

*UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-*

ANNEE: 2012

THESE N°: 81

**VERIFICATION DE LA METHODE DE DOSAGE
DU [-2] proPSA (Hybritech p2PSA) SUR LE DXI 600®**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : 12 Décembre 2012

PAR

Mr. Emmanuel Boi Sylvester Abaalapour WAANA-ANG

Né le 10 Août 1984 à Accra (Ghana)

De L'Ecole Royale du Service de Santé Militaire - Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Cancer de la Prostate – [-2]proPSA – Vérification technique –
Unicel DXI 600®.

JURY

Mr. Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

Mme. Z. OUZZIF

Professeur Agrégé de Biochimie

Mr. A. AMEUR

Professeur d'Urologie

Mme. N. CHERKAOUI

Professeur de Pharmacie Galénique

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

- 1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

- Doyen : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mars, Avril et Septembre 1980

1. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam Neurochirurgie

Mai et Octobre 1981

2. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
3. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
4. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

5. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
6. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire
7. Pr. BENSOUDA Mohamed Anatomie
8. Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
9. Pr. LAHBABI Naïma ép. AMRANI Physiologie

Novembre 1983

10. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir* Pneumo-phtisiologie
11. Pr. BELLAKHDAR Fouad Neurochirurgie
12. Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

Décembre 1984

- | | | |
|-----|----------------------------------|-------------------------|
| 13. | Pr. BOUCETTA Mohamed* | Neurochirurgie |
| 14. | Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil | Radiothérapie |
| 15. | Pr. MAAOUNI Abdelaziz | Médecine Interne |
| 16. | Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi | Anesthésie -Réanimation |
| 17. | Pr. NAJI M' Barek * | Immuno-Hématologie |
| 18. | Pr. SETTAF Abdellatif | Chirurgie |

Novembre et Décembre 1985

- | | | |
|-----|---------------------------------------|---|
| 19. | Pr. BENJELLOUN Halima | Cardiologie |
| 20. | Pr. BENSALID Younes | Pathologie Chirurgicale |
| 21. | Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa | Neurologie |
| 22. | Pr. IHRAI Hssain * | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale |
| 23. | Pr. IRAQI Ghali | Pneumo-phtisiologie |

Janvier, Février et Décembre 1987

- | | | |
|-----|---------------------------------------|------------------------------|
| 24. | Pr. AJANA Ali | Radiologie |
| 25. | Pr. AMMAR Fanid | Pathologie Chirurgicale |
| 26. | Pr. CHAHED OUAZZANI Houria ép.TAOBANE | Gastro-Entérologie |
| 27. | Pr. EL FASSY FIIHRI Mohamed Taoufiq | Pneumo-phtisiologie |
| 28. | Pr. EL HAITEM Naïma | Cardiologie |
| 29. | Pr. EL MANSOURI Abdellah* | Chimie-Toxicologie Expertise |
| 30. | Pr. EL YAACOUBI Moradh | Traumatologie Orthopédie |
| 31. | Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah | Gastro-Entérologie |
| 32. | Pr. LACHKAR Hassan | Médecine Interne |
| 33. | Pr. YAHYAOUI Mohamed | Neurologie |

Décembre 1988

- | | | |
|-----|---------------------------------|--------------------------|
| 34. | Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib | Chirurgie Pédiatrique |
| 35. | Pr. DAFIRI Rachida | Radiologie |
| 36. | Pr. FAIK Mohamed | Urologie |
| 37. | Pr. HERMAS Mohamed | Traumatologie Orthopédie |
| 38. | Pr. TOLOUNE Farida* | Médecine Interne |

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

- | | | |
|-----|---------------------------------|--------------------------|
| 39. | Pr. ADNAOUI Mohamed | Médecine Interne |
| 40. | Pr. AOUNI Mohamed | Médecine Interne |
| 41. | Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali | Cardiologie |
| 42. | Pr. CHAD Bouziane | Pathologie Chirurgicale |
| 43. | Pr. CHKOFF Rachid | Pathologie Chirurgicale |
| 44. | Pr. HACHIM Mohammed* | Médecine-Interne |
| 45. | Pr. KHARBACH Aïcha | Gynécologie -Obstétrique |
| 46. | Pr. MANSOURI Fatima | Anatomie-Pathologique |
| 47. | Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda | Neurologie |
| 48. | Pr. SEDRATI Omar* | Dermatologie |

49. Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

50. Pr. AL HAMANY Zaïtounia	Anatomie-Pathologique
51. Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation
52. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM	Néphrologie
53. Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
54. Pr. BENABDELLAH Chahrazad	Hématologie
55. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif	Chirurgie Générale
56. Pr. BENSOUDA Yahia	Pharmacie galénique
57. Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
58. Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
59. Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
60. Pr. CHANA El Houssaine*	Ophtalmologie
61. Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
62. Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
63. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*	Chirurgie Générale
64. Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
65. Pr. OUAALINE Mohammed*	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
66. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH	Pharmacologie
67. Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique

Décembre 1992

68. Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale
69. Pr. BENOUDA Amina	Microbiologie
70. Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
71. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
72. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
73. Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
74. Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
75. Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
76. Pr. EL HADDOURY Mohamed	Anesthésie Réanimation
77. Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
78. Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
79. Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
80. Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
81. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
82. Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
83. Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

84. Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
85. Pr. AL BAROUDI Saad	Chirurgie Générale
86. Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie

87. Pr. BENJAAFAR Nouredine	Radiothérapie
88. Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
89. Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
90. Pr. CAOUI Malika	Biophysique
91. Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
92. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
93. Pr. EL AOUDAD Rajae	Immunologie
94. Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
95. Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
96. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
97. Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
98. Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
99. Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
100. Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
101. Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
102. Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
103. Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
104. Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
105. Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
106. Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
107. Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie –Obstétrique
108. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
109. Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

110. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
111. Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
112. Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
113. Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
114. Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
115. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
116. Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
117. Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
118. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
119. Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
120. Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
121. Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
122. Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
123. Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

124. Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
125. Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
126. Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique

127. Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
128. Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*	Urologie
129. Pr. BENZAOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
130. Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
131. Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
132. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
133. Pr. EL MESNAOUI Abbas	Chirurgie Générale
134. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
135. Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
136. Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
137. Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
138. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
139. Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
140. Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
141. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
142. Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
143. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

144. Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
145. Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
146. Pr. BOULANOVAR Abdelkrim	Ophtalmologie
147. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
148. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*	Parasitologie
149. Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
150. Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
151. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid	Chirurgie Générale
152. Pr. MOHAMMADI Mohamed	Médecine Interne
153. Pr. MOULINE Soumaya	Pneumo-phtisiologie
154. Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
155. Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
156. Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

Novembre 1997

157. Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie-Obstétrique
158. Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
159. Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
160. Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
161. Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
162. Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
163. Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
164. Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
165. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
166. Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation

167. Pr. KADDOURI Nouredine	Chirurgie Pédiatrique
168. Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie
169. Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
170. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
171. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
172. Pr. NAZI M'barek*	Cardiologie
173. Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie
174. Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
175. Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

176. Pr. AFIFI RAJAA	Gastro-Entérologie
177. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*	Pneumo-phtisiologie
178. Pr. ALOUANE Mohammed*	Oto-Rhino-Laryngologie
179. Pr. BENOMAR ALI	Neurologie
180. Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
181. Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
182. Pr. EZZAITOUNI Fatima	Néphrologie
183. Pr. KABBAJ Najat	Radiologie
184. Pr. LAZRAK Khalid (M)	Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

185. Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
186. Pr. KHATOURI ALI*	Cardiologie
187. Pr. LABRAIMI Ahmed*	Anatomie Pathologique

Janvier 2000

188. Pr. ABID Ahmed*	Pneumophtisiologie
189. Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie
190. Pr. BENCHERIF My Zahid	Ophtalmologie
191. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd	Pédiatrie
192. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
193. Pr. CHAOUI Zineb	Ophtalmologie
194. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer	Chirurgie Générale
195. Pr. ECHARRAB El Mahjoub	Chirurgie Générale
196. Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie
197. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*	Neurochirurgie
198. Pr. EL OTMANY Azzedine	Chirurgie Générale
199. Pr. GHANNAM Rachid	Cardiologie
200. Pr. HAMMANI Lahcen	Radiologie
201. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim	Anesthésie-Réanimation
202. Pr. ISMAILI Hassane*	Traumatologie Orthopédie
203. Pr. KRAMI Hayat Ennoufous	Gastro-Entérologie
204. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*	Anesthésie-Réanimation

205. Pr. TACHINANTE Rajae
206. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

207. Pr. AIDI Saadia
208. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
209. Pr. AJANA Fatima Zohra
210. Pr. BENAMR Said
211. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
212. Pr. CHERTI Mohammed
213. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
214. Pr. EL HASSANI Amine
215. Pr. EL IDGHIRI Hassan
216. Pr. EL KHADER Khalid
217. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
218. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
219. Pr. HSSAIDA Rachid*
220. Pr. LACHKAR Azzouz
221. Pr. LAHLOU Abdou
222. Pr. MAFTAH Mohamed*
223. Pr. MAHASSINI Najat
224. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
225. Pr. NASSIH Mohamed*
226. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2001

227. Pr. ABABOU Adil
228. Pr. BALKHI Hicham*
229. Pr. BELMEKKI Mohammed
230. Pr. BENABDELJLIL Maria
231. Pr. BENAMAR Loubna
232. Pr. BENAMOR Jouda
233. Pr. BENELBARHDADI Imane
234. Pr. BENNANI Rajae
235. Pr. BENOUACHANE Thami
236. Pr. BENYOUSSEF Khalil
237. Pr. BERRADA Rachid
238. Pr. BEZZA Ahmed*
239. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
240. Pr. BOUHOUCHE Rachida
241. Pr. BOUMDIN El Hassane*
242. Pr. CHAT Latifa
243. Pr. CHELLAOUI Mounia
244. Pr. DAALI Mustapha*

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Cardiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale

245. Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
246. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
247. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
248. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
249. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
250. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
251. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
252. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
253. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
254. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
255. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
256. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
257. Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
258. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
259. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
260. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
261. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
262. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
263. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
264. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
265. Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
266. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
267. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie

Décembre 2002

268. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
269. Pr. AMEUR Ahmed *	Urologie
270. Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
271. Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
272. Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
273. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
274. Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
275. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*	Gastro-Entérologie
276. Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique
277. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya	Psychiatrie
278. Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale
279. Pr. CHKIRATE Bouchra	Pédiatrie
280. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair	Chirurgie Pédiatrique
281. Pr. EL BARNOUSSI Leila	Gynécologie Obstétrique
282. Pr. EL HAOURI Mohamed *	Dermatologie
283. Pr. EL MANSARI Omar*	Chirurgie Générale
284. Pr. ES-SADEL Abdelhamid	Chirurgie Générale
285. Pr. FILALI ADIB Abdelhai	Gynécologie Obstétrique
286. Pr. HADDOUR Leila	Cardiologie

287. Pr. HAJJI Zakia	Ophtalmologie
288. Pr. IKEN Ali	Urologie
289. Pr. ISMAEL Farid	Traumatologie Orthopédie
290. Pr. JAAFAR Abdeloihab*	Traumatologie Orthopédie
291. Pr. KRIOUILE Yamina	Pédiatrie
292. Pr. LAGHMARI Mina	Ophtalmologie
293. Pr. MABROUK Hfid*	Traumatologie Orthopédie
294. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*	Gynécologie Obstétrique
295. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*	Cardiologie
296. Pr. NAITLHO Abdelhamid*	Médecine Interne
297. Pr. OUJILAL Abdelilah	Oto-Rhino-Laryngologie
298. Pr. RACHID Khalid *	Traumatologie Orthopédie
299. Pr. RAISS Mohamed	Chirurgie Générale
300. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*	Pneumophtisiologie
301. Pr. RHOU Hakima	Néphrologie
302. Pr. SIAH Samir *	Anesthésie Réanimation
303. Pr. THIMOU Amal	Pédiatrie
304. Pr. ZENTAR Aziz*	Chirurgie Générale

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

305. Pr. ABDELLAH El Hassan	Ophtalmologie
306. Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
307. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
308. Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
309. Pr. BENRAMDANE Larbi*	Chimie Analytique
310. Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
311. Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
312. Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
313. Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
314. Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique
315. Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
316. Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
317. Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
318. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
319. Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
320. Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
321. Pr. KARMANE Abdelouahed	Ophtalmologie
322. Pr. KHABOUZE Samira	Gynécologie Obstétrique
323. Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
324. Pr. LEZREK Mohammed*	Urologie
325. Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
326. Pr. NAOUMI Asmae*	Ophtalmologie

