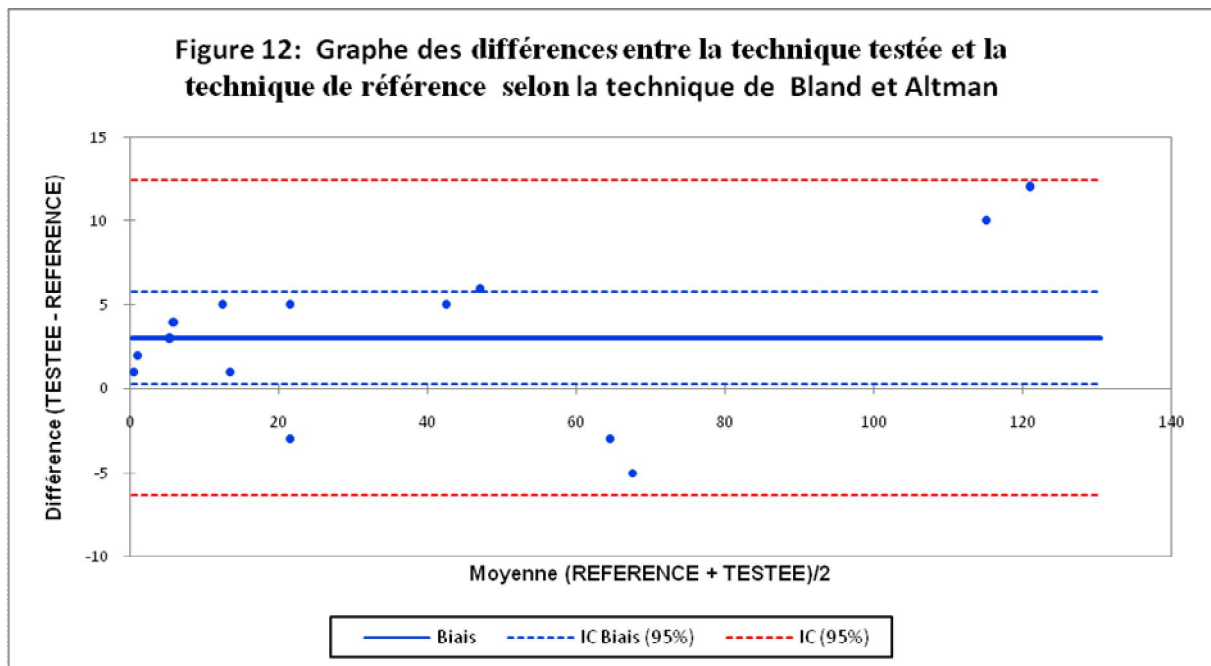
#### **3.11.1. Calcul des différences observées entre les deux techniques**

Les différences observées entre les résultats de la technique testée ( $x_i$ ) et ceux de la technique de référence ( $y_i$ ) sont reportées sur un graphe (Figure 11) avec la valeur correspondante de  $x_i$  en abscisse [6,163].



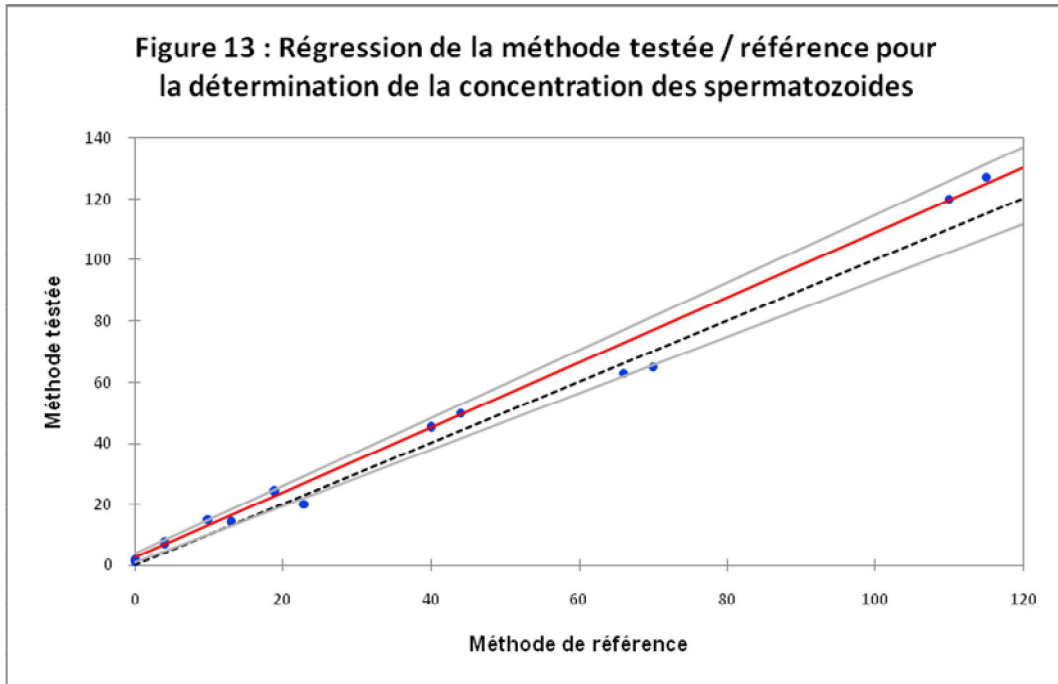
### 3.11.2. Calcul des différences par la technique de Bland Altman

Le graphe des différences entre la technique testée et la technique de référence selon la méthode de Bland et Altman est représenté dans la figure 12.



### 3.11.3. Calcul de la droite de régression

Nous avons utilisé la droite de régression linéaire non paramétrique Passing Bablock de la méthode testée versus méthode de référence (Figure 13).



Ligne continue (rouge) représente la droite ( $Y=X$ ) sur laquelle les points doivent être localisés pour la validation de la méthode ;

Ligne discontinue (noir): intervalle de tolérance 95% ;

Ligne grise : limites d'acceptation à 5 % ;

Points : concentrations calculées

**La méthode Y (Référence : Neubauer) : Moyenne : 37 et Ecart-type : 39,362**

**La méthode X (Testée : Makler) : Moyenne : 40,071 et Ecart-type : 41,401**

### 3.12. L'intervalle de référence

La valeur de référence de la concentration de spermatozoïdes est égale ou supérieure à  $15 \times 10^6/\text{ml}$  (correspond au 5e percentile) et égale ou supérieure à  $39 \times 10^6/\text{éjaculat}$  (5e percentile) dans le cas de la valeur absolue [82].

## **4. Discussion**

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la validation de la méthode « concentration des spermatozoïdes », un sous- processus du spermogramme qui est un processus analytique complexe constitué de l'enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus, faisant appel à des méthodes quantitatives et/ou qualitatives.

Selon le SH GTA 01 [139], un processus analytique est défini comme des étapes d'analyse à proprement parlé, débutant sur tout ou une partie de l'échantillon biologique (aliquote), comprenant une préparation éventuelle du spécimen, jusqu'à l'obtention d'un résultat d'analyse (mesure, identification, lecture, ...), généralement à l'aide d'un instrument de mesure analytique.

Nous avons choisi de commencer avec ce sous processus du fait de la corrélation existante entre le nombre de spermatozoïdes et le taux de grossesse [150] ainsi qu'au rôle de la détermination de la concentration des spermatozoïdes associée à la mobilité dans l'orientation du choix de la technique d'AMP la plus adaptée [166].

La concentration des spermatozoïdes est une méthode quantitative de portée B puisqu'elle est réalisée avec la cellule de Makler au lieu de la cellule de Neubauer qui est la cellule de référence.

Les sources bibliographiques traitant le sujet sont limitées, nous avons suivi les recommandations du COFRAC dans son guide SHGTA 05 [44] pour la détermination des critères de performances à valider; quant aux limites d'acceptabilité, nous avons utilisé les critères de Ricos et al [ 157] qui sont basés sur les variations bibliographiques intra et inter-individuelles et qui présentent l'avantage d'être un modèle international avec des mises à jour régulière de la base de données, même si les valeurs sont obtenues avec des effectifs limités et avec des valeurs cibles concentrations indépendantes.

Dans notre vérification expérimentale, nous avons commencé par la mise en place d'un contrôle interne de qualité qui permet le suivi de la maîtrise du processus analytique et la prévention des erreurs par l'observation d'un certain nombre de phénomènes tel que les variations [49].

Selon la norme ISO 15189:2012 [2], un CIQ doit se comporter de façon la plus fidèle par rapport aux échantillons des patients, de concentration proche des seuils de décision clinique et indépendant du fournisseur des réactifs ou d'instruments.

Nous avons choisi pour la mise en place de notre contrôle, un CIQ maison peu cher et qui est généré spécifiquement pour les besoins du laboratoire, avec ce type de CIQ, l'obtention d'une valeur vraie est difficile, sauf en cas d'externalisation de ces contrôles, pour l'instant, il n'est possible d'interpréter les résultats que si on considère la moyenne des lectures des quatre opérateurs comme la valeur cible ou la vraie valeur [49, 167].

Selon les recommandations de l'OMS [82], nous avons utilisé les cartes de contrôle comme moyen d'exploitation des résultats du CIQ après avoir vérifié que nos résultats suivent une loi normale et peuvent faire l'objet d'une analyse de variance paramétrique.

L'exploitation graphique permet de visualiser l'évolution des caractéristiques mesurées à savoir la moyenne et l'écart-type, ceci après avoir vérifié l'homogénéité de nos quatre séries de résultats (quatre opérateurs) par le test de variance Bartlett, elle nous a paru simple donnant une présentation plus claire sur la distribution des résultats, il est aisé de vérifier si les valeurs de contrôle se situent à l'extérieur des limites de surveillance à condition que les résultats soient normalement distribués, elle nous permet aussi de comparer la performance entre les différentes personnes dans le laboratoire ainsi que d'assurer la formation et la qualification du nouveau personnel.

Ainsi, la carte  $\bar{X}$  permet de détecter des résultats très différents de la valeur cible ou une augmentation globale de la variation, ce qui donne des informations sur le biais [169] certes avec moins de certitude qu'un contrôle externe de qualité mais qui peut être suffisant pour un contrôle de routine.

L'analyse de la carte  $\bar{X}$  montre que pour le CIQ1, toutes les numérations spermatisques sont incluses entre les deux limites de contrôle supérieure et inférieure témoignant de l'absence d'un biais ou de résultats très différents de la valeur cible, le même constat pour le CIQ2 où une seule aliquote était hors zone de contrôle.

D'un autre côté, la carte  $S$  permet d'étudier la fidélité, elle détermine, si les quatre opérateurs produisent des résultats très variables, puisque chaque niveau de nos CIQ provient du même éjaculat, aucune différence entre les aliquotes n'est attendue, de sorte que toute différence significative suggère un biais systématique dans la mesure par un ou plusieurs opérateurs.

La variabilité inter-opérateurs qui est un indicateur de maîtrise de la réalisation des méthodes manuelles a été évaluée par trois types de méthodes, d'abord le test d'analyse des variances ANOVA qui permet la comparaison de la variance des moyennes de la concentration spermatique chez chacun des quatre opérateurs, il nous a permis de constater la présence d'une cohérence entre les résultats des différents opérateurs puis le CV inter-opérateurs qui a été de 8 % et 12.5 % pour respectivement la concentration normale et faible, ces deux chiffres restent dans la zone d'acceptabilité située aux alentours de 15 % [ 83,168 ] et enfin l'analyse de la carte des écarts-types qui a montré que pour les deux CIQ, toutes les mesures sont dispersées dans l'intervalle ( $m \pm 3 s$ ) statistiquement acceptable, ce qui nous a amené à conclure en l'absence de variabilité dans les résultats des 4 opérateurs.

Pour l'étude de la variabilité intra-opérateur, nous avons utilisé les courbes de Bland et Altman pour comparer les différences par rapport à la moyenne (égale à la moyenne des moyennes des lectures du même opérateur) et apprécier pour le même opérateur l'écart observé entre deux comptages de la même aliquote et d'en déduire sur l'ensemble des 10 aliquotes étudiées le biais intra-opérateur, l'analyse de ces courbes a montré que pour le CIQ1 a concentration normale, un seul opérateur (OP2) a eu un biais différent de 0 mais toujours inférieur à 15 % que nous avons considéré comme limite acceptable [168].

Pour le CIQ2, trois opérateurs (OP2, OP3, OP4) ont eu des biais différents de zéro mais toujours inférieurs à 15 %, l'écart retrouvé entre les deux concentrations est attendu puisque la variabilité est d'autant plus importante que la concentration est faible, ce constat est en accord avec les résultats d'autres auteurs [84,80].

Néanmoins, la majorité des différences des mesures de la concentration spermatique se situe entre les deux seuils limites de concordance correspondant approximativement à deux écarts-types de la moyenne, ce qui témoigne d'une faible variabilité des mesures, les rares différences hors seuil de concordance peuvent être dues soit à des différences d'échantillonnage ou une mauvaise homogénéité de l'aliquote.

La répétabilité est un effet aléatoire se produisant entre des mesures répétées effectuées lors d'une même série d'analyses, dans notre série, les CV de répétabilité sont deux fois plus faibles que les valeurs de Ricos et al [157] pour la concentration normale (moyenne des CV de 10,6 %) et faible (moyenne des CV de 15 %).



Puisque notre programme de contrôle prend en compte le processus analytique entier, de l'introduction dans le laboratoire de l'échantillon à analyser au rapport d'analyse, nous avons pu évaluer la reproductibilité intra-laboratoire qui indique la dispersion des résultats d'analyse si le même échantillon est donné au laboratoire à différentes occasions, notre technique est reproductible pour les deux niveaux de concentrations spermatiques normale et faible avec des CV de 6,72 % et 8,7 % respectivement et qui sont inférieurs aux données de la littérature (CV=13,4% pour Ricos et al 1999) [157].

Le CIQ nous permet de conclure que notre méthode est fidèle, répétitive et reproductible et que les opérateurs procèdent à la détermination de la concentration des spermatozoïdes avec un minimum de variabilité intra et inter-opérateurs.

L'analyse de la comparaison de notre méthode à la méthode de référence utilisant la cellule de Neubauer est effectuée par trois graphiques, le graphique de régression selon *Passing-Bablok* [171], le graphique des différences et celui de Bland Altman [70].

Le graphique de régression selon *Passing-Bablok* présente l'intérêt d'une bonne fiabilité aux données extrêmes, on remarque que la méthode testée a une moyenne et une variance plus importantes que la méthode de référence.

Le coefficient de corrélation est égal à 0.98, il indique si notre équation de la droite est forte ou pas, plus il est proche de 1 plus l'équation est forte.

La représentation est selon une droite de régression de type :  $Y_{\text{Neubauer}} = 2.6 X_{\text{Makler}} + 1.06$  avec une pente  $\alpha$  de 2.6 et une ordonnée à l'origine  $\beta = 1.06$ , dans l'idéal elle devrait être de la forme  $y = 1x + 0$ .

La valeur de la constante est de 2.6 avec un intervalle de confiance ne comprenant pas le 0, cette valeur mesure la différence systématique entre les méthodes, on peut rejeter l'hypothèse d'une différence systématique nulle.

Le coefficient de pente est égal à 1.06 avec un intervalle de confiance incluant la valeur 1, cette valeur mesure la différence proportionnelle entre les deux méthodes, on ne peut pas rejeter l'hypothèse de différence proportionnelle nulle.

En analysant les hypothèses  $\alpha=1$  et  $\beta=0$ , nous avons conclu à la présence de différences systématiques entre les deux méthodes.

Dans le graphe de Bland Altman [70], nos points sont répartis de manière aléatoire de part et d'autre de la moyenne et compris entre les 2 limites des +/- 2 écarts types sauf deux échantillons dont les valeurs sont supérieures à 110 millions de spermatozoïdes par mL mais qui sont dans la limite des 3 écarts types ce qui n'a aucun impact clinique pour le patient et le couple.

Par contre, nous avons remarqué que dans les faibles concentrations inférieures à 20 M/ml, la discordance entre les deux méthodes est supérieure à deux millions que nous avons choisi comme différence acceptable dans cette tranche de concentration [172], ce qui nous a poussés à changer notre protocole opératoire au sein du laboratoire et à procéder à une vérification par la cellule de Neubauer de tous les échantillons de sperme avec une concentration spermatique inférieure à 20M/ml et particulièrement lors de l'insémination par la méthode FIV en attendant la réexamination de cette comparaison en utilisant un nombre plus élevé d'échantillons, une cohorte minimum de 40 échantillons est recommandée [53].

La détermination de l'étendue de mesure de notre méthode nous a permis de vérifier si elle est adaptée aux concentrations recherchées, l'exigence de linéarité s'applique à la relation entre la concentration calculée et la concentration retrouvée.

Dans le graphe qui représente le rapport en % des résultats retrouvés avec la cellule de Makler (Y) et les valeurs théoriques en fonction des dilutions (X), la partie rectiligne de notre courbe correspond à la zone de linéarité à l'intérieur de laquelle les résultats sont validés, l'examen visuel de cette courbe montre une linéarité parfaite entre 200 M/ml et 20 M/ml et suffisante dans l'étendue des concentrations de 600.000 spz/ml à 20 M spz/ml, au-dessous de 600.000 spz/ml, notre méthode n'est plus linéaire.

Sachant que toute mesure a un certain degré d'erreur, nous avons été confrontés à un obstacle majeure qui est l'absence d'une EEQ qui apporte des informations complémentaires pour que le niveau de sécurité de nos résultats soit alors optimale [173], ce qui nous a poussé à organiser une comparaison inter-laboratoire certes avec un nombre limité de laboratoires participants mais ceci nous a permis l'estimation d'un critère de performance indispensable qui est l'incertitude de mesure qui dépend à la fois du biais qui additionne ou soustrait une valeur constante à toutes les mesures, de l'imprécision qui est l'erreur aléatoire d'une mesure et de la variabilité intra et inter-opérateurs au sein du laboratoire [167].

Nous avons utilisé une méthode qui combine les résultats du contrôle interne de qualité et de la comparaison inter-laboratoire.

L'exploitation des CIQ permet d'évaluer la reproductibilité interne donc de quantifier la composante de fidélité, il faut idéalement exploiter au moins une trentaine de valeurs par niveau de concentration ( $n > 30$ ) sur une période longue.

Les échanges inter-laboratoires à partir d'échantillons biologiques sont extrêmement limités en raison de l'instabilité dans le temps des paramètres du sperme et l'absence de valeurs étalons, donc nous nous sommes limités à l'organisation de 5 CIL ce qui aurait pu être plus pertinent si le nombre de participants entrant dans le calcul de la valeur cible était statistiquement significatif (supérieur à 30).

Nous avons étudié notre incertitude de mesure sur un échantillon de sperme de 3.6 M/ml, elle était de 1.4 M/ml (41%) légèrement supérieure à la limite de 37.7% selon Ricos[157]. Si dans cette concentration de sperme, l'incertitude élargie n'a pas d'impact sur la prise en charge du patient, une réévaluation de l'incertitude avec un échantillon à concentration plus proche du seuil décisionnel (choix entre FIV et ICSI) est recommandée, sachant toutefois que l'incertitude est d'autant plus grande que la concentration des spermatozoïdes est faible.

***Quatrième partie :  
Discussion générale***

Comme pour les autres examens de la biologie médicale, ceux effectués en biologie de la reproduction doivent bénéficier d'une démarche d'assurance qualité performante et adaptée afin de maîtriser le processus de réalisation de la tentative de FIV dans sa globalité depuis la prescription du médecin en passant par la phase pré-analytique avec la traçabilité des échantillons en particulier le liquide folliculaire qui est un prélèvement précieux qui ne peut être renouvelé jusqu'à la phase post-analytique et prestation de conseils.