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| 327. Pr. SASSENOU ISMAIL* | Gastro-Entérologie |
| 328. Pr. TARIB Abdelilah* | Pharmacie Clinique |
| 329. Pr. TIJAMI Fouad | Chirurgie Générale |
| 330. Pr. ZARZUR Jamila | Cardiologie |

Janvier 2005

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 331. Pr. ABBASSI Abdellah | Chirurgie Réparatrice et Plastique |
| 332. Pr. AL KANDRY Sif Eddine* | Chirurgie Générale |
| 333. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid | Microbiologie |
| 334. Pr. ALLALI Fadoua | Rhumatologie |
| 335. Pr. AMAZOUZI Abdellah | Ophtalmologie |
| 336. Pr. AZIZ Noureddine* | Radiologie |
| 337. Pr. BAHIRI Rachid | Rhumatologie |
| 338. Pr. BARKAT Amina | Pédiatrie |
| 339. Pr. BENHALIMA Hanane | Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale |
| 340. Pr. BENHARBIT Mohamed | Ophtalmologie |
| 341. Pr. BENYASS Aatif | Cardiologie |
| 342. Pr. BERNOUSSI Abdelghani | Ophtalmologie |
| 343. Pr. BOUKLATA Salwa | Radiologie |
| 344. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed | Ophtalmologie |
| 345. Pr. DOUDOUH Abderrahim* | Biophysique |
| 346. Pr. EL HAMZAOUI Sakina | Microbiologie |
| 347. Pr. HAJJI Leila | Cardiologie |
| 348. Pr. HESSISSEN Leila | Pédiatrie |
| 349. Pr. JIDAL Mohamed* | Radiologie |
| 350. Pr. KARIM Abdelouahed | Ophtalmologie |
| 351. Pr. KENDOOUSSI Mohamed* | Cardiologie |
| 352. Pr. LAAROOUSSI Mohamed | Chirurgie Cardio-vasculaire |
| 353. Pr. LYAGOUBI Mohammed | Parasitologie |
| 354. Pr. NIAMANE Radouane* | Rhumatologie |
| 355. Pr. RAGALA Abdelhak | Gynécologie Obstétrique |
| 356. Pr. SBIHI Souad | Histo-Embryologie Cytogénétique |
| 357. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam | Ophtalmologie |
| 358. Pr. ZERAIDI Najia | Gynécologie Obstétrique |

AVRIL 2006

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 400. Pr. ACHEMLAL Lahsen* | Rhumatologie |
| 401. Pr. AKJOUJ Said* | Radiologie |
| 402. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra | Dermatologie |
| 403. Pr. BELMEKKI Abdelkader* | Hématologie |
| 404. Pr. BENCHEIKH Razika | O.R.L |
| 405. Pr. BIYI Abdelhamid* | Biophysique |
| 406. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine | Chirurgie - Pédiatrique |
| 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif* | Chirurgie Cardio – Vasculaire |

432. Pr. CHEIKHAOUI Younes	Chirurgie Cardio – Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibteissam	Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*	Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
441 Pr. IDRIS LAHLOU Amine	Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie
445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique
449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*	Parasitologie
450. Pr. MANSOURI Hamid*	Radiothérapie
451. Pr. NAZIH Naoual	O.R.L
452. Pr. OUANASS Abderrazzak	Psychiatrie
453. Pr. SAFI Soumaya*	Endocrinologie
454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra	Psychiatrie
431. Pr. SEFIANI Sana	Anatomie Pathologique
432. Pr. SOUALHI Mouna	Pneumo – Phtisiologie
434. Pr. TELLAL Saida*	Biochimie
435. Pr. ZAHRAOUI Rachida	Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

436. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
437. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid	Anesthésier réanimation
438. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *	Anesthésie réanimation
439. Pr. BAITE Abdelouahed *	Anesthésie réanimation
440. Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie
441. Pr. OUZZIF Ez zohra *	Biochimie
442. Pr. BALOUCH Lhousaine *	Biochimie
443. Pr. SELKANE Chakir *	Chirurgie cardio vasculaire
467. Pr. EL BEKKALI Youssef *	Chirurgie cardio vasculaire
468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *	Chirurgie cardio vasculaire
469. Pr. EL ABSI Mohamed	Chirurgie générale
470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *	Chirurgie générale
471. Pr. ACHOUR Abdessamad *	Chirurgie générale
472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *	Chirurgie générale
450. Pr. GHARIB Noureddine	Chirurgie plastique

451. Pr. TABERKANET Mustafa *	Chirurgie vasculaire périphérique
452. Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhoussain *	Microbiologie
459. Pr. MRANI Saad *	Virologie
460. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
461. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie
487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
470. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo ptisiologie
471. Pr. MARC Karima	Pneumo ptisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib *	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
478. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
479. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
480. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
481. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
482. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
483. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Décembre 2008

484. Pr TAHIRI My El Hassan*	Chirurgie Générale
485. Pr ZOUBIR Mohamed*	Anesthésie Réanimation

Mars 2009

486 Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
487 Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
488 Pr. BELYAMANI Lahcen *	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique

Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMAHZOUNE Brahim *	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *	Chirurgie Générale
Pr. BOUNAIM Ahmed *	Chirurgie Générale
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. CHTATA Hassan Toufik *	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. BOUI Mohammed *	Dermatologie
500 Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. DOGHMI Kamal *	Hématologie clinique
Pr. ABOUZAHIR Ali *	Médecine interne
Pr. ENNIBI Khalid *	Médecine interne
Pr. EL OUENNASS Mostapha	Microbiologie
Pr. ZOUHAIR Said*	Microbiologie
Pr. L'KASSIMI Hachemi*	Microbiologie
Pr. AKHADDAR Ali *	Neuro-chirurgie
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie
Pr. AGADR Aomar *	Pédiatrie
Pr. KARBOUBI Lamya	Pédiatrie
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *	Pneumo-ptisiologie
Pr. BASSOU Driss *	Radiologie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie
Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie
Pr. BOUSSOUGA Mostapha *	Traumatologie orthopédique
Pr. KADI Said *	Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*	Médecine interne
Pr. ERRABIH Ikram	Gastro entérologie
Pr. MOSADIK Ahlam	Anesthésie Réanimation
Pr. ALILOU Mustapha	Anesthésie réanimation
Pr. KANOUNI Lamya	Radiothérapie
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*	Radiologie
Pr. DARBI Abdellatif*	Radiologie
Pr. EL HAFIDI Naima	Pédiatrie
Pr. MALIH Mohamed*	Pédiatrie
Pr. BOUSSIF Mohamed*	Médecine aérologique

Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. LEZREK Mounir
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. LAMALMI Najat
Pr. ZOUAIDIA Fouad
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. CHADLI Mariama*

Chirurgie plastique et réparatrice
Chirurgie pédiatrique
Urologie
Chirurgie générale
ORL
Ophtalmologie
Hématologie
Anatomie pathologique
Anatomie pathologique
Physiologie
Biochimie chimie
Microbiologie

** Enseignants Militaires*

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

- | | |
|--|--|
| 1. Pr. ABOUDRAR Saadia | Physiologie |
| 2. Pr. ALAMI OUHABI Naima | Biochimie |
| 3. Pr. ALAOUI KATIM | Pharmacologie |
| 4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma | Histologie-Embryologie |
| 5. Pr. ANSAR M'hammed | Chimie Organique et Pharmacie Chimique |
| 6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz | Applications Pharmaceutiques |
| 7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed | Génétique Humaine |
| 8. Pr. BOURJOUANE Mohamed | Microbiologie |
| 9. Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia | Biochimie |
| 10. Pr. DAKKA Taoufiq | Physiologie |
| 11. Pr. DRAOUI Mustapha | Chimie Analytique |
| 12. Pr. EL GUESSABI Lahcen | Pharmacognosie |
| 13. Pr. ETTAIB Abdelkader | Zootchnie |
| 14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes | Pharmacologie |
| 15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed | Chimie Organique |
| 16. Pr. IBRAHIMI Azeddine | Biotechnologie |
| 17. Pr. KABBAJ Ouafae | Biochimie |
| 18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine | Biologie |
| 19. Pr. REDHA Ahlam | Biochimie |
| 20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE M ^{ed} | Chimie Organique |
| 21. Pr. TOUATI Driss | Pharmacognosie |
| 22. Pr. ZAHIDI Ahmed | Pharmacologie |
| 23. Pr. ZELLOU Amina | Chimie Organique |



DEDICACES



A DIEU

***Le tout puissant, qui m'a toujours
gardé, inspiré et guidé dans le
droit chemin.***

***Je lui dois ce que je suis devenu
Merci pour sa clémence et sa
miséricorde.....***





A Feu Sa Majesté le Roi HASSAN II.

***Que Dieu l'accueille en sa sainte
miséricorde.....***





A Sa Majesté le Roi MOHAMMED VI

Chef Suprême et Chef d'Etat Major

Général des Forces

Armées Royales

Que Dieu glorifie son règne et le préserve





***A Son Excellence Prof John Evans
Atta Mills***

***Président du 4^{ème} République du
Ghana et Chef Suprême des Forces
Armées Ghanéennes***

Que son âme repose en paix parfaite





***A Son Excellence John Dramani
Mahama***

***Président de la 4^{ème} République du
Ghana et Chef Suprême des Forces
Armées Ghanéennes***

*Que Dieu le soutienne dans son pouvoir, le protège et
lui accorde longévité.*





A Son Excellence Aliou Mahama
Vice président du 4^{ème} République du
Ghana

Que son âme repose en paix parfaite





***A son Excellence monsieur C.N.A.
KOTEY, ambassadeur de la
République du Ghana auprès du
Royaume du Maroc et son épouse***

*Nous ne saurions vous remercier pour
Votre soutien pendant notre séjour
Au Maroc. Que cette thèse soit
l'expression de notre reconnaissance.
Que le seigneur vous bénisse et vous
Accorde longue vie.*





***A Monsieur le Médecin Général de Brigade, ALI
ABROUQ***

***Professeur d'otorhinolaryngologie, Inspecteur
du Service de Santé des Forces Armées Royales***

En témoignage de notre grand respect et notre profonde

Considération





***A Monsieur le Médecin Colonel Major, Mohammed
HACHIM***

***Professeur de Médecine Interne, Médecin Chef de
l'HMIMV de Rabat***

Mon Colonel Major,

*Travailler en équipe, se concerter en permanence, collaborer, dialoguer
... sont les bases de votre méthode de fonctionnement préalablement à
toute mise en place d'un projet au sein de l'HMIMV. Votre
dynamisme est exemplaire. Vous avez été un acteur principal dans
l'acquisition de ce nouvel équipement au laboratoire de Biochimie.*

*Qu'il nous soit ainsi permis Mon Colonel Major, à travers cette
étude, de vous exprimer notre grand respect et notre profonde
considération.*





A Monsieur le Médecin Colonel Major

ABDELHAMID HDA

Directeur de l'E.R.S.S.M et de l'E.R.M.I.M

*En témoignage de notre grand respect et de notre profonde
considération.*





***A Monsieur l'Air Commodore Issifu Sakib
Kadri, Attaché de Défense auprès de
L'ambassade du Ghana en Egypte***





A l'ensemble des membres de la Commission de validation de la grille technique de l'analyse des équipements sous la direction effective de Monsieur le Colonel Major Médecin Chef de l'HMIMV :

-Les Représentants de l'inspection du Service de Santé des F.A.R.

-Les Représentants du pole de la Pharmacie de l'HMIMV

-Les Représentants des Services administratifs et financiers de l'HMIMV

-Les Ingénieurs biomédicaux de l'HMIMV

-Madame le Chef de pole des laboratoires de l'HMIMV

-L'équipe du laboratoire de Biochimie de l'HMIMV

En témoignage de notre grand respect et de notre profonde considération. Aussi pour avoir eu un rôle indéniable dans l'acquisition du nouvel équipement étudié.