Si dès 2010, avec la publication du guide de bonne exécution des analyses (GBEA marocain), les LBM ont été amenés à une formalisation des pratiques dans un cadre réglementaire avec l'organisation des CIQ et la participation à des EEQ, l'implication volontaire dans des démarches d'accréditation ne peut être que bénéfique. Elle nécessite avant tout l'engagement de la direction du laboratoire, avec une adhésion sans faille de l'ensemble des intervenants, ce qui permet de rassembler toute l'équipe autour de la construction du système qualité dans le but de mettre en valeur la compétence du personnel et améliorer la gestion interne du laboratoire.

Ces efforts se traduisent par une réelle amélioration de la qualité des résultats et de la traçabilité et nécessiteront un travail important de suivi de ce système qualité et un management quotidien du laboratoire.

Les exigences de la norme ISO 15189 sont nombreuses et parfois difficiles à respecter en intégralité, alors pour y parvenir, il est nécessaire d'agir avec souplesse et par étapes.

Si le chapitre 4 de la norme ISO 15189 décrit l'organisation, les responsabilités et les moyens nécessaires pour mettre en œuvre une politique qualité [3], le chapitre 5 quant à lui décrit les exigences techniques, en incluant le personnel, les locaux, les étapes pré-analytique, analytique, post-analytique et la validation des méthodes qui reste une étape fondamentale pour tous laboratoires qui souhaitent s'engager dans une démarche d'accréditation.

Ainsi, la norme ISO15189:2012 reprend les exigences de l'ISO17025 concernant les données d'entrée des méthodes (méthodes, milieu, matériel, main d'œuvre) dans le cadre de méthodes validées et suivies en continu par les analyses des tendances à travers les CIQ et le suivi de la fidélité intermédiaire, l'évaluation externe de la qualité (EEQ et justesse), puis l'approche des incertitudes de mesure et les analyses des risques [25] afin de vérifier que la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés.

Le contrôle du maintien de ses performances dans le temps passe par la construction des cartes de contrôle.

Au niveau du laboratoire AMP, plusieurs actions ont été menées dès la planification de nos achats en équipements biomédicaux, milieux de culture, consommables, les mises en conformité, la motivation du personnel, un point essentiel pour l'adhésion générale au projet jusqu'à la validation technique de nos méthodes.

Cette validation consiste à définir nos objectifs de performances analytiques, caractériser les performances de la technique puis discuter les résultats obtenus en associant la démarche bibliographique et surtout en justifiant nos choix. Elle participe donc pleinement à la démarche de maîtrise de la qualité des prestations du laboratoire.

Dans ce travail, nous avons essayé de répondre aux exigences de la norme ISO 15189:2012 en termes de validation de deux méthodes d'AMP une quantitative et l'autre qualitative toutes les deux en portée flexible B mais dont la méthodologie de validation est complètement différente qu'il s'agisse du choix des indicateurs de performance ou de l'importance de la vérification bibliographique et expérimentale.

Ainsi dans les méthodes qualitatives, les notions de justesse, d'intervalle de mesure et d'incertitude sont difficiles à déterminer d'où le grand intérêt de la maîtrise de la variabilité inter-opérateurs et l'analyse des risques.

Nous avons utilisé deux méthodes complémentaires pour documenter la gestion des risques et éventuellement coter les risques identifiés à savoir la méthode 5M et l'AMDEC (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité), ces deux méthodes permettent de lister les points critiques, de les hiérarchiser par cotation, de vérifier si les modalités de maîtrise déjà prévues sont suffisantes et de proposer des actions préventives pour tout risque non maîtrisé [3].

Les articles consacrés aux retours d'expériences qui paraissent dans les revues professionnelles ainsi que tous les documents externes qu'ils soient réglementaires, normatifs, issus des sociétés savantes, produits par les fournisseurs, sont autant de référentiels documentaires, sources à connaître et à maîtriser pour le déroulement du processus de validation des méthodes [95].

Les documents du COFRAC, et particulièrement les guides techniques d'accréditation (GTA) résultats de la réflexion collégiale des biologistes médicaux publics et privés français et des membres des instances de la section santé humaine du COFRAC [3], présentent des précisions suffisantes pour répondre aux exigences de la norme au sein du laboratoire.

Au cours de cette démarche de validation volontariste, le travail demandé pour maîtriser ces deux méthodes a été très profitable, il nous a permis une meilleure maîtrise en n'oubliant aucun aspect de la méthode, le suivi des performances de la méthode permet d'en vérifier le maintien, d'identifier les dérives et d'y remédier.

Il nous a permis aussi d'identifier nos points de faiblesses et les défis à relever à travers plusieurs contraintes tels que :

- l'absence de formations qualifiantes en qualité où même si l'ensemble de l'équipe du laboratoire est sensibilisé à l'assurance qualité, nous avons constaté qu'à côté des connaissances techniques, des connaissances relatives au domaine de la qualité sont nécessaires d'où l'intérêt de la présence d'un qualicien pour des raisons techniques (maîtrise de la norme, du vocabulaire qualité et de la gestion documentaire) et pour des raisons organisationnelles (avoir du temps dédié uniquement à la démarche qualité) [165].

- l'absence de programmes d'évaluations externes de la qualité : même si la participation à des programmes de comparaison inter-laboratoire est obligatoire, l'absence de cette évaluation pour les techniques d'AMP au niveau national prive les laboratoires d'AMP d'un dispositif important pour la validation de leurs techniques, il appartient au biologiste responsable de mettre en place une telle comparaison.

- la lourdeur de la gestion documentaire puisque la maîtrise documentaire est une exigence bien connue des laboratoires, une organisation claire et efficace de toutes les formes de veille documentaire (normative, réglementaire) est un outil incontournable pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189:2012.

Toutefois son application aux documents se heurte encore à de nombreuses difficultés liées principalement à l'organisation particulière du laboratoire AMP au sein du centre clinico-biologique avec la présence de deux architectures du système documentaire d'où l'intérêt d'un seul système de management de la qualité pour toute la structure et avec des procédures en commun qu'ils s'agissent des procédures et des modes opératoires internes ou des fiches techniques externes afin de garantir que toutes les procédures soient documentées, connues, comprises et approuvées par les utilisateurs du côté clinique et biologique [3].

L'acquisition d'un système de gestion électronique des documents présentera de grands avantages quant à l'harmonisation des systèmes documentaires par leurs identifications, indexations, incrémentation des versions, retrait des documents obsolètes et leurs archivages.

- difficultés pour l'implémentation d'une fonction métrologie, la métrologie est une discipline nouvelle dans le champ des compétences du biologiste, elle s'est installée et devient indispensable pour assurer la qualité des résultats d'analyse, celle-ci est mise en œuvre de la phase pré-analytique à la phase post-analytique et ne couvre pas seulement l'activité analytique, malheureusement nous avons constaté plusieurs contraintes liées à la fonction métrologie au niveau du laboratoire ou quatre-vingt-dix pour cent de notre équipement est critique, ce qui demande un suivi régulier de la maintenance et la nécessité d'avoir un parc d'appareils de secours pour pallier à toute défaillance.

- difficultés pour la maintenance des DMDIV : l'équipement doit être conforme aux exigences des performances spécifiées par le fabricant initialement et de manière continue et être en bon état de fonctionnement, afin de garantir la qualité des analyses et des services rendus, ainsi que la sécurité du personnel qui l'utilise, en pratique, c'est le responsable métrologie qui doit assurer la traçabilité de l'enregistrement des étalonnages ou vérifications ainsi que le statut de l'instrument de mesure identifié.

Le suivi des maintenances est assuré par le service biomédical, on distingue la maintenance préventive réalisée selon un planning avant la détection d'une panne et la maintenance corrective après la survenue d'une panne ou une défaillance [114], le laboratoire d'AMP bénéficie de contrats de maintenance pour ces équipements mais qui n'incluent pas le contrôle qualité et la qualification du matériel. C'est le service biomédical qui intervient sur les contrôles dont il a la compétence ou fait appel à une société de tierce maintenance dont la compétence est reconnue.

La validation des méthodes d'AMP, une des préoccupations analytiques des biologistes dans un centre AMP ne peut être réalisé indépendamment du développement de l'assurance qualité au laboratoire, afin de prouver la maîtrise de l'ensemble des processus intervenant dans la fiabilité des résultats, l'engagement dans ces procédures volontaires et complémentaires contribue à la maîtrise du processus analytique et le fonctionnement global du laboratoire, la finalité est la satisfaction de l'ensemble de nos clients.



***Conclusion***

Passage obligé et point dur de toute démarche d'accréditation, la validation des méthodes est pourtant un acte scientifique fondateur durant lequel le laboratoire détermine ses objectifs analytiques en fonction du niveau de qualité qu'il se fixe et lui permet aussi de cerner ses défaillances en vue d'une amélioration en continu.

Notre travail s'est articulé autour de la validation de deux méthodes d'AMP selon la méthode COFRAC dans son interprétation de la norme ISO 15189:2012 spécifique aux laboratoires de biologie médicale, les exigences techniques inscrites dans le chapitre 5 de la norme sont spécifiques « métier » dont le but est la satisfaction de la maîtrise des risques des méthodes d'analyses depuis la maîtrise des prélèvements à travers deux enregistrements normatifs à savoir la feuille de prescription et le manuel de prélèvement jusqu'aux conseils sur les résultats.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la méthode qualitative d'identification morphologique de l'ovocyte, zygote et embryon dont la validation est basée essentiellement sur la vérification bibliographique, l'estimation des incertitudes de mesure à travers une analyse des risques (personnel, conditions environnementales, échantillons primaires, équipements, milieux de culture et consommables) ainsi que le suivi des indicateurs de performance.

Étant une technique manuelle, la qualité du résultat est largement dépendante de la compétence du personnel, la mise en place des contrôles internes de qualité permet de contribuer à la formation continue indispensable du personnel.

La deuxième méthode est la détermination de la concentration des spermatozoïdes qui est une méthode quantitative dont la validation expérimentale est prédominante à travers notamment les analyses des tendances (CIQ et fidélité intermédiaire), l'évaluation externe de la qualité (EEQ et justesse), puis l'approche des incertitudes de mesure et les analyses des risques.