***A tout le corps diplomatique de l'Ambassade du
Ghana au Maroc***





***A tout le personnel de l'ERSSM et de
l'HMIMV,***

Merci pour tout,





A mon défunt père
WAANA-ANG Boi Sylvester

Que son âme repose paix parfaite





A ma très chère mère

TAAWUOLLO Cecilia

« Instruis l'enfant selon la voie qu'il doit suivre, et quand il sera grand, il ne s'en détournera pas. Proverbes 22,6 »

Maman aucun mot ni aucune dédicace ne pourrait exprimer toute l'estime et toute la reconnaissance que j'éprouve a ton égard. Maman tu es une femme courageuse, forte, battante tu t'es toujours battue pour tes enfants et ta famille, tu as fais tellement de sacrifices pour que j'en arrive là.

Aujourd'hui est ton jour de gloire le seigneur t'as récompensé, voila que tu as réussi .Reçois par ce modeste travail l'expression de ma considération profonde, de mon amour intarissable .Que ce travail puisse encore t'honorer et faire ta fierté .J'espère être à la hauteur de tous les espoirs que tu as mis en moi.

Tu as toujours été un model de vie pour moi sois bénis.

Je prie Dieu qu'il te protège, qu'il te garde, te donne la santé et t'accorde longévité.

Je t'aime maman !





A mes frères et sœurs

Vous avez été pleins de patience

Et de dévouement envers benjamin que je suis.

Les mots ne sauraient exprimer l'entendu de mon affection et de

Ma gratitude

Je vous dédie ce travail et vous exhorte au resserrement des liens

De la famille dans l'amour, le respect, l'humilité et le courage.

Que le seigneur vous accorde réussite, santé et prospérité !





***A tous mes super anciens et anciens de
l'ERSSM toutes Nationalités confondues***

Tous mes respects





***A tous mes promotionnaires de l'ERSSM
Rimen Lionel Rashid, Elie, Hervé, Yoyo,
Matas, Akim, Yapi, Douhou, Affane, Rim
Romuald Anicet, Diane, Elliot Lamptey,
Mitch, Justin, Elyamin, GUESSAN Benini,
Kwaku Louku Frank, Mbechezi, Farhedine
Franchisca.....***

*La promotion est quelque chose de sacré vous resterez chacun
De vous dans mon cœur
Puisse Dieu guider chacun de vos pas et vous donner la force
De terminer vos études !!!!!*





A mes jeunes Ghanéens de l'ERSSM

NII SAPEI NTREH Isaac, MWINZUMAH SAMPSON

Maxwell, Gloria Edith BOAFO

Daignez pérenniser l'esprit militaire qui vous à été inculqué

Que ce travail soit un exemple pour la suite de votre cursus

Que Dieu vous guide sur ce long chemin !!!





***A tous mes jeunes de l'ERSSM des autres nationalités
A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider,
Me conseiller, m'encourager ou simplement se sourire.
A tous ceux que j'ai omis de citer par contraintes du travail***





***A tous les gens qui ont joué un rôle primordial lors
de mon séjour au Maroc***

Fatima El HAQAoui

Marie Charlotte N'GUESSAN

.....

Vous êtes et resterez gravés dans mon cœur





REMERCIEMENTS





A notre maître et président de thèse

Monsieur Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

Chef de service du laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie

Vice Doyen spécifique à la Pharmacie- FMPR

Vous nous faites l'insigne honneur d'accepter la présidence de notre thèse.

Nous avons pu apprécier vos qualités humaines et professionnelles.

Nous garderons toujours de votre enseignement de notre passage dans le service en tant qu'externe, un souvenir indélébile.

Veillez cher président et maître, croire à l'expression de notre plus profond respect et notre sincère admiration.





A notre maître et rapporteur de thèse
Madame le Pharmacien Lt. Colonel Zohra OZZIF
Professeur de Biochimie
Chef de service du laboratoire de Biochimie HMIMV

Vous nous avez inspiré le sujet de thèse, vous nous avez guidé tout au long de son élaboration, avec bienveillance et compréhension, flexibilité et disponibilité ont été les qualités les plus marquantes au cours de cette collaboration. Votre accueil si simple, pour l'un de vos élèves, vos qualités humaines rares, vos qualités professionnelles ont été un enseignant complémentaire pour notre vie professionnelle et privée.

Veillez accepter ici, cher maître, l'expression de notre gratitude et l'expression de notre profonde reconnaissance.





A notre maître et membre du jury
Monsieur le médecin Lt-colonel A. AMEUR
Professeur d'urologie
Chef de service d'Urologie HMIMV

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

Nous avons apprécié vos qualités d'enseignant et de médecin, votre dynamisme et votre extrême sympathie.

Veillez trouver ici, cher maître, l'expression de notre vive reconnaissance et notre gratitude.





A notre maître et membre du jury

Madame le Pharmacien commandant Nawal CHERKAOUI

Professeur de Pharmacie Galénique

Pole de Pharmacie HMIMV

Vous avez aimablement accepté de juger notre thèse.

Nous avons pu apprécier vos qualités professionnelles et humaines.

Veillez trouver ici cher maitre, le témoignage de notre reconnaissance et de nos sincères remerciements



*A toute l'équipe du service de Biochimie de l'hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V
HMIMV de Rabat ; en particulier tout le personnel Officiers du laboratoire.*

A la Société Mabiotech pour nous avoir aidés à la réalisation de ce travail.

Au Docteur Larbi BOUATTI

Merci pour la réalisation de l'étude statistique de notre travail.

Au Pharmacien Capitaine Gildass

Résident en Biologie CHU

Merci pour la lecture et la correction



**LISTE DES
ILLUSTRATIONS**

LISTE DES ABBREVIATIONS

AFNOR	: Agence Française de Normalisation
BPSA	: PSA Bénin
CE	: Communauté Européenne
CIQ	: Contrôle Interne de Qualité
CQ	: Contrôle Qualité
CV	: Coefficient de Variation
DMDIV	: Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro
EEQ	: Evaluation Externe de la Qualité
GBEA	: Guide de Bonnes pratiques d'Exécution analytiques
HAS	: Haute Autorité de Santé
hK	: human Kallikrein
HMIMV	: Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V
<i>iPSA</i>	: PSA Inactif
ISO	: International Organisation of Standardisation
LBM	: Laboratoire de Biologie Médicale
LOD	: Limit Of Detection
LOQ	: Limit Of Quantification
PCA3	: Prostate Cancer Gene 3
<i>phi</i>	: Prostate Health Index
PSA	: Prostate Spécific Antigen
PSA-RPs	: PSA related Peptides
PSA-Tr	: PSA Tronqué
SFBC	: Société Française de Biochimie Clinique
Valtec	: Validation des Techniques

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Composition du PSA total et du PSA libre	8
Figure 2	Facteurs de maîtrise d'une méthode (diagramme d'Ishikawa)	12
Figure 3	Schéma illustrant le concept d'incertitude des mesures	15
Figure 4	Auto-analyseur système Unicel DxI 600® Access Immuno-assay / Laboratoire de Biochimie/HMIMV	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principales caractéristiques des référentiels envisageables pour la validation de techniques	24
Tableau 2	Différents modules à programmer en fonction des stratégies à déployer	26
Tableau 3	Caractéristiques technologiques	40
Tableau 4	Valeurs Cibles de la Répétabilité	49
Tableau 5	Valeurs cibles de la fidélité intermédiaire (Reproductibilité intra-laboratoire)	50
Tableau 6	Valeurs cibles de la Limite de détection (LOD) et la Limite de Quantification (LOQ)	50
Tableau 7	Comparaison des résultats de l'étude de la répétabilité (Spécimens de CIQ niveaux 1, 2 et 3) avec les spécifications du fournisseur et des études préalablement menées sur ce paramètre	52
Tableau 8	Comparaison des résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire (Spécimens de contrôles niveaux 1, 2 et 3) avec des études	53
Tableau 9	Comparaison des résultats de l'étude de la sensibilité avec les valeurs cibles du fournisseur et une autre étude	54



**TABLE DES
MATIÈRES**

INTRODUCTION	1
PARTIE THEORIQUE	5
I. PSA/ [-2] pro PSA /INDEX phi.....	6
A. PSA/ [-2] pro PSA.....	6
B. Prostate Health Index (Index phi).....	8
II. VERIFICATION / VALIDATION DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE.....	10
A. Choix et maitrise des méthodes.....	10
B. Définitions et terminologie.....	12
C. Vérification/ Validation de méthodes : Une exigence dans les référentiels de qualité.....	15
D. Conditions et démarches à suivre pour la validation des méthodes.....	21
PARTIE PRATIQUE	37
I. MATERIELS ET METHODES.....	38
A. Matériels.....	38
B. Méthodes.....	42
1.Principe de la Technique de dosage utilisée.....	42
2.Réactifs, contrôles et calibrateurs utilisés.....	43
3.Protocole d'évaluation.....	43
II.RESULTATS.....	47
A.Fidélité.....	47
B.Limite de détection (LOD).....	47
C.Limite de Quantification.....	48

D. Valeurs cibles des modules évalués (Tableaux 4, 5 et 6).....	49
III.DISCUSSION.....	51
A.Evaluation de la Fidélité.....	51
B.Evaluation de la Sensibilité.....	53
CONCLUSION	55
RESUME	
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	



INTRODUCTION

Le cancer de la prostate, maladie tumorale de la glande prostatique, est une prolifération anormale des cellules de cette glande qui commencent ainsi à se multiplier de façon désordonnée. Il fait certes débat au sein de la communauté urologique, mais intéresse en réalité toute la communauté médico-scientifique.

Cette pathologie néoplasique constitue un problème majeur de santé publique. Elle représente, en effet, une cause importante de mortalité par cancer dans le monde, avec près de **85000** décès tous les ans en Europe et aux Etats-Unis [1].

Le cancer de la prostate est également la 2ème cause de décès par cancer chez l'homme, après 60 ans. Son incidence est en forte augmentation, en faisant le 1er cancer de l'homme en France. Cela s'explique par l'effet combiné du vieillissement de la population, de l'amélioration de la sensibilité du diagnostic et de la diffusion du dépistage par le dosage du PSA (Prostate Specific Antigen) [2].

Cancer rare avant 50 ans, sa fréquence croît fortement avec l'âge. La cause en reste inconnue mais l'origine ethnique et les antécédents de cancer de la prostate ou du sein dans la famille constituent des facteurs de risque établis [4]. Avec une survie relative à 5 ans estimée à près de 80 %, c'est un cancer de très bon pronostic. L'âge moyen au diagnostic est de 71 ans [2].

Sa détection précoce, basée à ce jour, sur le dosage sanguin du PSA, marqueur diagnostique de référence, demeure un sujet très controversé. En effet, le PSA possède des limites et des imperfections en rapport avec les différents facteurs liés à son interprétation. De plus, sa spécificité insuffisante génère un grand nombre de biopsies prostatiques entraînant un sur-diagnostic avec des effets secondaires parfois invalidants et un sur-traitement avec de lourds enjeux éthiques et économiques [3].

Par ailleurs, l'utilisation d'autres paramètres, dérivés du PSA, notamment le % free-PSA, la densité du PSA ou encore sa vélocité, ne semblent pas répondre pleinement aux attentes des urologues. Le test moléculaire urinaire PCA3 (Prostate

Cancer Gene 3) montre, certes, une supériorité sur le PSA en termes de valeur prédictive et de spécificité, mais exige une phase pré analytique délicate et semble très coûteux.

Cela a conduit à rechercher et étudier de nouveaux marqueurs, comme les formes tronquées du PSA libre, dans le but d'améliorer la spécificité du PSA dans la zone grise, comprise entre **2 et 10 ng/ml**, de mieux caractériser le cancer de la prostate, et enfin de mieux sélectionner des patients à haut risque pour une prise en charge adaptée au profil de l'individu, à moindre coût.

Ces nouveaux marqueurs, particulièrement le **[-2] pro PSA**, sont retrouvés en quantités élevées dans le tissu cancéreux de la zone périphérique comparativement aux tissus de l'Hyperplasie Bénigne de la Prostate. Le résultat de ce marqueur, le [-2] pro PSA, rentre dans le calcul d'un index, appelé *phi* pour **Prostate Health Index ou indice de santé de la prostate** développé par la société Beckman Coulter, qui combine dans une formule mathématique d'autres paramètres dans le but d'augmenter la spécificité du PSA améliorant ainsi la détection du cancer de la prostate dans cette plage ou zone grise [1].