Ce travail représente l'engagement du laboratoire dans la validation des autres méthodes d'AMP et dans sa démarche d'accréditation de façon globale, il subsiste néanmoins plusieurs difficultés à surmonter tels que l'organisation de la métrologie en rapport avec les grandeurs mesurables critiques impactant les méthodes d'AMP, ce qui constitue un support indispensable à l'accréditation ainsi que l'absence d'évaluations externes de la qualité en spermologie et en embryologie.

Même en l'absence d'obligations réglementaires au Maroc en matière d'accréditations des laboratoires d'analyses médicales, la validation des techniques est une garantie des résultats fiables. En biologie de reproduction, la particularité réside dans la nature des techniques qui sont pour la plupart manuelles, la nature de la matrice et dans le manque d'outils de contrôle de la qualité, d'où l'intérêt de la maîtrise des critères de risque qui prene une place incontournable.

***Références  
bibliographiques***

- 1- NF EN ISO / IEC 17025:2017 : 2017. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais et calibrations. Genève : Organisation internationale de normalisation, 2017.
- 2- NF EN ISO 15189:2012. Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence ». Afnor, 2012, [www.afnor.org](http://www.afnor.org)
- 3- Hidri N, Essemilaire L. Guérin et al. L'accréditation au laboratoire de bactériologie. Bactériologie médicale. January 1, 2016. Pages 85-103.
- 4- International Conference on Harmonization (ICH) Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005) <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>
- 5- COFRAC, SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 01, mars 2012 <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 6- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, et les membres de la commission « validation de techniques » de la SFBC. Protocole de validation de techniques (Documents A et B). Ann Biol Clin 1986 ; 46 : 679-745
- 7- Scherrer F, Boisson RC, Eynard JC, Chamard D, Poggi B, Grafmeyer D. État de l'art et validation de techniques : application aux performances de fidélité. Ann Biol Clin 2008 ; 66 (6).
- 8- Pfeffer J, Patrat C, Taar JP, Clement P, Zerah S. L'accréditation selon la norme ISO/EN 15189: une obligation pour les laboratoires d'assistance médicale à la procréation. Quelques points principaux pour le clinicien. Gynecol Obstet Fertil 2012 ; 40 : 124-8.
- 9- Barberet J, Boucret L, Fauque P, May-Panloup P. Assistance médicale à la procréation: techniques actuelles et nouveaux horizons. Revue francophone des laboratoires • n ° 504 • juillet -août 2018.
- 10- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum Reprod. 2001;16(12):2652-7.

- 11- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline. *Fertil Steril*. 2016;106(7):1634-47.
- 12- Merlet. F, Bergère. M, Van Den Heuvel. T. Cadre juridique de l'assistance médicale à la procréation en France, à l'aube du processus de révision de la loi de bioéthique. *Revue francophone des laboratoires* • n° 504 • juillet-août 2018
- 13- Projet de loi n°47-14 relative à l'assistance médicale à la procréation. Maroc. [www.sante.gov.ma](http://www.sante.gov.ma)
- 14- CLSI/NCCLS. A quality management system model for health care; approved guideline—2nded. HS1-A2. Wayne, PA, NCCLS, 2004.
- 15- OMS. Système de gestion de la qualité au laboratoire. Genève. Organisation mondiale de la Santé 2013. ISBN : 97892 425 482 73. [www.who.int](http://www.who.int). Date de consultation : 05/2018
- 16- GBEA. Arrêté du ministère de la santé N° 2598-10 du 07 septembre 2010 relatif au guide des bonnes exécutions des analyses de biologie médicale (GBEA). Maroc: GBEA, 2010.
- 17- Cheminel V, Prevosto J-M, Renard C, Allio I, Pelnier I, Diffonty A, Chaulet J.-F. Guide de bonne exécution des analyses: Expérience de mise en place dans un laboratoire hospitalier. *Revue Française des Laboratoires*. Volume 1997, Issue 297, November 1997, Pages 19-24
- 18- Libeer J.C. L'état actuel des systèmes de qualité en Europe pour des laboratoires de biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 55, numéro 3, Mai - Juin 1997
- 19- Lannoy A. Les indicateurs qualité. *Option/Bio*, Volume 20, Issue 425, October 2009, Pages 22-23
- 20- Olofsson JI, Banker MR, Sjoblom LP. Quality management systems for your in vitro fertilization clinic's laboratory: why bother? *JHumReprod Sci* 2013 ; 6 : 3-8.

- 21- Sicallac P. Accréditation, certification et GBEA. Annales de Biologie Clinique. Volume 55, numéro 3, Mai - Juin 1997
- 22- Norme NF EN ISO 9001 : 2015. Systèmes de management de la qualité, exigences. Paris: Afnor; 2015.
- 23- Norme NF EN ISO 9000:2015. Quality management system. Fundamentals and vocabulary. Systèmes de management de la qualité. Principes essentiels et vocabulaire. Genève, ISO, 2015
- 24- Pierre D. L'accréditation COFRAC des laboratoires de biologie médicale dans le cadre de la loi HPST. Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2010, Issue 419, February 2010, Pages 27-28
- 25- Trapadoux F, Guitton Bliem C, Hergon E, Roubinet F. Accréditation des laboratoires de biologie médicale au sein de l'Établissement français du sang. Transfusion Clinique et Biologique, Volume 18, Issue 2, April 2011, Pages 246-249
- 26- ISO 19011:2002. Lignes directrices pour l'audit des systèmes de management de la qualité et/ou de management environnemental Genève, Organisation internationale de normalisation, 2002.
- 27- Ministère de l'industrie, du commerce, de l'investissement et de l'économie numérique. Www.mcinet.gov.ma Date de consultation: 07/2017
- 28- EA-4/21 Guidelines for the assessment of the appropriateness of small inter laboratory comparison within the process of laboratory accreditation. www.european-accreditation.org. Date de consultation : 04/2018
- 29- ILAC B1:10/2015. Why Use an Accredited Laboratory? Www. Ilac.org. Date de consultation: 07/2017
- 30- IAF ID1:2014 - IAF Informative Document for QMS and EMS Scopes of Accreditation. www. iaf.nu. Date de consultation : 07/2017
- 31- Burnett D, Blair C. Standards for the medical laboratory – harmonization and subsidiarity. Clinica Chimica Acta. 2001; 309: 137 – 145.

- 32- CLIA related Federal Register and Code of Federal Regulation Announcements, and the FDA's Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA). Accessed Nov. 14, 2015. [www.fda.com](http://www.fda.com). Date de consultation : 09/2017
- 33- Izquierdo Álvarez S, Francisco B, Andreu A. Procedures for validation of diagnostic methods in clinical laboratory accredited by ISO 15189. Rijeka: INTECH Open Access Publisher, 2011. <http://www.intechopen.com>. Date de consultation : 07/2017
- 34- Batel A. Contrôle Qualité et Validation. Spectra Analyse n° 252 • Novembre 2006
- 35- Müller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. Clin Chem. 2000 ; 46 : 1907 – 1909.
- 36- Zérah S. Harmonisation de l'assurance qualité et des critères d'accréditation en Europe. Annales de Biologie Clinique. Volume 55, numéro 3, Mai - Juin 1997
- 37- Izquierdo Álvarez S and Bernabeu Andreu F. Procedures for Validation of Diagnostic Methods in Clinical Laboratory Accredited by ISO 15189. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com). Date de consultation : 05/2018
- 38- De Graeve J.S. Assurance qualité, certification, accréditation, évolution vers une harmonisation en Europe. Annales de Biologie Clinique. Volume 55, numéro 3, Mai - Juin 1997
- 39- ISO /IEC/ GUIDE 2/2004. Normalisation et activités connexes. Vocabulaire général. Genève, Organisation internationale de normalisation, 2004
- 40- Garbar C. Comment développer les indicateurs qualités en cytologie ? Annales de Pathologie, Volume 31, Issue 5, Supplement, November 2011, Pages 32-36
- 41- Pascal P, Beyerle F. Les référentiels qualité applicables dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale. Pathologie Biologie, Volume 54, Issue 6, July 2006, Pages 317-324
- 42- Naudin C. Accréditation des laboratoires de biologie médicale Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2009, Issue 412, May 2009, Pages 23-25



- 43- COFRAC, SH REF 02. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. Révision 04, octobre 2013 <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 44- COFRAC, SH GTA 05 révision 00. Guide technique d'accréditation en biologie de la reproduction. <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 45- Mandelbaum J. L'assistance médicale à la procréation, un des traitements de l'infertilité. adsp n° 75 juin 2011.
- 46- COFRAC, SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 00 - Avril 2015. Date de consultation : 07/2017
- 47- Le lievre C. Validation de méthodes qualitatives en continu. IXE journées professionnelles de l'AFTLM. [www.antab.com](http://www.antab.com). Date de consultation : 05/2018
- 48- Astier-Théfenne H, Wolf A, Darles C, Garnotel E. Vérification d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram. Rev Fr Lab 2014 ; 461 : 37-46
- 49- COFRAC, SH GTA 06. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00, juin 2012 <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 50- COFRAC, LAB GTA 14. Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale. COFRAC, 2006. Date de consultation : 07/2017
- 51- Klein J-P, Gorsy T. L'accréditation en hématocytologie: de la théorie à la pratique. Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2012, Issue 441, April 2012, Pages 75-89
- 52- Directive 98/79 of the European Parliament and of the council of 27 October on in vitro diagnostic Medical devices. Official Journal of the European Communities 1998 (Dec 7) ; L 331 : 1-37.7.