Le laboratoire de Biochimie et de Toxicologie en collaboration étroite avec le service d'urologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat, projette de réaliser une étude visant à évaluer l'apport de ce nouveau paramètre dans le diagnostic, la prédiction du pronostic et le suivi du cancer de la prostate. Ce travail prospectif vise essentiellement à intégrer ce nouveau paramètre biochimique dans l'arsenal biologique actuel, en vue d'améliorer la satisfaction des besoins implicites de la patientèle de l'HMIMV (en termes de diagnostic juste, de soins adaptés et de traitement pertinent), comme le recommandent les normes internationales et les exigences réglementaires.

Pour ce faire, une *évaluation analytique* de ce paramètre au laboratoire de biochimie doit précéder cette étude et constitue l'objet de **la présente thèse de doctorat** en pharmacie. Cela consiste à *procéder à une vérification de la méthode de dosage du [-2]proPSA* comme stipulé dans les référentiels qualité notamment le GBEA (Guide de Bonne Exécution des Analyses), devenu opposable au sein des laboratoires de Biologie Médicale Marocains depuis Novembre 2010 ainsi que les normes ISO, et représente le principal objectif du présent travail. Cette démarche de vérification comporte l'ensemble des procédures à mettre en œuvre pour s'assurer que la méthode évaluée présente la fiabilité requise pour répondre aux exigences de qualité dans l'état actuel de l'art [5].

Elle permet de connaître les caractéristiques de la nouvelle méthode pour définir et juger sa qualité, d'en préciser les limites de validité et de s'assurer qu'elle convient à l'utilisation prévue [6, 7].

Les résultats doivent, en effet être suffisamment fiables pour ne pas entraîner d'erreur d'interprétation dans le cadre du diagnostic, du pronostic, de la surveillance, de la prévention, du dépistage et de l'épidémiologie de la pathologie étudiée.

Par ailleurs, l'utilisation d'un protocole rationnel et standardisé comme celui élaboré et publié par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) [20] permet de simplifier le travail d'évaluation, d'uniformiser la présentation des données en vue de permettre un jugement comparatif des résultats obtenus par des évaluateurs ou des laboratoires différents.

En ce qui concerne l'*évaluation clinique* du nouveau marqueur parmi les outils existants de dépistage et du suivi du cancer de la prostate, elle sera réalisée, en concertation avec l'équipe des urologues de l'HMIMV dans le cadre d'un autre travail de thèse.



PARTIE THEORIQUE

I. PSA/ [-2] pro PSA /INDEX phi

A. PSA/ [-2] pro PSA

Le PSA est une protéine de 237 acides aminés à activité sérine protéase appartenant à la famille des kallikréines tissulaires, la hK3 (human Kallikrein 3) [9]. Il est sécrété principalement par les cellules épithéliales de la prostate. Quelques expressions ectopiques ont été décrites dans le tissu mammaire et le tissu ovarien cancéreux sous forme de pré-proPSA, activé ensuite par des protéases en proPSA puis en PSA mature.

Le rôle physiologique du PSA est la liquéfaction du liquide séminal. En revanche, son rôle dans les pathologies prostatiques reste encore inconnu. Physiologiquement, les concentrations de PSA dans la circulation sont très faibles. Il circule soit sous forme libre, soit sous forme complexée, essentiellement à l' α 1-antichymotrypsine et à l' α 2-macroglobuline. Il existe en fait trois formes de PSA Libre : le PSA Inactif (*iPSA*), le PSA Bénin (*BPSA*) présent essentiellement chez les patients ayant une Hypertrophie Bénigne de la Prostate et le *proPSA* dont l'augmentation est en lien direct avec la présence d'un Cancer de prostate.

Le séquençage et le clonage du génome humain révèlent un total de 15 gènes codant pour les kallikréines tissulaires. Ces gènes se situent sur le bras long du chromosome 19 (19q13.2-19q13.4). Ils comportent 5 exons de tailles similaires avec 40 à 80 % d'homologie de séquences, s'expriment dans différents tissus et sont, pour bon nombre, régulés par les hormones stéroïdiennes. Parmi ces gènes, le gène hK3 produit au moins 15 transcrits de 0,7 à 6,1 kb dans la prostate. Ces transcrits sont le résultat d'un épissage alternatif des introns et des exons.

Le transcrit majeur qui a une taille de 1,6 kb code pour le PSA. En réalité ce sont huit protéines différentes qui sont synthétisées à partir de ce transcrit : le PSA, le PSA-Tr (PSA tronqué), 5 variants de PSA (PSA-RPs : PSA related peptides), et une protéine sans relation avec le PSA: le PSA-LM.

Dans un premier temps, ce transcrit majeur est traduit en *précurseur inactif* : le *pré-proPSA* constitué de **261 acides aminés**. Dans un deuxième temps, celui-ci est clivé au niveau de son extrémité N-terminale en *proPSA* contenant **244 acides aminés**, précurseur également *inactif*.

Enfin, c'est ce proPSA qui, suite à un clivage extracellulaire par l'hK2 ou la trypsine du peptide pro-leader de 7 acides aminés (APLILSR) en position N-terminale situé entre l'arginine en position 7 et l'isoleucine en position 8, aboutit à la *forme active* : le PSA composé de 237 acides aminés [8, 9].

L'étude de cette étape de maturation du PSA a permis de mettre en évidence différentes formes dites "tronquées" du proPSA, qui sont inactives. Celles-ci possèdent un peptide leader de 1 à 7 acides aminés et n'ont pas d'activité enzymatique. On les nomme en considérant le nombre d'acides aminés présent au niveau du peptide leader: par exemple, la forme native qui possède les 7 acides aminés est également notée [-7] pPSA, celle qui possède seulement 2 acides aminés (arginine et sérine) est notée [-2] pPSA.

La vitesse de transformation du proPSA en PSA diffère selon la forme du proPSA: il faut moins d'une heure pour les formes [-5] et [-7] pPSA, 2 heures pour la forme [-4]. **Les formes [-2] et [-1]** ne sont quant à elles converties ni par la hK2, ni par la trypsine. Le [-5] pPSA et le [-7] pPSA ne sont pas différenciables biochimiquement. Cette difficulté explique le manque de spécificité des processus analytiques employés. C'est pourquoi l'on parle de [-5/-7] pPSA [12].

Par ailleurs, il semble que c'est le [-2] pPSA qui a attiré le plus l'attention de la communauté scientifique en raison de son taux élevé dans les extraits tumoraux et de sa grande stabilité in vitro.

La **figure 1** donne une représentation plus détaillée des formes moléculaires du PSA.

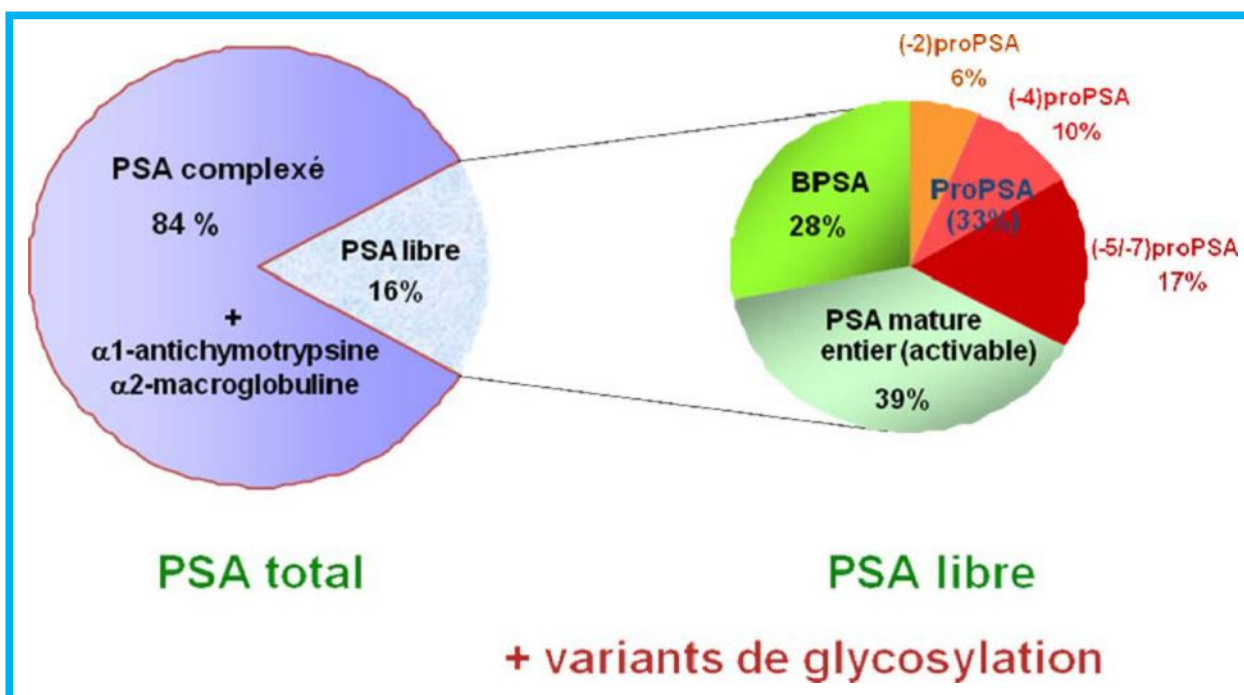
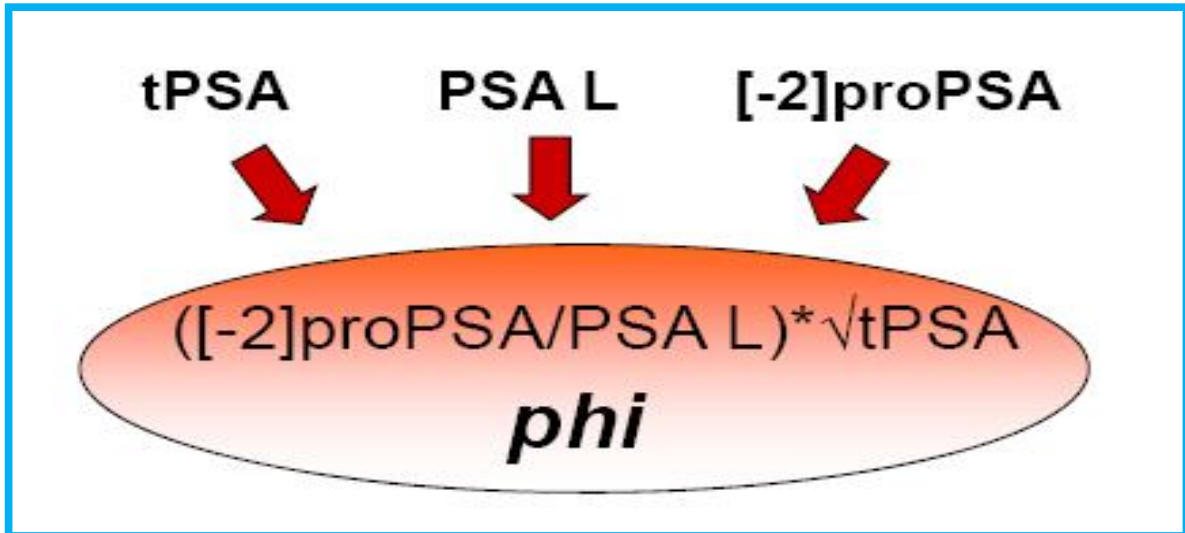


Figure 1 : Composition du PSA total et du PSA libre [10].

B. Prostate Health Index (Index phi)

Le dosage du PSA est actuellement l'un des piliers du dépistage du cancer de la prostate chez l'homme de plus de 50 ans. Pourtant ce dosage apporte peu d'information lorsqu'il se situe entre 2 et 10 ng/mL. Un excès d'examens complémentaires induit alors un surcoût pour la société, voire des effets secondaires parfois invalidants. Dans ce cadre, le rapport PSA libre/PSA total, ainsi que d'autres paramètres ne répondent pas pleinement aux attentes des urologues.

L'indice *phi* est calculé à partir des dosages du PSA total, PSA libre et [-2] proPSA (p2PSA) [10, 11, 13] Selon la formule suivante :



Pour une sensibilité équivalente, l'index phi permet d'augmenter de façon importante la spécificité de détection du cancer de prostate par rapport aux autres marqueurs [13].