- 53- Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 (Hors-série no 1) : 247-294
- 54- De Graeve J. Guide de validation des méthodes en biologie médicale dans le cadre de l'accréditation COFRAC Symposiums/Transfusion clinique et biologique 12 (2005) S1-\$43
- 55- Leguy R. L'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale par le COFRAC : démarche, processus et enjeux. Symposiums/Transfusion clinique et biologique 12 (2005) S1-\$43
- 56- COFRAC, SH INF 50. Portées-types d'accréditation. Révision 01, janvier 2014 <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 57- Giroud C. Introduction à la pratique du Contrôle de Qualité au LABM. Vanves: Éditions FM Bio, 2007, 304 pages
- 58- Hauck WW, Kock W, Abernethy D & Williams R.L. Making sense of trueness, precision, accuracy and uncertainty. *Pharmacoepial Forum*. 2008 No.34, pp.838-842.
- 59- Menditto A, Patriarca M & Magnusson B. Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accred Qual Assur*. No. 12,2007. pp.45-47
- 60- Vocabulaire international de métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés - VIM. 3e édition. JCGM 200 :2008.[www.bipm.Org/fr/publications/guides/vim.html](http://www.bipm.Org/fr/publications/guides/vim.html). Date de consultation : 05/2018
- 61- Vassault A, Dumont G, Labbé D. Définitions des critères de qualité d'une méthode d'analyse. *Le Moniteur Internat* 1992 ; 26, 20-3312
- 62- ISO/CEI GUIDE 99 : 2007 – Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux des termes associés (VIM). International Organisation for Standardisation (ISO), 2007

- 63- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 29 p.
- 64- Audigié C, Dupont G, Zonszain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. Wolters Kluwer France; 188 p.1992
- 65- Giroud C, Arnaud J, Adjidé V, Vassault A et les membres du sous-groupe 2 analytique. Contrôle interne de qualité. Ann Biol Clin 2010 ; 68 (Hors-série no 1) : 203-222
- 66- Giroud C, Dumontet M, Vassault A, Braconnier F, Férard G. ; groupe de travail Assurance qualité métrologie de la SFBC. Recommandations relatives à l'expression de l'incertitude de mesure des résultats quantitatifs en biologie médicale (Document F). Ann Biol Clin 2007; 65 (2): 185-200
- 67- I.C.H. (1997). Q2b: Validation of analytical procedures. US FDA Federal Register. 62 (96), 27463-7
- 68- Armand S. Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière. Thèse 2014-2015. MÉMOIRE de Diplôme d'Études Spécialisées. Pharmacie Industrielle et Biomédicale. Université Angers
- 69- Ducauze C, Baillet-Guffroy A et Thanh X Bui. Choix et validation d'une méthode d'analyse, p.1 ,6 (www.agroparistech.fr).
- 70- Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research 1999; 8: 135-60.
- 71- Groupe de travail "Accréditation" de la Société Française de Toxicologie Analytique. Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. Annales de Toxicologie Analytique, vol. XVII, n° 3, supplément 1, 2005

- 72- OIV-MA-AS1-12 : R2005. 1. Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative. [www.oiv.int/public/medias/2754/oiv-ma-as1-12fr.pdf](http://www.oiv.int/public/medias/2754/oiv-ma-as1-12fr.pdf). Date de consultation : 07/2017
- 73- Klein JP, Gorsy T. Vérification des performances d'une méthode : l'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la technique des E-test®. *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2014, Issue 461, April 2014, Pages 47-58
- 74- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009; 24: 2683-7
- 75- Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995 ; 10 : 2427-31
- 76- Le Vacon F, Trapadoux F, Ferney L, Ferrera V, Asso Bonnet M, Hergon E. La validation de méthode : une étape incontournable au laboratoire. *Transfus Clin Biol* 2013 ; 20 : 295-336.
- 77- Le Vacon F. Le contrôle de qualité en sérologie ou comment garantir la qualité d'un résultat d'analyse semi-quantitative ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, Volume 22, Issue 6, December 2007, Pages 391-397
- 78- Thompson M, Wood R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure and Appl Chem* 1995 ; 67, 4 : 649-66
- 79- Marquis P. Le contrôle de qualité interne au laboratoire : progrès et perspectives. *Journées internationales de Biologie*, Paris, novembre 2002.
- 80- Cooper TG, Neuwinger J, Bahrs S, et al. Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril*. 1992 Jul; 58(1):172-8.

- 81- Washetine K, Hofman V, Lassalle S, Long E et al. L'accréditation des laboratoires d'ACP : pourquoi est-ce incontournable ? *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2017, Issue 488, January 2017, Pages 31-37.
- 82- World Health Organization (WHO). *Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen* 5th edition. Cambridge University Press, UK, 2010.
- 83- Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, et al. Semen Analysis and External Quality Control Schemes for Semen Analysis Need Global Standardization. *Int J Androl*. 2002 Oct; 25(5):306-11
- 84- Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External Quality Control in the Andrology Laboratory: An Experimental Multicenter Trial. *Fertil Steril*.1990 Aug;54(2):308-14
- 85- COFRAC, SH FORM 44. Fiche type qualitatif, vérification (portée A)/validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 00, avril 2011 <http://www.COFRAC.fr>. Date de consultation : 07/2017
- 86- Guérin JF. Les techniques biologiques en fécondation in vitro. *Med Ther Endocrinol* 2003; 5.
- 87- Weissman D, Howles A, Shoham C, Gardner ZD, Lane M. Culture systems for the human embryo. In: Gardner, ed. *Textbook of assisted reproductive techniques*. London: Informa Healthcare, 2006 (p.241-54)
- 88- Biggers JD. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod BioMed Online* 2001; 4: 30-8
- 89- Brinster RL. In vitro cultivation of mammalian ova. *Adv Biosci*1969 ; 4 : 199-233.
- 90- Boyer P, Boyer M. Évaluation non invasive de l'embryon : morphologie embryonnaire préimplantatoire. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37: 908-16.
- 91- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 669-81

- 92- Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-13.
- 93- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 1318-23
- 94- Norme NM ISO15189: Guide d'interprétation ISO\_15189:2012-AA210 : Exigences d'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale selon la norme NM ISO15189:2012. Maroc, Ministère de l'industrie, du commerce et des nouvelles technologies. <http://www.mcinet.gov.ma>. Date de consultation : 07/2017
- 95- Leblanc RM. Documentation externe et validation des méthodes. *Option/Bio*, Volume 24, Issue 493, June 2013, Pages 22-24
- 96- Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod BioMed Online* 2015; 31: 459-71
- 97- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature ? *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 20, Issue 4, April 2010, Pages 453-469
- 98- Gougeon A. Aspects biologiques du risque d'infertilité lié à l'âge: le côté féminin. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005; 53:2S37–2S45.
- 99- ESHRE. Capri workshop Group. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005; 11:261–76.
- 100- Grzegorzcyk V, Perdrix A, Clavier B, Mousset-Siméon N, Marpeau L. Fécondation in vitro mixte après échecs d'inséminations intra-utérines intra-conjugales. Etude de cohorte au CHU de Rouen. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, Volume 39, Issue 4, April 2011, Pages 211-215
- 101- Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007 ; 22: 230-40

- 102- Aguilar J, Motato Y, Escriba MJ, Ojeda M, Munoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014 ; 28 : 475-84
- 103- Cabry-Goubet R, Lourdel E, Brasseur F, Sanguinet P, Demailly P, Devaux A, et al. Évaluation des pratiques professionnelles dans un centre d'assistance médicale à la procréation : comment améliorer la qualité des soins ? *Gynecol Obstet Fertil* 2010 ; 38 : 581-7.
- 104- Lamarchea C, Lévyb R, Fellonia B, de Mouzon J, Denis-Belicarda E, Hussa M, et al. Prise en charge en assistance médicale à la procréation des femmes de 38 ans et plus : résultats d'une enquête à propos de 84 couples. *Gynecol Obstet Fertil* 2007 ; 35 : 420-9
- 105- Bonnabry P. HUG. Analyse prospective des risques : application de la méthode AMDEC ; site internet: [https://pharmacie.hug-ge.ch/ens/conferences/pb\\_analyse\\_risque\\_FHV12.pdf](https://pharmacie.hug-ge.ch/ens/conferences/pb_analyse_risque_FHV12.pdf). Date de consultation : 05/2018
- 106- Barbier F, Berkane Z, Dehorne JP, et al. Recommandations pour la maîtrise de l'étape de prélèvement des échantillons biologiques. *Ann Biol Clin* 2010;68(hors-série n° 1):69-104.
- 107- Naudin C. Synthèse sur les fiches d'écart: (chapitre 5 GR 15189) *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2012, Issue 447, Décembre 2012, Pages 8-13
- 108- Clavert A, Bourguignat A, Cranz C. Importance de l'étape pré-analytique en spermologie, pour le diagnostic et l'évaluation des thérapeutiques. *Andrologie* 2000, 10, 4, 353-357.
- 109- Ministère de la santé. Arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation. *Journal Officiel* numéro 211 du 11 septembre 2010. France
- 110- Ovaguimian O, Danilo A, Broix S. Accréditation ISO 15189 et architecture des laboratoires de biologie médicale. *Option/Bio*, Volume 23, Issue 468, March 2012, Pages 23-26

- 111- Lannoy A. Enregistrements qualité et enregistrements techniques. Option/Bio, Volume 21, Issue 431, February 2010, Pages 21-23
- 112- Lannoy A. Intégration d'un nouvel automate au laboratoire. Option Bio. 2010 ; 444 : 20-21
- 113- Szymanowicz A, Neyron M-J, Champagnon N, Prefol M, Massacrier G. Opposition de tableaux d'indicateurs utiles à la bonne marche d'un service de biochimie hospitalier. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 23, Issue 3, June 2008, Pages 159-178
- 114- Farges G. Guide des bonnes pratiques de l'ingénierie biomédicale en établissement de santé. Paris : Édition Lexitis, 2011 et OMS. Manuel d'entretien et de maintenance des appareils de laboratoire. – 2e éd. [www.who.int/diagnostics\\_laboratory](http://www.who.int/diagnostics_laboratory). Date de consultation: 05/2018
- 115- Zwingelstein G. Évaluation de la criticité des équipements. Méthodes d'exploitation des jugements d'experts. <https://www.techniquesingenieur.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/methodesd-analyse-des-risques-42155210/evaluation-de-la-criticite-des-equipements-se4004>. Date de consultation: 04/2018
- 116- Lhomme J, Humbert J, Farges G. Nouvelle méthode pour l'analyse de la criticité des DM en exploitation. IRBM News 2013 ; 34 : 150-4
- 117- Collège français de métrologie. Guide de métrologie à l'usage des laboratoires de biologie médicale. Paris : Collège français de métrologie, 2003. [www.cfmetrologie.com](http://www.cfmetrologie.com). Date de consultation: 05/2018
- 118- Charbonnier E. Démarche qualité et accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale. Déploiement de la fonction « métrologie ». Cas du Pôle de Biologie-Pathologie-Génétique du CHRU de Lille. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie.2012. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille.
- 119- Le Vacon F. Qualification des matériels. Transfusion Clinique et Biologique 12 (2005) 200–204



- 120- Moudakkir Said. Contribution à la mise en place d'une "" fonction métrologie "" dans un laboratoire pharmaceutique. Thèse de doctorat. Pharmacie P512005. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. Maroc.
- 121- Brari Saadia. Métrologie et appareillages de contrôle dans l'industrie pharmaceutique. Thèse de doctorat. Pharmacie P0171999. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. Maroc
- 122- Daunizeau A et les membres du sous-groupe « Processus supports. Recommandations sur la métrologie et la maîtrise de la qualité des équipements critiques. Ann Biol Clin 2013 ; 71 (Hors-série no 1) : 235-256
- 123- La norme X 07-011 : Métrologie – Essais – Métrologie dans l'entreprise – Constat de vérification des moyens de mesures. Saint-Denis: AFNOR, 1994
- 124- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril 1985 ; 44 : 493-8.
- 125- Ponte C. Assistance médicale à la procréation, de nouvelles règles de bonnes pratiques. Option Bio 2008 ; 19 : 12-3.
- 126- Vendittelli. F, Tessier V, Crenn-Hébert. C, Lejeun. C. Introduction à l'évaluation des pratiques professionnelles. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction, Volume 37, Issue 2, April 2008, Pages 127-134
- 127- Martin BS et al. Measurement, Standards, and Peer Benchmarking: One Hospital's Journey. Pediatric Clinics, Volume 63, Issue 2, 239 – 249
- 128- Pouly L, Brugnion F, Grémeau AS, Janny L, Boyer C. Interprétation et finalité des résultats en assistance médicale à la procréation. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, Volume 38, Issue 9, September 2010, Pages 521-527
- 129- Larue L. Démarche qualité en médecine de la reproduction : témoignage et perspectives. Gynecol Obstet Fertil 2005;33:369–70

- 130- Aupetit N, Vacher K. Les laboratoires, qualifications du matériel et implication des ingénieurs biomédicaux. In: Rôle de l'ingénieur biomédical au laboratoire Paris, France. 1999 84p
- 131- NF EN ISO 10012, Systèmes de management de la mesure – Exigences pour les processus et les équipements de mesure. AFNOR Septembre 2003. ICS : 03.120.20, 17.020.
- 132- Lemarquis V, Serthelon L. Gestion de la métrologie des températures dans un laboratoire de PMA (procréation médicalement assistée). 17 International Congress of Metrology, 2015. <http://cfmetrologie.edpsciences.org>
- 133- Naudin C. À propos d'une métrologie « raisonnable ». Rev Fr Lab2012; 2012: 12-3.
- 134- Farges G. Aide au management de la mesure et à la confirmation métrologique: outil d'autodiagnostic sur l'ISO 10012. Article in IRBM News 35(1) · February 2014
- 135- NF X 15-140 : Mesure de l'humidité de l'air – Enceintes climatiques et thermostatiques – Caractérisation et vérification. Saint-Denis : AFNOR, 2002.
- 136- COFRAC. LAB GTA 24 : Guide technique d'accréditation pour la caractérisation et la vérification des enceintes thermostatiques et climatiques, des fours et des bains thermostatés. 2009. <http://www.COFRAC.fr>
- 137- Lorec-Pénet AM, Saunier V, Lombard E, Arfi C, Portugal H. Du GBEA à l'accréditation dans un laboratoire de biochimie de CHU : application à une structure multi-sites. Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2010, Issue 419, February 2010, Pages 33-44
- 138- Duchassaing D, Ghnassia JC. Apport de l'informatique au concept de traçabilité. Revue Francophone des Laboratoires1995; 275: 234-7
- 139- COFRAC, SH GTA 01. Guide technique d'accréditation en biologie médicale. Révision 00 (mai 2011). <http://www.COFRAC.fr>

- 140- Bourgaulta T, Vinnerb E, Darchisc JP, Arfid C, Boutrye M. Problématique de la mise en place d'une unité de métrologie dans le futur centre de biologie du CHRU de Lille. ITBM-RBM 2006 ; 27 : 257-61
- 141- Reifenberga JM, Riout E, Leroy A. Métrologie dans un laboratoire de biologie médicale : enjeux et difficulté. Rev Fr Lab 2014; 2014: 69-76.
- 142- Lee Higdon H, Dawn III H, Blackhurst W, William RB. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. Fertil Steril 2008; 89: 324-33.
- 143- Phillips KP, Leveille MC, Claman P, Baltz JM. Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. Hum Reprod 2000; 15: 896-904.
- 144- Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. Fertil Steril 2004; 81: 27-9
- 145- Swain JE. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. Reprod BioMed Online 2010; 21: 6-16.
- 146- Cassuto G, Chavrier M, Menezo Y. Culture conditions and not prolonged culture time are responsible for monozygotic twinning in human in vitro fertilization. Fertil Steril 2003 ; 80 : 462-3.
- 147- Colas S, Cablan S. Mise en place d'un système de traçabilité des températures dans les laboratoires du CHU de Bicêtre ITBM-RBM 24 (2003) 48-56.
- 148- Vermilyea M, Anthony J, Graham J, Tucker M. Clinical outcomes from an uninterrupted culture medium protocol. London: Alpha conference, 2011.
- 149- Schulmeister L. Patient misidentification in oncology care. Clinical Journal of Oncology Nursing; 2008. 12(3): 495 -498. Disponible en ligne: <http://ons.metapress.com/content/250342740u71p6g5/fulltext.pdf>
- 150- Schlossera I, Nakibb C, Carré-Pigeonb F, Staermana F. Infertilité masculine: bilan Assessment of male infertility. Ann Urol 2006 ; 40 : 349-54.

- 151- Belhadrie-Mansouri N, Celton N, Devaux A, et al. Lecture du spermogramme, du spermocytogramme et techniques d'analyses du génome du spermatozoïde chapitre 9 p65 Infertilité © 2016, Elsevier Masson SAS
- 152- Lammers C. Splingart A. Reignier A et al. Quelle place pour le spermogramme automatisé en 2016 ? Journal de Biologie Médicale / Vol 5-Numéro 17 / Avr-Juin 2016
- 153- Brazil C, Swan SH, Tollner CR et al. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. J Androl. 2004 Jul-Aug; 25(4):645-56
- 154- COFRAC, SH FORM 43. Fiche type quantitatif. Vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode en biologie médicale. Révision 00 - Avril 2011
- 155- Bjorndahl. L and Barratt C. Semen Analysis: Setting Standards for the Measurement of Sperm Numbers. Journal of Andrology, Vol. 26, No. 1, January/February2005
- 156- Feinberg M. Principes et vocabulaire in validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, 13-25
- 157- Ricos C, Alvarez V, Cava F et al. «Current databases on biologic variation : pros, cons and progress.» Scand J Clin Lab Invest 1999; 59:491-500. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
- 158- Cahier de formation biologie médicale n°42. Exploration de la fonction de reproduction, versant masculin. Bioforma, 2009
- 159- Ordre professionnel des technologistes médicaux guide sur l'examen et la préparation de sperme du Québec Canada 2016. [ww.optmq.org](http://www.optmq.org). Date de consultation: 05/2018
- 160- Riou B, Pinaud M. Expression numérique des résultats. Ann Fr Anesth Réanim 1996; 15: 49-56

- 161- La norme ISO 5725-1:1994 (fr). Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1: Principes généraux et définitions. [www.iso.org](http://www.iso.org). Date de consultation: 05/2018
- 162- Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique. *Revue des Maladies Respiratoires* Vol 21, N° 1 - février 2004 pp. 127-130
- 163- Vassault A, Baud M, Castagnier M, et al. (Commission « validation de techniques » de la SFBC et groupe de travail SFBC/Corata « comparaison de techniques »). Recommandations pour la comparaison de techniques (Document F). *Ann Biol Clin* 1992 ; 50 : 727-30.
- 164- Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of assisted reproductive technologies: laboratory and clinical perspectives* London: Informa healthcare, 2004. <https://books.google.com/books.isbn=0203092937>. Date de consultation: 02/2016
- 165- Mallet G, Dugay A, Leroy M, Gray C, Brunelle P. Démarche d'accréditation COFRAC dans un laboratoire hospitalier polyvalent. Mise en place et gestion au quotidien. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, Volume 20, Issue 4, August 2005, Pages 239-244
- 166- Cruz M, Garrido N, Gadea B, Munoz M, Perez-Cano I, Meseguer M. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reprod Biomed Online* 2013; 27: 367-75
- 167- Klee GG. Tolerance limits for short-term analytical bias and imprecision derived from clinical assay specificity. *Clin Chem* 1993;39(7): 1514-8
- 168- Daoud S, Chakroun-Feki N, Sellami A et al. Variabilité inter et intra-opérateur de l'analyse des paramètres spermatiques : résultat d'un programme de contrôle de qualité. *The Pan African Medical Journal*. 2016; 25:115
- 169- Rapport de nordtest TR 569. Contrôle interne de la qualité. Manuel pour les laboratoires d'analyses chimiques. [www.nordtest.info](http://www.nordtest.info). Date de consultation: 05/2018

- 170- Guénet D, Moineau M-P, Morin J-F, et al. Exploitation des contrôles de qualité : Les cartes de Levey-Jennings sont-elles suffisantes en pratique quotidienne ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, Volume 21, Issue 3, June 2006, Pages 172-180
- 171- Lagabrielle J-F, Tachet A, Boin V. Dosage de la procalcitonine : comparaison des résultats obtenus sur Kryptor® (Brahms) et Vidas® (BioMérieux). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. Volume 23, Issue 4, August 2008, Pages 245-250
- 172- Puy V. Mise en place de la démarche qualité selon la norme NF EN ISO 15189 en spermologie diagnostique dans le service de médecine et biologie de la reproduction du CHU d'Amiens. *Biologie de la reproduction*. 2017. <Dumas-01522752>
- 173- Szymanowicz A. Interprétation optimisée et utilisation pertinente de l'évaluation externe de la qualité (EEQ). *Feuil Biol* 2010; LI (294): 63-72
- 174- Triquet P. Conservation par le froid des échantillons biologiques, [mémoire IBMH 1994]. Compiègne: UTC; 1995].
- 175- Arnaud J, Adjidé V, Vassault A et les membres du sous-groupe 2 analytique. Groupe de travail SFBC « Accréditation des laboratoires de biologie médicale » (coordonnateur M. Vaubourdolle). Comparaisons inter-laboratoires/ évaluation externe de la qualité. *Qualité et accréditation en biologie médicale. Ann Biol Clin* 2010; 68 (Hors série no 1): 227-236.
- 176- Kubiak C, Tiry C. Identitovigilance et acte transfusionnel. *Transfusion Clinique et Biologique*. Volume 23, Issue 4, November 2016, Page 297
- 177- Groupe de travail Identito-vigilance. Guide pour l'implémentation d'une politique d'identito-vigilance en milieu hospitalier dans le cadre du programme pluriannuel 2013-2017, Bruxelles, SPF Santé Publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement, 2017.