Des résultats permettent de positionner l'indice *phi* comme un indicateur indépendant des autres paramètres. Sa confrontation aux données cliniques permet de le situer dans cet arsenal biologique et d'en évaluer les performances. Son utilisation en test de routine pourrait permettre, en augmentant les performances d'une première série de biopsies, de limiter les indications de re-biopsies ainsi que d'éviter certaines biopsies inutiles. [13]. Il est utilisé comme une aide pour distinguer un cancer de la prostate d'affections prostatiques bénignes, lorsqu'il est utilisé conjointement avec les tests Access Hybritech PSA, free PSA et p2PSA comme une aide dans la détection d'un cancer de la prostate. Il a montré également un intérêt pour différencier au stade précoce les cancers potentiellement agressifs [1].

II. VERIFICATION / VALIDATION DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à procéder à la validation des techniques en préalable à leur utilisation et à le justifier.

En effet, le choix de la technique et sa fiabilité est l'un des facteurs déterminants des résultats des analyses de biologie médicale.

C'est une responsabilité qui incombe au biologiste. Ce dernier doit sélectionner ses outils et méthodes et les valider en vue d'assurer la transférabilité des résultats dans la mesure du possible, comme le recommandent les référentielles qualités. Il s'agit d'une exigence du système « Assurance qualité » et un pré-requis indispensable dans le cadre d'accréditation des laboratoires selon les normes ISO 17025 ou 15189 [25].

A. Choix et maîtrise des méthodes

La biologie médicale est devenue, à la suite d'une évolution profonde de l'approche médicale et de la connaissance scientifique, un élément crucial du parcours de soins, déterminant pour le diagnostic, l'évaluation pronostique, le suivi ainsi que la prise en charge thérapeutique de la majorité des pathologies.

Pour cela, le choix des méthodes d'analyses ne se fait plus au hasard, mais selon des critères définis, relatifs au principe de la technique et sa fiabilité, aux avancées technologiques intégrant l'automatisation et l'informatisation de l'équipement, à la bibliographie, aux exigences de la clientèle, au coût,

- Par ailleurs, l'exactitude et la fiabilité d'un essai, examen ou analyse réalisé ne dépendent pas uniquement du personnel (formation, habilitation formalisée, compétence), des installations et conditions ambiantes (locaux, qualité de l'eau, température, stabilité de l'alimentation électrique, humidité...), des équipements, mesurage, conditions de préparation, de manutention, mais aussi des *méthodes et leur validation*.

Ce qui revient à dire que la maîtrise de la méthode oblige à connaître les 5M (Milieu, Méthode, Matériel, Main d'œuvre, Matière), comme le souligne la **figure 2**.

- Matière : matière première, fourniture, pièces, ensemble, qualité, ...
- Matériel : machines, outils, équipement, maintenance, etc. recense les causes qui ont pour origine les supports techniques et les produits utilisés.
- Main d'œuvre : directe, indirecte, motivation, formation, absentéisme, expérience, problème de compétence,
- Milieu : environnement physique, lumière, bruit, poussière, localisation, aménagement, température, législation,
- Méthode : instructions, manuels, procédures, modes opératoires utilisés,

Ou peut ajouter aux 5M deux critères supplémentaires (Management et Moyens financiers) pour obtenir les 7M [14].

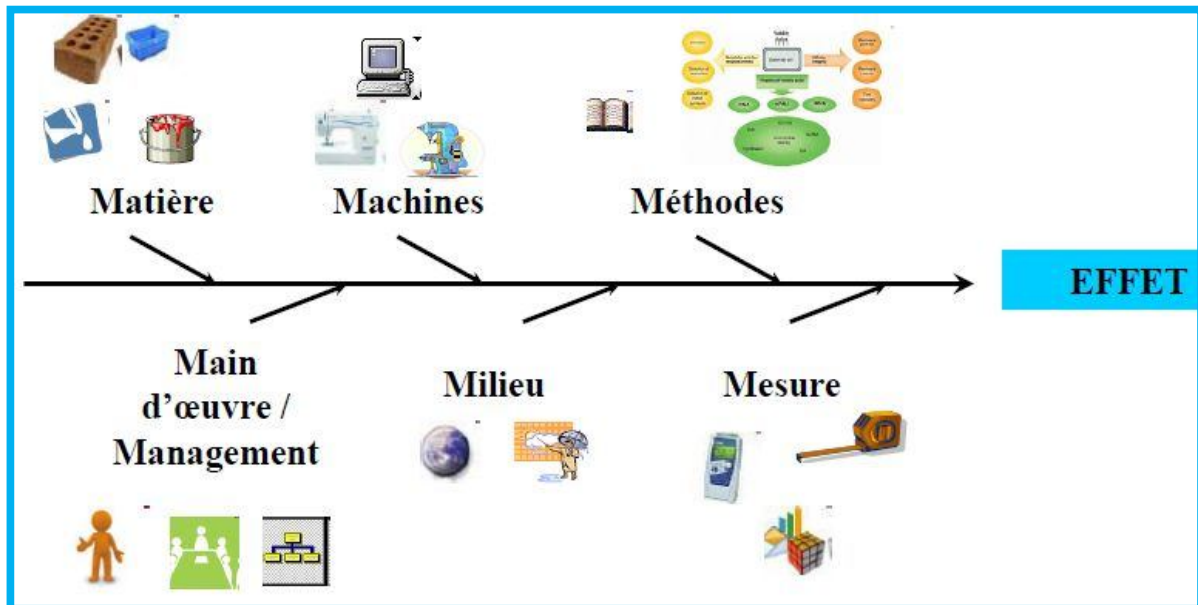


Figure 2 : Facteurs de maîtrise d'une méthode (diagramme d'Ishikawa) [15]

B. Définitions et terminologie

1. Validation

Elle correspond à la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue et déterminée sont remplies.

«La validation de méthode» correspond à l'ensemble des procédures à mettre en œuvre pour s'assurer qu'une méthode présente la fiabilité requise pour répondre aux exigences de qualité dans l'état actuel de l'art [16,17].

2. Vérification

Elle correspond à la confirmation par l'examen et l'établissement des preuves que les exigences spécifiées ont été satisfaites [16, 17].

3. L'état de l'art

Il représente le niveau de performances analytiques obtenues, à un moment donné, dans un certain nombre de laboratoires. Il est, en général, établi à partir des résultats des programmes de contrôle de qualité intra et/ou inter laboratoires. Le niveau de performance atteint par un certain nombre de laboratoires parmi ceux qui favorisent les meilleurs résultats pourrait constituer un objectif à atteindre pour tous [16].

4. Méthode de mesure

C'est une description générique logique des opérations mises en œuvre dans un mesurage [18].

5. Méthode quantitative

C'est une méthode fournissant un résultat chiffré, sur une échelle continue, dont les limites basses et hautes sont connues, en relation directe avec une quantité ou une activité donnée de l'analyte à mesurer [16].

6. Coefficient de variation

Il s'agit du rapport de l'écart type et la moyenne pour un caractère non négatif.

7. Erreur

Il s'agit de la différence entre la valeur mesurée d'une grandeur et une valeur de référence.

8. Série

Il s'agit de conditions expérimentales aussi représentatives que possible de la variabilité de l'utilisation de la méthode en routine (jour, opérateur, appareillage, etc.) [17].

9. Fidélité ou précision (Figure 3)

La fidélité ou précision exprime l'étroitesse de l'accord entre les indications d'une valeur mesurée obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées [16]. La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. L'étude de la fidélité peut inclure :

✓ *La répétabilité* mesurée dans les conditions : Même procédure de mesure, même opérateur, même système de mesure, même condition de fonctionnement, même milieu, même objet de mesure pendant une courte période de temps. Il est recommandé d'utiliser au maximum deux niveaux de concentration. [16, 17].

✓ *La fidélité intermédiaire* (reproductibilité intra-laboratoire) correspondant aux conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode en utilisant des échantillons identiques dans le même laboratoire et des conditions opératoires différentes (opérateur, étalonnage, lot de réactifs, etc..) pendant un intervalle de temps donné. Elle est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et à deux niveaux. [16, 17].

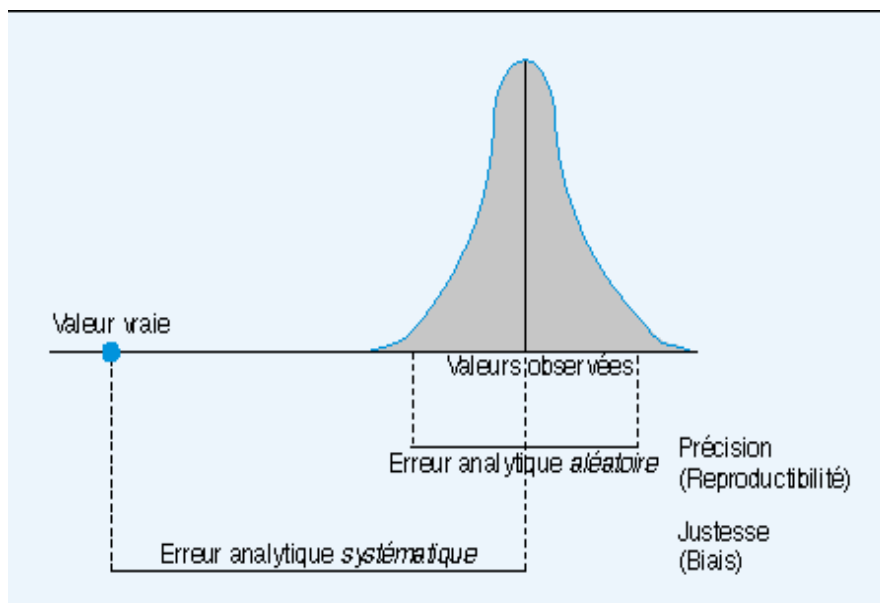


Figure 3 : Schéma illustrant le concept d'incertitude des mesures [20]

C. Vérification/ Validation de méthodes: Une exigence dans les référentiels de qualité

1. Le Guide de Bonnes Exécution d'Analyses (GBEA)

Il s'agit d'un référentiel actuellement opposable à tout laboratoire de biologie médicale au Maroc, depuis 2010.

La parution en France de ce texte réglementaire et obligatoire, défini en annexe de l'arrêté du 02 Novembre 1994, a été un événement important pour tous les laboratoires privés et publics. Cinq ans après, le GBEA a été modifié par l'arrêté du 26 Novembre 1999 publié au Journal Officiel le 11 Décembre 1999. Les principales évolutions portent sur l'instrumentation, en particulier le suivi métrologique des équipements, la gestion des réactifs, l'informatique, le transport des échantillons biologiques et la mise en œuvre des techniques de biologie moléculaires.

Le GBEA comprend les règles de fonctionnement concernant l'organisation en termes de personnel, l'installation et l'instrumentation. Une partie importante est consacrée à l'exécution des analyses ; elle précise toutes les étapes à formaliser par les documents écrits [21].

Le GBEA indique (**chapitre I.1**) que «C'est au biologiste qu'incombe le choix des méthodes optimisées, utilisées dans un grand nombre de laboratoires et recommandées par les sociétés scientifiques nationales et internationales de biologie ou, le cas échéant, validées par lui-même à condition qu'elles permettent, dans la mesure du possible, le transfert des résultats» et (**chapitre III. 1**) que «des procédures opératoires doivent être techniquement validées afin d'assurer la qualité des résultats » [22].

Le GBEA Marocain [22] est prévu par l'article 55 de la loi N° 12-01, publié dans le Bulletin Officiel N° 5892 -11 hijab 1431 (18-11-2010). Son application a pris effet, logiquement dès novembre 2010 [23].

2. La norme ISO NF 9001 Version 2008

La norme ISO 9001:2008 est l'une des plus connues. Elle est mise en œuvre par plus de 800000 entreprises dans 162 pays. Elle est devenue la référence internationale des exigences en matière de management de la qualité dans les relations interentreprises. La norme ISO 9001 aide les entreprises de tout type et de toute taille à «manager la qualité».

Cette norme est désormais reconnue mondialement comme la «norme générique des systèmes de management de la qualité». Elle peut s'appliquer à n'importe quel type d'entreprise, petite ou grande, quelle que soit son activité, ses produits ou ses services.

Les termes «systèmes de management» font référence à la structure mise en œuvre par l'entreprise pour gérer ses processus ou ses activités commerciales. Cette structure transforme l'apport de ressources en un produit ou un service satisfaisant les

objectifs commerciaux de l'entreprise, conforme aux exigences de qualité du client et conforme aux réglementations.