***Annexe***

**Annexe 1**

**Le manuel de prélèvement du laboratoire AMP**

**Rédacteur : Dr Aboulmakarim Siham**

**Sommaire**

I. Préambule .....	178
II. Présentation du laboratoire d'AMP .....	178
III. Prélèvement de sperme en vue d'une prise en charge thérapeutique en AMP .....	178
III.1. Intérêt .....	178
III.2. Documentation interne .....	179
III.3. Consommables .....	179
III.4. Instructions pour le prélèvement.....	179
III.4.1. Identification du patient .....	179
III.4.2. Préparation du patient .....	179
III.4.3. Mode opératoire du prélèvement.....	180
III.4.4. Identification de l'échantillon.....	180
III.4.5. Conditions de transport .....	180
III.4.6. Identification des intervenants.....	181
III.4.7. Réception de l'échantillon au laboratoire .....	181
III.4.8. Critères de conformité des échantillons .....	181
IV. Prélèvement ovocytaire en vue d'une FIV .....	182
IV.1.Intérêt .....	182
IV.2. Documentation interne .....	182
IV.3. Consommables et milieux de culture du laboratoire.....	182
IV.4. Instructions pour le prélèvement.....	182



IV.5. Conditions de transport .....	183
IV. 6. Identification des intervenants.....	183
IV. 7. Réception de l'échantillon au laboratoire.....	183
IV. 8. Critères de conformité des échantillons .....	183
V. Les facteurs de variation pré-analytique du spermogramme et du prélèvement ovocytaire.....	184
VI. La politique d'identito-vigilance au niveau du laboratoire AMP .....	185
VI.1. Les règles d'identification secondaire.....	186
VI.2. Les outils d'identification.....	186
VI.3. Les indicateurs portant sur les non-conformités de l'identification.....	187

## **I. Préambule**

L'objectif de ce manuel de prélèvement est d'expliquer le plus simplement possible les différentes informations nécessaires à la phase pré-analytique concernant les techniques biologiques de l'assistance médicale à la procréation AMP (information/préparation du patient, réalisation des prélèvements, identification des échantillons, conservation des échantillons avant analyse (température et délai de conservation avant analyse), documents à joindre obligatoirement (prescription, renseignements cliniques).

Les patients sont des couples présentant une infertilité et remplissant les conditions nécessaires pour l'accès aux traitements biologiques d'AMP à savoir l'insémination intra-utérine et la fécondation in vitro classique.

Ce manuel s'applique aux deux prélèvements réalisés au niveau du centre d'AMP: le prélèvement de sperme réalisé au niveau du laboratoire et le prélèvement ovocytaire réalisé au niveau du bloc opératoire.

## **II. Présentation du laboratoire d'AMP**

Le laboratoire fait partie d'un centre d'AMP créé en 2011, il est construit dans un local indépendant au niveau du centre de santé reproductrice du centre hospitalier Ibn Sina à Rabat.

Le centre assure les activités suivantes :

- Préparation du sperme en vue d'une insémination intra-utérine
- Préparation du sperme en vue d'une fécondation in vitro classique.
- Ponction ovocytaire
- Transfert d'embryons
- Fécondation in vitro classique
- Conservation des embryons par vitrification
- Stockage des embryons vitrifiés

## **III. Prélèvement de sperme en vue d'une prise en charge thérapeutique en AMP**

### **III.1. Intérêt**

Ce prélèvement est effectué de préférence au laboratoire, il permet l'étude de tous les paramètres du sperme.

### **III.2. Documentation interne**

Fiche de recueil de sperme

### **III.3. Consommables**

Flacons de prélèvement stériles fournis par le laboratoire.

Préservatifs sans spermicides

Lingettes désinfectantes

Savon

### **III.4. Instructions pour le prélèvement**

#### **III.4.1. Identification du patient**

- L'identification du patient est fondamentale, elle est réalisée à l'aide de sa carte nationale valide.

- Pour vérifier correctement l'identité d'un patient, demander lui de décliner son nom, prénom et sa date de naissance.

- La concordance entre la prescription médicale et le patient à prélever doit être obligatoirement vérifiée (nom de naissance, prénom, date de naissance et numéro de dossier).

- Cette vérification doit normalement être assurée à toutes les étapes de la prise en charge du patient et doit être tracée dans le dossier.

#### **III.4.2. Préparation du patient**

- Le couple doit se présenter au laboratoire à l'heure convenue munis de leurs cartes d'identité nationale.

- Une preuve de l'identité est demandée avant tout recueil à visée thérapeutique (IIU, FIV)

- Le recueil est réalisé au niveau d'un local mis à la disposition du patient au niveau du centre d'AMP.

- Identifier le prélèvement avec nom et prénom et signature du patient.

- Un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 4 jours est impératif : un délai plus court entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes sans en augmenter la vitalité et un délai plus long augmente le nombre des spermatozoïdes en diminuant la vitalité.

- Boire deux litres d'eau par jour les deux jours précédant le recueil et un litre d'eau le matin du recueil.

### **III.4.3. Mode opératoire du prélèvement**

- N'utiliser qu'un préservatif fourni au niveau du laboratoire si besoin
- N'utiliser qu'un récipient prévu pour l'examen de sperme fourni au niveau du laboratoire
- Uriner en vidant totalement la vessie.
- Se laver soigneusement les mains au savon.
- Faire une toilette avec la lingette désinfectante ou un coton imprégné de solution désinfectante.
- Recueillir par masturbation la totalité de l'éjaculat dans le flacon stérile mis à disposition.
- Remplir les informations de recueil et d'abstinence sur la feuille de demande d'examen
- Une fois le recueil effectué, le pot est remis à l'infirmière qui le transporte au niveau du laboratoire avec les cartes d'identités du couple et après avoir compléter les informations de la feuille de demande d'examen.

### **III.4.4. Identification de l'échantillon**

- L'étiquetage des échantillons doit se faire en présence du patient après une vérification de l'identité de celui-ci ; toute identification a posteriori doit être bannie pour limiter les erreurs d'identito-vigilance.
- Sur l'étiquette collée au récipient de collecte, notez le nom et le prénom du patient ainsi qu'un numéro d'identification propre au patient. Ces renseignements seront apposés par le patient lors de la collecte et par le personnel lors de la réception de l'échantillon.
- Remplissez correctement la fiche de recueil du sperme en précisant notamment la date et l'heure exacte du prélèvement.

### **III.4.5. Conditions de transport**

- Le transport de l'échantillon de sperme de la salle de prélèvement au laboratoire est assuré par le patient lui-même accompagné de l'infirmier, le plus rapidement possible.

### **III.4.6. Identification des intervenants**

- Les opérateurs au niveau du laboratoire ainsi que les infirmiers s'identifient sur la fiche de renseignements par leurs noms et signatures.

- un double contrôle est réalisé par deux opérateurs du laboratoire qui s'identifient simultanément sur les différents éléments d'enregistrement générés à toutes les étapes de l'activité du laboratoire.

### **III.4.7. Réception de l'échantillon au laboratoire**

A l'arrivée au laboratoire, les prélèvements de sperme suivent les étapes de vérification suivantes:

- vérification de l'identité du patient à l'aide de sa carte nationale
- identification de l'échantillon de sperme avec nom, prénom et signature du patient
- vérification de la concordance de l'échantillon avec la feuille de prescription transmise
- vérification du respect des conditions et délais de transmission
- vérification de la présence de la feuille de prescription dûment remplie

Les échantillons non conformes sont intégrés au processus de gestion des non conformités.

### **III.4.8. Critères de conformité des échantillons**

Le personnel autorisé doit évaluer les échantillons reçus afin de s'assurer qu'ils satisfont les critères d'acceptation pertinents en vue des examens prescrits.

**Les critères d'exclusion provisoire qui mènent au rejet d'un échantillon de sperme :**

- Echantillon réceptionné en absence du patient.
- Absence de la carte nationale du patient.
- Identification non conforme;
- Récipient non conforme;

**Les situations qui nécessitent l'ajout d'une note :**

- Echantillon qui n'a pas été conservé à la température corporelle;
- Période d'abstinence trop courte ou trop longue.
- Perte d'une partie de l'échantillon (durant l'éjaculation).

**IV. Prélèvement ovocytaire en vue d'une FIV****IV.1. Intérêt**

Le prélèvement ovocytaire fait partie des situations pré-analytiques où le clinicien est à l'origine de l'échantillon. Le recueil ovocytaire obtenu par ponction folliculaire est réalisé au niveau de la salle de prélèvement ovocytaire par un gynécologue habilité par voie endovaginale sous contrôle échographique.