La norme fournit le cadre des conditions de management requises pour satisfaire le client, pour définir une approche de management et pour favoriser l'amélioration continue des performances.

La norme ISO 9001 est basée sur des principes de management qui peuvent servir de cadre aux dirigeants des entreprises pour favoriser l'amélioration des performances.

Dans la version 2008, les exigences sont regroupées en six chapitres [24].

C'est au chapitre **7.1 (Planification de la réalisation du produit)** que l'on retrouve les exigences relatives à la validation : *«...Lors de la planification de la réalisation du produit, l'organisme doit déterminer, les activités requises de vérification, validation, surveillance, mesure, contrôle et essais spécifiques au produit et les critères d'acceptation du produit ».*

Dans le chapitre **7.3.1 de la même norme (Planification de la conception et du développement)**, il est également dit que : *« L'organisme doit planifier et maîtriser la conception et le développement du produit. Lors de la planification de la conception et du développement, l'organisme doit déterminer les activités de revue, de vérification et de validation appropriées à chaque étape de la conception et du développement ».*

Le chapitre **7.3.6 (Validation de la conception et du développement)** stipule aussi que *« la vérification de la conception et du développement doit être réalisée conformément aux dispositions planifiées (voir 7.3.1) pour s'assurer que les éléments de sortie de la conception et du développement ont satisfait aux exigences des éléments d'entrée de la conception et du développement ».*

Les enregistrements des résultats de la vérification et de toutes les actions nécessaires doivent être conservés (voir 4 .2.4) ».

Les exigences sont relatives à la fois à l'organisation, à la conformité des produits ou prestations de services, au bon fonctionnement des équipements, à l'environnement.... Les axes prioritaires sont : le client, le leadership, les ressources et l'amélioration continue.

Dans le cas des laboratoires de biologie, les clients sont les médecins prescripteurs et aussi les patients. Cette norme permet d'accroître la satisfaction des clients et de démontrer que les produits sont conformes à leurs attentes et aux exigences réglementaires applicables.

Elle peut conduire de surcroît à l'obtention d'une ***certification*** résultant d'une démarche volontaire.

3. La norme ISO NF 15189

La norme internationale ISO 15189 [25] est beaucoup plus spécifique comme son nom l'indique : « Laboratoires d'analyses de biologie médicale. Exigences particulières concernant la qualité et la compétence ».

En France, la réforme de la biologie médicale, via l'ordonnance du 13 Janvier 2010, réaffirme la ***médicalisation*** de la discipline et souligne le droit de chaque patient d'accéder à une biologie médicale de qualité prouvée et payée à sa juste valeur [26].

Dans ce nouveau contexte juridique, le biologiste a un rôle médical à part entière et réaffirme son rôle dans le parcours du patient. En liaison avec le médecin clinicien, le biologiste devient responsable de la totalité de l'acte médical appelé dorénavant ***examen*** de biologie médicale [26]. L'ordonnance institue un ***régime d'accréditation obligatoire selon la norme ISO 15189*** des laboratoires de biologie médicale [26].

Actuellement, cette norme est adoptée dans le monde entier, comme seul référentiel pour *l'accréditation des laboratoires de biologie médicale*.

Elle conjugue les exigences du système qualité de la norme NF EN ISO 9001 : version 2000 et les exigences techniques propres aux analyses de biologie médicale, avec une partie « exigences relatives au management » et une partie « exigences techniques » qui prennent en compte l'ensemble de l'analyse y compris les phases pré- et post-analytiques. Son sommaire est très proche de celui de la norme NF EN ISO/CEI 17025. C'est le premier référentiel normatif spécifique qui couvre la totalité de l'activité des laboratoires de biologie médicale [27, 28].

Ses exigences techniques comptent huit chapitres :

- ✓ **1 .PERSONNEL**
- ✓ **2 .LOCAUX**
- ✓ **3. EQUIPEMENTS**
- ✓ **4. PROCEDURES PRE ANALYTIQUES**
- ✓ **5. PROCEDURES ANALYTIQUES**
- ✓ **6. MAITRISE DE LA QUALITE DES METHODES D'ANALYSE**
- ✓ **7. PROCEDURES POST ANALYTIQUES**
- ✓ **8. COMPTES RENDUS DES ANALYSES**

Dans cette norme, la validation est retrouvée dans le **chapitre 5.5.2** qui stipule: *«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 nécessaires 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. Les méthodes et les procédures sélectionnées doivent être évaluées et donner des résultats satisfaisants avant d'être utilisées pour les analyses médicales. Une revue des procédures par le directeur du laboratoire ou une personne désignée doit être réalisée à l'origine à intervalles définis. Ces revues doivent être documentées».

La première version française de la norme est parue en 2003, et la seconde édition a suivi en 2007.

C'est la seule norme aujourd'hui reconnue comme spécifique à la profession de la biologie médicale.

4. La norme ISO NF 22870 [29]

C'est une norme internationale fournissant des exigences spécifiques des analyses de biologie délocalisées destinée à être utilisée conjointement à l'ISO 15189. Les exigences de cette norme s'appliquent lorsque les analyses de biologie délocalisées sont réalisées dans un hôpital ou une clinique ou encore par un organisme de santé prodiguant des soins ambulatoires.

L'auto-test par les patients à domicile ou dans un dispensaire est exclu, mais certains éléments de la présente norme internationale peuvent s'appliquer.

Ses exigences comptent deux chapitres important:

4. EXIGENCES RELATIVE AU MANAGEMENT

5. EXIGENCES TECHNIQUES

Dans le chapitre **4.1 (Organisation et management)** il est stipulé : «*Le management des laboratoires d'analyses de biologie médicale doit planifier et élaborer les processus nécessaires pour les analyses de biologie délocalisées. Les*

éléments comme la vérification, la validation, la surveillance requises des activités spécifiques des analyses de biologie délocalisées doivent être pris en compte».

Le paragraphe **5.1.2 (a)** de cette même norme stipule **5.3.2 (b)** « *Le directeur du laboratoire, ou une personne qualifiée désignée, doit être responsable du choix des critères et de la fourniture du matériel, des matériaux et des réactifs. Les performances des réactifs, trousse et matériels doivent être **vérifiées** avant l'utilisation de routine».*

D. Conditions et démarches à suivre pour la validation des méthodes

1. Conditions de Vérification/ Validation de méthodes

La qualité du résultat d'analyse de biologie médicale dépend de nombreux facteurs dont l'un des plus déterminants est représenté par la fiabilité des techniques de mesures adoptées (instruments, analyseurs, réactifs, calibrateurs). Pour s'assurer de leur performance, des évaluations sont nécessaires, comme cela a déjà été souligné et permettent en fonction des critères définis de les valider, comme le recommande la réglementation [22, 24, 25].

En effet, les méthodes reconnues (DMDIV marqués CE ou méthodes « fournisseurs »), sont à priori validées dans leur domaine d'application. Dans le cadre des normes NF EN ISO 15189 et 22870, le LBM doit, pour ses méthodes, vérifier qu'elles sont utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent aux besoins de ses clients (patients/prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées au sein du laboratoire, il s'agit d'une (« **vérification de méthodes portée A** »). Dans ce cas, il n'est pas demandé aux laboratoires d'effectuer de nouveau la caractérisation approfondie des techniques ou des analyseurs.

Des études ont déjà été réalisées par les fabricants qui annoncent les performances de leurs méthodes. Il est demandé au LBM de procéder à une vérification lors de la mise en application, appelée vérification de performances sur site [16].

En revanche, dans le cas de la (« **validation de méthode-portée B** »), le LBM doit caractériser les critères de qualité de la méthode et la valider dès lors qu'il ne s'agit pas d'une méthode reconnue, méthode développée par le laboratoire, ou que celle –ci est employée hors de son domaine d'application (modification de la prise d'essai/milieu biologique...).




Le biologiste doit alors s'appuyer sur la documentation technique du fournisseur, il doit évaluer et apprécier ces informations à la lueur des recommandations ou des textes réglementaires, des attentes du prescripteur, des critères de performance proposés par les sociétés savantes. **Ce travail d'expertise est la base du métier de biologiste médical. [16, 30]**

Le laboratoire doit réaliser un protocole de validation lui permettant de démontrer, de vérifier que la méthode fonctionne correctement dans les conditions de laboratoire et qu'elle donne des résultats fiables pour les patients.

2. Démarche à suivre pour la Validation/ vérification des méthodes

2.1 Les étapes à suivre

La vérification/validation proprement dite comprend 3 étapes :

-  L'étude des documents bibliographiques
-  La détermination des critères de performance pertinents à établir et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes pour la méthode
-  La réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le LBM

Le choix de critères de performance (fidélité, justesse...) et les limites d'acceptabilité (seuil) pour une méthode donnée doit se faire **préalablement** à l'étude expérimentale.

Il doit refléter l'état de l'art et la pertinence clinique. Il 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 CIQ, sur des résultats de campagnes de comparaison inter laboratoires,...et sera confronté aux données du fournisseur.

Les limites d'acceptabilité choisies doivent être adaptées et notifiées pour chacun des examens réalisés et pour chacun des niveaux ; elles doivent être en adéquation avec les besoins cliniques. [16].

Concernant le choix des valeurs cibles lors de la validation de méthodes, la conférence de consensus établie en 1999 à Stockholm propose une hiérarchie de modèles applicables [31]. Les exigences cliniques figurent évidemment au sommet des possibilités à envisager. La limite de ce modèle réside dans l'hétérogénéité de besoins des prescripteurs. Un néphrologue n'a pas les mêmes attentes qu'un gynécologue concernant les performances relatives au dosage de la créatinine. Pour de trop rares analystes (HbA1c, triglycérides, cholestérol total, cholestérol LDL), il existe des conférences de consensus qui proposent des objectifs analytiques précis.

Cependant, pour la grande majorité des mesures, les laboratoires peuvent se référer à deux modèles facilement accessibles qui sont mis en exergue dans un document technique par le COFRAC [16]. Il s'agit de celui des variations biologiques (Ricos) et celui de l'état de l'art (SFBC) comparés dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Principales caractéristiques des référentiels envisageables pour la validation de techniques [32].

	Model du CV Ricos	Model du CV Valtec
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Model international ✓ Pluridisciplinaire (dont hématologie) ✓ Mise à jour régulière de la base de données ✓ Haut niveau hiérarchique selon la conférence de Stockholm 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reflète la pratique quotidienne ✓ Valeur cible concentration dépendante ✓ Rédigé en français
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Valeurs obtenues avec des effectifs trop limités (cas de certains analytes) ✓ Valeur cible concentration dépendante ✓ Pas d'objectifs pour les analytes indétectables à l'état physiologique (ex : troponine, lithium) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mise à jour à envisager (1999) ✓ Modèle franco-français ✓ Limité à la Biochimie et l'immunologie)

2.2 Protocole d'évaluation de la procédure vérification/validation

2.2.1 Référentiel

La commission de validation de techniques de la SFBC a publié un protocole de validation de techniques en 1986, complété en 1993 puis en 1999. Ce document permet la définition des normes d'acceptabilité (limites de reproductibilité de justesse et d'exactitude) pour une centaine d'analyses et des niveaux de concentrations

pertinents choisis pour correspondre le plus souvent à des niveaux de décisions médicales différentes.

L'intérêt d'un protocole rationnel et standardisé est de simplifier et d'optimiser le travail d'évaluation, d'uniformiser la présentation des données et de permettre un jugement comparatif de résultats obtenus par des évaluateurs ou des laboratoires différents. L'exploitation informatique des résultats est facilitée par l'utilisation des logiciels adaptés au protocole de validation de techniques [33].

Ce référentiel est destiné à ceux qui effectuent des évaluations de techniques pour juger de leur qualité et les valider en fonction de leur reproductibilité et de leur justesse en comparant les résultats avec ceux d'une technique choisie comme référence. Pour chaque analyte et chacun des trois niveaux de concentration des préparations de contrôle à utiliser pour une évaluation (bas, moyen, haut) des spécifications de répétabilité, de reproductibilité, de justesse (erreur systématique) et d'exactitude sont définies en suivant un protocole commun.

Ce référentiel est un outil qui doit évoluer et constitue un élément de dialogue propice au développement du partenariat entre biologistes et cliniciens, biologistes et industriels [20].

Une toute dernière version du protocole de validation élaborée par la commission de validation de techniques de la SFBC est apparue *en 2010* [17]. Elle décrit la procédure de validation et les différents modules à programmer en fonction de la stratégie adoptée (**tableau 2**).

Tableau 2 : Différents modules à programmer en fonction des stratégies à déployer [17].

Stratégie	1 : Vérification des performances	2 : Vérification rétrospective	3 : validation partielle	5 : validation méthode semi-quantitative	6 : validation méthode quantitative
Modules	Méthode quantitative Ou méthode semi-quantitative				
Module 1 : fidélité					
Répétabilité	B et E	B, R ou E	E	B et E	E
Fidélité intermédiaire	B et E	B, R ou E	E	B et E	E
Module2 : justesse					
Justesse	B et E si possible	B et R ou si possible	B et si possible	-	E si possible
Module3 : limite de détection et seuil de positivité					
Limite de détection	B ou E si intérêt	B ou R si intérêt	B et E si intérêt	-	E si intérêt
Seuil de positivité	-	-		E	-

<p>Module 4 : limites de linéarité.</p> <p>Intervalle de mesure</p> <p>Limite inférieure de quantification</p> <p>Effet dilution</p>	<p>B B ou E</p> <p>B ou E si intérêt</p>	<p>B B ou R</p> <p>B, R E si intérêt</p>	<p>E si intérêt</p> <p>E si intérêt</p> <p>B ou E si Intérêt</p>	<p>-</p> <p>B et E si intérêt</p> <p>-</p>	<p>E</p> <p>E</p> <p>B ou E si intérêt</p>
<p>Module 5 : Comparaison avec une autre méthode</p>	<p>B ou E si possible</p>	<p>R si disponible</p>	<p>B ou E si intérêt</p>	<p>B ou E si intérêt</p>	<p>B ou E si possible</p>

Tableau 2 : Différents modules à programmer en fonction des stratégies à déployer (Suite)

Stratégie	1. vérification des performances	2. vérification rétrospective	3. validation partielle	4. vérification/ validation méthode qualitative	5. validation méthode semi-quantitative	6. validation méthode quantitative
Module	Méthode quantitative ou semi-quantitative					
Module 6. Contamination inter-échantillons	B ou E si intérêt		B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	E si intérêt
Module 7. Evaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons						
Evaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons	B si intérêt	B si intérêt	B si intérêt	B si intérêt	B si intérêt	B si intérêt
Module 8. Autres critères						
Fonction de réponse	-	-	-	-	-	B et E si intérêt
Choix de la matrice			B et E si intérêt	-	-	B et E si intérêt

Spécificité analytique	B	B	B	B	B	B et E si intérêt
Sélectivité	B	B	B	B	B	B et E si intérêt
Stabilité						B et E si intérêt
-réactifs	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	E si intérêt
-étalons	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	E si intérêt
-échantillons biologiques	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	B ou E si intérêt	E si intérêt
Rendement d'extraction				-	E si besoin	E si besoin
Exactitude	B si possible	B si possible	B si possible	-	-	E si possible

E : essai à programmer ; **B** : vérification bibliographique ; **R** : données rétrospectives

2.2.2 Etapes techniques

Les étapes techniques du protocole de vérification/validation comprennent une période de familiarisation et une période d'évaluation [34].

La période d'évaluation d'une durée de 20 jours minimum, peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ces caractéristiques :

- ✓ Evaluation du module 1 : fidélité ou précision (répétabilité et reproductibilité)
- ✓ Evaluation du module 2 : justesse
- ✓ Evaluation du module 3 : limites de détection seuil de positivité
- ✓ Evaluation du module 4 : limites de linéarité
- ✓ Evaluation du module 5 : comparaison avec une autre méthode
- ✓ Evaluation du module 6 : contamination inter-échantillon
- ✓ Evaluation du module 7 : évaluation de l'influence de l'hémolyse, de la bilirubine et de la turbidité des échantillons
- ✓ Evaluation du module 8 : autres critères

Nous ne détaillerons que les modules 1, 3 et 4 qui ont été étudiés dans notre travail, pour des raisons que nous évoquerons par la suite.

■ **Evaluation du module 1 : Fidélité**

L'étude de la fidélité peut inclure :

- La répétabilité
- La fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)
- Et la reproductibilité (inter-laboratoires) : non applicable dans ce contexte.

• **Evaluation de la répétabilité**

Cette évaluation a pour objectif 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. [34]

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la notice d'utilisation du fournisseur (stratégie 1 et 2) ou au mode opératoire défini par le laboratoire (stratégies 3, 5 et 6).

Les conditions sont standardisées dans la mesure du possible : même opérateur, même instrument, même lot de réactifs, même étalonnage. Le nombre optimal de déterminations à effectuer est de 20. Il peut être réduit à 6 dans certains cas en fonction de la difficulté de mise en œuvre de certaines méthodes ou de leur coût élevé.

Il est préférable d'effectuer l'évaluation à deux niveaux de concentrations différentes. Un seul niveau peut être suffisant mais doit être justifié. Les niveaux sont choisis en fonction des zones de décision médicale [16, 17, 35].

Pour chaque niveau de concentration, la **moyenne (m)**, l'**écart-type (s)** et le **coefficient de variation (CV)** des résultats obtenus sont déterminés.

Le CV calculé est évalué par rapport au CV limite annoncée dans la notice d'utilisation (en tenant compte de l'intervalle de confiance), du dispositif produit par le fournisseur (stratégie 1 et 2).

Il peut également être comparé aux CV limites acceptables [17, 20] définis en fonction de la méthode et du contexte physiopathologique (stratégie 1, 2, 3, 5 et 6).

Dans le cas des mesures effectuées dans la même série (Série x, n=20), la dispersion des valeurs (x) autour de la moyenne (m) est estimée par le calcul de l'écart-type (s) et du CV.

$$\mathbf{m} = \sum x / n \quad \mathbf{s} = \sqrt{\sum (x-m)^2 / n-1} \quad \mathbf{CV \text{ en } \%} = (s) \times 100/m$$

Le CV ainsi calculé est une expression simplifiée de la répétabilité de la méthode en pourcentage.

• Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité intermédiaire)

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode en utilisant des échantillons identiques dans le même laboratoire et des conditions opératoires différentes (opérateur, étalonnage, lot de réactifs, etc.) pendant un intervalle de temps donné. [17, 35].

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 de patients.

Les matériaux utilisés sont soit des échantillons biologiques « anonymisés » provenant des patients (échantillons non titrés), à condition d'avoir l'assurance de leur stabilité pendant la durée de l'évaluation, soit des échantillons de contrôle (titrés ou non titrés).

Les niveaux de concentration sont choisis en fonction des zones de décision médicale et en fonction du recrutement du laboratoire. Il est préférable d'effectuer l'évaluation à au moins deux niveaux de concentrations différentes choisis dans une zone proche des seuils de décision clinique.

Si la valeur assignée est connue, ces matériaux peuvent être également utilisés pour évaluer la justesse de la méthode : moyenne des valeurs obtenues par plusieurs laboratoires ou valeur obtenue par titrage avec une méthode de référence.

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la fiche technique du fournisseur (stratégies 1 et 2) ou au mode opératoire du laboratoire (stratégies 3, 5 et 6). Les conditions opératoires (série) sont le reflet de l'utilisation habituelle de la méthode. Les résultats obtenus dans la pratique quotidienne du contrôle interne de qualité (CIQ) peuvent également être exploités (stratégie 2), les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la fiche technique du fournisseur.

L'analyse de chacun des échantillons en double dans 15 séries différentes 15 jours différents au minimum est nécessaire en privilégiant pour chaque série de façon indépendante le changement de plusieurs conditions opératoires «critiques» en fonction des conditions d'application de la méthode en routine (manipulateur, lot de réactif, lot d'étalons, etc.) [16, 17].

La moyenne (m) ; l'écart type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs obtenues pour chaque niveau de concentration au cours des 15 séries indépendamment effectuées, sont déterminés en exploitant les formules suivantes :

$$m = \sum x/n \qquad s = \sqrt{\sum (x - m)^2/n-1} \qquad CV = s/n \times 100$$

Le CV calculé est évalué par rapport au CV limite annoncé dans la notice d'utilisation (compte tenu de l'intervalle de confiance) produit par le fournisseur (stratégies 1 et 2).

Il peut également être comparé aux CV limites acceptables ou aux CV préalablement définis en fonction de la technique et du contexte physiopathologique (stratégies 3 et 6).

L'analyse statistique des résultats est enregistrée. Les conclusions de l'essai sont formulées en fonction des critères définis dans les pré-requis.

La répétabilité moyenne au cours de l'essai peut être estimée à partir des différences obtenues dans une même série pour les 2 mesures effectuées du même échantillon.

L'intervalle de confiance de l'écart type est calculé en utilisant la formule suivante :

$$ICs = s \pm t - (s/2n)$$

t = facteur fonction du nombre de degré de liberté et du risque retenu, en général 5%, défini dans la table de Student.

• **Evaluation de la reproductibilité**

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.

Les essais sont effectués en suivant la procédure d'analyse conformément aux indications de la fiche technique du fournisseur (**stratégie 1 et 2**) ou au mode opératoire du laboratoire (stratégie 3,5 et 6). Les conditions opératoires (série) sont le reflet de l'utilisation habituelle de la méthode. Les résultats obtenus dans la pratique quotidienne du contrôle interne de qualité (**CIQ**) peuvent également être exploités (stratégie 2). L'analyse de chacun des échantillons en double dans 15 séries différentes, 15 jours différents au minimum est nécessaire en privilégiant pour chaque série de façon indépendante le changement de plusieurs opérateurs «critiques» en

fonction des conditions d'application de la méthode en routine (manipulateur, lot de réactif, lot d'étalons, etc....).

Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec le calcul de la moyenne (**m**), de l'écart-type (**s**) et du coefficient de variation (**CV**) sur les valeurs expérimentales de chaque série.

▀ **Evaluation du module 3 : Limite de Détection (LOD) [16, 17, 35]**

Cette évaluation permet de connaître la valeur à partir de laquelle on peut affirmer avec un risque donné que la substance est présente dans l'échantillon, et de ne pas communiquer une valeur qui n'est pas significative sur le plan analytique.

Cette détermination ne présente un intérêt que dans le cas des marqueurs qui sont normalement non-quantifiables (troponine, hCG, PSA, après prostatectomie, etc.).

Les matériaux requis sont le Blanc de la réaction, une matrice vierge ou le calibre zéro de la gamme d'étalonnage.

La méthode la plus utilisée consiste à effectuer des mesures répétées de l'échantillon « blanc » soit dans une même série (30 mesures), soit en double dans 15 séries différentes.

Les résultats sont exprimés en signal (absorbance, aire, etc.).

La moyenne (**m**) et l'écart type (**s**) des valeurs exprimées en signal sont calculés puis l'écart-type transformé en concentration à partir du point zéro et du premier point de la gamme étalon. La limite de détection est définie pour un risque évalué à 5 % par la formule :

$$\mathbf{LOD = 3 \times S_c}$$

L'analyse statistique des résultats est enregistrée. Les conclusions de l'essai sont formulées par le biologiste médical.

Les valeurs inférieures à cette limite n'ont pas de signification biologique et doivent se traduire sur le compte rendu d'examen par « inférieur à la limite de détection » (LOD).

➤ **Evaluation du Module 4 : Limite de Quantification (LOQ) [16, 17, 35]**

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue. La limite de quantification peut aussi être calculée selon la formule suivante [16]:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_c$$

La limite de quantification peut également être évaluée à l'aide des dilutions d'un étalon ou de l'échantillon de contrôle interne de qualité le plus bas (différent de 0) avec le diluant, selon le schéma : *100 + 0 ; 90 + 10 ; ... 10 + 90 ; 0 + 100* soit 11 échantillons mesurés chacun 10 fois dans une série unique.

On calcule, pour chaque série de mesures de différentes dilutions, l'écart-type (**s**), le coefficient de variation (**CV**) et l'écart de la moyenne (**m**) à la valeur théorique (réalisation d'un profil de « précision » ou profil de fidélité).

A partir de la courbe des cv en fonction des concentrations (courbe d'Howitz), est déterminée la concentration correspondant à un CV de 10% et représentant la limite de quantification. La limite de quantification est la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient.