**IV.2. Documentation interne**

La fiche de traçabilité : ponction d'ovocytes

Le dossier AMP couple.

La planification hebdomadaire des ponctions.

**IV.3. Consommables et milieux de culture du laboratoire**

- Flacons de recueil du liquide folliculaire fournis par le laboratoire.
- 10 ml du milieu d'aspiration maintenu à 37°C.

**IV.4. Instructions pour le prélèvement**

- Le laboratoire contrôle la conformité de l'ensemble du matériel et réactifs utilisés au niveau du bloc (tubes, kits de ponction, désinfectants, seringues, température des blocs chauffants) aux critères d'AMP.

- A J-1 de la ponction ovocytaire, le laboratoire prépare 10 ml du milieu d'aspiration ovocytaire qu'il incube à l'étuve à 37°C.

- Le jour de la ponction folliculaire, l'infirmier se rend au laboratoire où il récupère les tubes de prélèvements vides et le milieu d'aspiration qui le transporte dans une mallette de transport thermostatée à 37°C à la salle du prélèvement ovocytaire.

- A la fin de l'acte médical, les tubes du prélèvement ovocytaire dument étiquetés avec le nom, prénom et numéro de cycle de la patiente seront acheminés dans une mallette de transport à une température de 37°C accompagnés de la fiche de traçabilité ponction d'ovocytes.

#### **IV.5. Conditions de transport**

Le transport des tubes de prélèvement ovocytaire de la salle du prélèvement ovocytaire au laboratoire se fait dans une mallette de transport thermostatée, il est assuré par l'infirmier immédiatement après la fin de la ponction folliculaire.

#### **IV. 6. Identification des intervenants**

- Les opérateurs au niveau de la salle de prélèvement ovocytaire (gynécologue préleveur et infirmier) et du laboratoire s'identifient sur la fiche de traçabilité par leurs noms et signatures.

- Un double contrôle est réalisé par deux opérateurs du laboratoire qui s'identifient simultanément sur les différents éléments d'enregistrement générés à toutes les étapes de l'activité du laboratoire.

#### **IV. 7. Réception de l'échantillon au laboratoire**

A l'arrivée au laboratoire, les prélèvements suivent un double contrôle par deux opérateurs qui vérifient les éléments suivants :

- présence de la fiche de traçabilité dument remplie et horodatée mentionnant le nombre de follicules ponctionnés et le nombre de tubes prélevés.
- vérification du nombre de tubes reçus avec le nombre de tubes mentionné par le médecin sur la fiche de traçabilité ponction d'ovocytes.
- identification de l'ensemble des tubes de prélèvement où une étiquette de la patiente doit être opposée sur chaque tube prélevé, elle comporte nom, prénom et numéro de cycle de la patiente.
- respect des conditions et délais de transport

#### **IV. 8. Critères de conformité des échantillons**

Le prélèvement ovocytaire est un prélèvement précieux où il ne peut pas y avoir des prélèvements non-conformes, c'est-à-dire détruits et devant être renouvelés, il pourra bénéficier, sur décision du biologiste, d'une mesure dérogatoire (§ 5.4.5 de la norme ISO 15189).

Il arrive que les conditions de dérogation à un refus ne soient pas formalisées, justifiant alors la proposition d'une fiche d'écart, par exemple : un tube non étiqueté incrémenté dans la série d'une seule patiente ponctionnée.

Les échantillons non conformes sont intégrés au processus de gestion des non conformités.

#### **V. Les facteurs de variations pré-analytiques du spermogramme et du prélèvement ovocytaire :**

<b>Facteurs de variations pré-analytiques du spermogramme</b>		
<b>Sources potentielles de variation</b>	<b>Risque</b>	<b>Risques sur les résultats du spermogramme</b>
Délai d'abstinence	Si inférieur à 2 jours	Risque de perturbation de la numération et du volume (augmentation des 0.4 mL et de 87 millions de spermatozoïdes toutes les 24h
	Si >7 jours	Risque d'asthénospermie et de nécrospermie
Caractère incomplet du recueil	Perte de la fraction initiale de l'éjaculat riche en spermatozoïdes	Diminution de la concentration spermatique
Délai avant analyse	Supérieure à 1h	Risque d'asthénospermie et de nécrospermie
L'exposition aiguë du patient à la chaleur	Fièvre, insolation ou un sauna	Diminution de la mobilité des spermatozoïdes
<b>Facteurs de variations pré-analytiques du prélèvement ovocytaire</b>		
<b>Sources potentielles de variation</b>	<b>Risque</b>	<b>Risques sur les résultats du prélèvement ovocytaire.</b>
Non-respect des exigences de transport du fluide folliculaire au laboratoire	Température élevée ou basse	Mauvaise qualité ovocytaire
Température non conforme des blocs chauffants au niveau du bloc opératoire	Température élevée ou basse	Mauvaise qualité ovocytaire
Utilisation des produits toxiques (antiseptiques non autorisés, stérilisation par gaz des DMDIV au niveau du bloc opératoire)	Cytotoxicité	Mauvaise qualité ovocytaire



## **VI. La politique d'identito-vigilance au niveau du laboratoire AMP**

Identifier une personne consiste à disposer des informations nécessaires et suffisantes pour ne pas confondre cette personne avec une autre en l'identifiant de façon unique.

L'identito-vigilance se définit comme une politique de surveillance et de prévention des erreurs liées à l'identification des patients, elle consiste à mettre en place une politique à signaler les événements indésirables et analyser leurs causes afin de mettre en œuvre les actions d'amélioration nécessaires [176].

Le centre et le laboratoire d'AMP ont mis en place un système efficace pour assurer la traçabilité et l'identification des patients, des gamètes et des embryons à toutes les étapes de la prise en charge et éviter ainsi les erreurs d'identification, une erreur d'identification et d'attribution entre le couple, gamètes et embryons est dramatique pour les couples et l'équipe en charge.

On distingue deux dimensions dans l'identito-vigilance [149, 177]:

### **- Identification primaire ou identification « administrative »**

Elle est considérée comme la création et/ou l'attribution d'une identité au patient dans le système d'information hospitalier à l'occasion d'une admission. Elle comprend les activités de création et de vérification de l'identité du patient lors de son accueil et de son admission dans le centre.

Dans le centre d'AMP, l'identification du couple patient se fait à l'aide des cartes nationales valides du couple et de leur contrat de mariage.

### **- Identification secondaire ou « identification clinique »**

C'est une procédure de vérification de l'identité du patient avant tout acte de soins, durant le parcours de soins au niveau du centre AMP.

Si le laboratoire au niveau du centre AMP n'est concerné que par l'identification secondaire, cette dernière est clairement conditionnée par la qualité de la création de l'identité primaire, l'objectif est de vérifier la concordance entre l'identité du patient, les soins prodigués et tous les documents constitutifs de son dossier (demande d'examen, protocoles, etc.)

### **VI.1. Les règles d'identification secondaire**

L'acte de vérification de l'identité et la concordance d'identité entre le bon de prescription d'examen, les tubes ou flacons étiquetés, les étiquettes et l'identité du patient est la première étape dans l'ensemble des activités au sein du laboratoire AMP.

A chaque étape de la prise en charge en vue d'une AMP (prélèvement de gamètes, remise de paillettes d'autoconservation des embryons, insémination ou transfert embryonnaire), l'identification de l'homme et de la femme constituant le couple ou de la personne concernée est vérifiée par un document officiel comportant une photographie.

Les modalités de la vérification sont notées et cette vérification est tracée et signée par la personne qui l'a réalisée.

Au cours de toutes les étapes d'AMP, flacons, tubes et boîtes de cultures sont marqués de façon claire et permanente avec les noms des patientes et le numéro de cycle. Pour l'échantillon de sperme, le récipient contenant l'échantillon porte deux identifiants à savoir le nom et le prénom du patient et /ou du couple ainsi qu'un numéro d'identification propre au patient). Ces renseignements (qui peuvent être inscrits sur une étiquette) seront opposés par le patient lors de la collecte ou par le personnel lors de la réception de l'échantillon.

Le matériel biologique de chaque patient est traité dans une zone différente de travail, un seul patient est traité à la fois.

Les incubateurs et les systèmes de cryoconservation sont organisés de manière à identifier clairement les matériaux biologiques qui contiennent.

Tout prélèvement ou déplacement d'embryons doit être accompagné d'une fiche de traçabilité.

Toutes les non-concordances éventuelles sont repérées et signalées sur les fiches de non-conformités.

### **VI.2. Les outils d'identification**

- **Les étiquettes** : les traits stricts d'identité (numéro de cycle, nom de famille, prénom(s) du patient) figurent sur l'ensemble des documents édités, une structure standardisée de ces informations sur les différents supports permet d'établir une distinction visuelle rapide.

Les étiquettes sont détruites à la fin du processus en raison de la nature ponctuelle des informations qu'elles comportent et pour éviter leur utilisation accidentelle pour un autre patient.

- **La communication orale** : elle est primordiale entre le personnel et le patient, quel que soit l'outil d'identification du patient utilisé.

Les patients sont invités à donner leurs propres informations d'identification (au moins le nom complet et la date de naissance) avant insémination artificielle / transfert d'embryons. L'identité du patient à la réception de l'échantillon de sperme est vérifiée par une question ouverte: « Quel est votre nom s'il vous plaît? » et non pas « Vous êtes bien M ?

- **Le double contrôle** : au cours des étapes critiques, un double contrôle visuel par une deuxième personne (témoin) est effectué, ces vérifications sont tracées.

La date et l'heure de chaque manipulation et l'identité de tous les opérateurs et les témoins sont documentées tout au long du traitement au sein du laboratoire AMP.

### **VI.3. Les indicateurs portant sur les non-conformités de l'identification**

Les non-conformités sont relevées par la notification des fiches de non conformités.

On peut utiliser les indicateurs suivants pour les non conformités :

- nombre de patients non identifiés ou mal identifiés
- nombre/taux de discordances d'identification entre les échantillons prélevés et les demandes d'analyses
- nombre de dossier de patients avec omission de signature du double contrôle.