PARTIE PRATIQUE

I. MATERIELS ET METHODES

A. Matériels

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé l'automate Unicel DxI 600®, Access Immono-assay System, de la société Beckmann Coulter que nous allons décrire dans ce paragraphe. Il s'agit d'un automate acquis il ya deux ans et qui a fait l'objet d'une vérification approfondie par la direction du laboratoire de Biochimie et de Toxicologie HMIMV, dès sa réception.

1. Descriptif global (Figure 4)

Cet analyseur est développé pour la consolidation en un poste des activités d'immuno-analyse, pour la routine, mais aussi pour la prise en charge des urgences. Sa cadence est de **200 tests/heure**, avec un aliquotage systématique des échantillons patients afin de réduire le temps d'immobilisation des tubes dans l'analyseur [36].



Figure 4 : Auto-analyseur système UniCel DxI 600® Access Immuno-assay / Laboratoire de Biochimie/HMIMV.

2. Caractéristiques

L'automate comporte une interface utilisateurs, avec écran tactile et une aide en ligne intégrée [36].

Tableau3: Caractéristiques technologiques [36]

Principe Technologique	Protocoles et formats de Test	Réactifs
Chimiluminescence	▪ Sandwich	Packs réactifs
	▪ Compétition	Étalons
Support microparticulaire	▪ Immuno-Capture	Contrôles
		Consommable

Sa spécificité se résume en son système de chargement en continu des échantillons, des consommables sans avoir à mettre l'appareil en pause et sans intervention au niveau de l'Interface Utilisateur.

L'automate est également capable de détecter des obstructions dans plusieurs compartiments du système :

- au niveau du pipetage d'échantillon
- lors de l'aliquotage dans une cuvette échantillon
- au niveau des 2 pipettes de précision
- lors du transfert de l'échantillon d'une cuvette échantillon vers une cuvette réactionnelle
- lors du transfert du réactif du pack vers la cuvette réactionnelle
- au niveau de la première sonde d'aspiration du module de lavage

Il dispose d'un ensemble de capteurs qui vérifient la distribution correcte du substrat (détection de bulle), les niveaux de liquide (Radio Fréquence et Ultrasons), les différentes températures, les différents éléments moteurs.

3. La Conception

3.1 Module de chargement des cuvettes [36]

Brièvement, ce module se compose d'un chargeur (2 x 1000 cuvettes), dont le niveau est géré par des capteurs et autorisant un chargement sans arrêt et sans intervention au niveau de l'interface utilisateur. La distribution des cuvettes a lieu dans le module d'aliquotage.

3.2 Module de chargement des portoirs échantillons

Il possède une autonomie de 15 portoirs, avec une protection par un capot/couvercle. Les racks sont transférés devant le lecteur code-barres pour leur identification, puis dans l'aire de déchargement. Des urgences peuvent être lancées à tout instant.

3.3 Module de pipetage échantillon

La détection de niveau se fait par Radio Fréquence et celle d'obstruction par capteur de pression. Après chaque prélèvement se fait un nettoyage de la sonde. Le volume aspiré dépend du nombre de tests programmés et d'éventuels ReRun ou Test(s) Réflexe(s).

3.4 Module d'aliquotage

Il peut assurer jusqu'à 288 aliquotes qui sont conservés à + 4/10 °C. L'aliquotage du tube primaire se fait en 9 ou 18 secondes (en fonction du volume).

3.5 Stockage réactifs

Le chargement se fait sans intervention au niveau de l'interface. Sa capacité va jusqu'à 50 packs réactifs (2500 tests), conservés à 4-10 °C. L'élimination des packs vides est automatique.

3.6 Pipeteurs internes

L'automate dispose de 2 aiguilles pour un pipetage de précision, chargés de transférer l'échantillon de la cuvette échantillon à la cuvette réactionnelle et du réactif du pack à la même cuvette réactionnelle. Le mixage de l'échantillon et du réactif se fait par ultrason. Les sondes sont nettoyées entre chaque aspiration par du tampon de lavage et par ultrason.

3.7 Module analytique

Il comporte un incubateur, des stations de lavage (3) et un luminomètre qui effectue 7 mesures permettant de déterminer la valeur médiane prise en compte.

B. Méthodes

1. Principe de la Technique de dosage utilisée

Le test Access Hybritech p2PSA est un test immuno-enzymatique à deux sites (type «sandwich»). Un échantillon est déposé dans une cuvette réactionnelle avec un conjugué anticorps monoclonal de souris anti-PSA-phosphatase alcaline, des particules paramagnétiques sensibilisées avec un anticorps monoclonal de souris anti-[-2]proPSA et un réactif bloquant. Le [-2]proPSA dans l'échantillon se lie à l'anticorps monoclonal anti-[-2]proPSA immobilisé sur la phase solide alors que, en même temps, le conjugué anticorps monoclonal anti-PSA-phosphatase alcaline réagit avec des sites antigéniques différents sur la molécule de [-2]proPSA. Après incubation dans une cuvette réactionnelle, les matériels liés à la phase solide sont maintenus dans un champ magnétique tandis que les matériels non liés sont éliminés par lavage. Puis, le substrat chimio-luminescent, Lumi-Phos* 530 est ajouté à la cuvette réactionnelle et la lumière générée par la réaction est mesurée à l'aide d'un luminomètre.

La production de lumière est directement proportionnelle à la concentration de [-2] pro PSA présente dans l'échantillon. La quantité d'analyte présente dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage multipoints mise en mémoire [1, 35, 39].

2. Réactifs, contrôles et calibrateurs utilisés

➤ Réactifs : Le réactif utilisé pour le dosage c'est le p2PSA réactif (*lot N° 117972, Date de Péremption du 30/09/2012, Réf. 46238241*).

➤ Calibrant : Access Hybritech® p2PSA calibrators fournis aux concentrations *0,10, 20, 50, 100, 500 et 5000* pg/ ml (*Code A49753, Lot N° 119721, Date de Péremption du 30/09/2012*).

➤ Contrôle de qualité : Access Hybritech® p2PSA QIC₁ (*19.33±2.90* pg/ml), QIC₂ (*177±26.60* pg/ml), QIC₃ (*911.97±136.80* pg/ml) (*Code de référence A56934, lot N° 218650, Date de Péremption du 30/06/ 2013*).

3. Protocole d'évaluation

Le protocole d'évaluation s'inspire des recommandations du protocole Valtec de la SFBC [17], de celles du protocole SH-GTA O4 du COFRAC [16] et du protocole MABIOTECH [1, 35].

L'évaluation a été faite dans le cadre d'utilisation normale de l'automate selon les recommandations de bonnes pratiques de la Société Beckmann Coulter.

3.1 Echantillons analysés et prétraitement

Des échantillons de contrôle de qualité (p2PSA QIC) des niveaux bas, moyen et haut ont été conservés et utilisés pour l'étude selon les recommandations du fournisseur [1].

Les échantillons ont été manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux en suivant les précautions universelles et les bonnes pratiques de laboratoire. Cinquante (50) μ L d'échantillon suffisaient pour chaque dosage. L'unité de mesure par défaut du système pour les résultats des échantillons est le pg/ ml.

3.2 Stratégie adoptée

Dans le cadre de la vérification/validation des performances de ces nouvelles méthodes, nous avons adopté la *stratégie 1 ou portée A (Tableau 2) [17]*, relative à l'utilisation d'une méthode *DMDIV* marquée *CE*.

Elle consiste en la vérification des performances annoncées par le fournisseur 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.

Nous nous sommes ainsi intéressés aux seuls *modules 1, 3, et 4* de la stratégie adoptée, c'est à dire *la fidélité* (ou précision qui inclut la répétabilité et la fidélité intermédiaire), *la Limite de Détection* et *la Limite de Quantification*.

Nous n'avons pas pu étudier les autres modules (notamment *2, 5, 6, 7 et 8*), premièrement à cause de la non disponibilité de coffrets supplémentaires à titre gratuit, deuxièmement parce que l'étude bibliographique pourrait suffire dans ce cas de figure comme le recommandent les référentiels.

3.3 Etude de la fidélité

Pour *l'étude de la répétabilité* (imprécision intra-séries), nous avons dosé le [-2] proPSA *09 fois* dans la même série, le même jour, avec la même procédure, le même opérateur et les mêmes conditions de mesure, pour chacun des niveaux de contrôle : *bas, moyen et haut*. Nous avons respecté dans ce volet le *protocole Valtec [17]*. La

moyenne, l'Ecart-Type et le CV exprimés en pour-cent, ont été calculés à partir de **09 passages** successifs pour **chaque niveau**.

La fidélité intermédiaire a été étudiée à partir des résultats obtenus sur les spécimens de contrôles internes de **3 niveaux de concentration** dosés quotidiennement **en double** dans **15 séries** différentes pendant **deux semaines**, en faisant varier les conditions opératoires (opérateur, étalonnage, lots de réactifs, ...). L'analyse statistique est la même que celle de répétabilité. Cette évaluation a été faite par rapport aux protocoles **COFRAC [16] et Valtec [17]**.

2.4 Etude de la Limite de Détection (LOD) et de la limite de Quantification (LOQ)

Pour l'étude de la LOD, nous avons effectué des mesures **répétées, en double**, du **calibrateur zéro** et en simple du premier point de la gamme d'étalonnage, et ce **dans 15 séries différentes** comme le préconise la SFBC.

Pour l'analyse statistique, nous avons calculé la moyenne (m), l'écart-type (s) des valeurs exprimées en signal (RLU) puis transformés l'écart-type ainsi calculé en concentration à partir du point zéro et du premier point de la gamme étalon.

La LOD est définie par un risque évalué à 5 % par la formule [17]:

$$\text{LOD} = 3s$$

Pour l'évaluation de la LOQ, nous l'avons calculé en utilisant la formule suivante [13]:

$$\text{LOQ} = 10s$$

3.5 Analyse statistique

Les données ont été saisies par le logiciel Excel[®] Microsoft[®] 2007. L'exploitation statistique des résultats a été effectuée avec le même logiciel, par le calcul des CV des valeurs expérimentales de chaque série. Ces derniers seront comparés aux CV limites admissibles (Fournisseur [1], études scientifiques [35]).

3.6 Valeurs cibles des modules évalués

S'agissant d'un *paramètre biochimique nouveau*, pour lequel les chiffres des CV relatifs aux différents modules de validation technique ne sont pas disponibles dans les spécifications du protocole Valtec de la SFBC [20] ou encore de celles de Ricos [43], la comparaison des résultats obtenus pour les différents modules analysés ne peut se faire que par rapport aux études récentes se rapportant à ce domaine.

II.RESULTATS

A.Fidélité

Les résultats des modules évalués (*répétabilité et fidélité intermédiaire*), pour un intervalle de mesure allant de **0.5 à 5000** pg/mL sont présentés ci-dessous.

1. Répétabilité

Pour ce module, la moyenne (m), l'écart-type (s) et le % du coefficient de variation (%CV) étaient respectivement de **19,85 pg/ml, 0,35 pg/ml et 1,78% pour le CIQ niveau 1, de 171,29 pg/ml, 4,66 pg/ml, et 2,72% pour le CIQ niveau 2 et de 886,15 pg/ml, 22,36pg/ml et 2,52% pour le CIQ niveau 3**. Les résultats détaillés sont présentés en **Annexe 1**.

2. Fidélité intermédiaire

La moyenne (m), l'écart-type (s) et le % du coefficient de variation (%CV), pour ce module, étaient respectivement de **19,90pg/ml, 0,48pg/ml et 2,43% pour le CIQ niveau 1, de 172,75pg/ml, 5,53pg/ml et 3,20% pour le CIQ niveau 2 et de 909,35pg/ml, 34,51pg/ml et 3,80% pour le CIQ niveau 3**. Les résultats détaillés figurent en **Annexe 2**.

B.Limite de détection (LOD)

Nous avons analysé la sensibilité de la méthode de dosage du [-2] proPSA en étudiant la limite de détection (LOD) et la limite de quantification(LOQ). **L'Annexe 3** montre les résultats détaillés de la moyenne (m) et de l'Ecart-type (S_{si}). A partir de ces données, nous avons calculé la LOD selon les recommandations de la SFBC [17].

Le point zéro de la gamme est dosé en double dans **15 séries différentes**. L'écart type (S_{si}) des différences observées entre les doublets est calculé à l'aide de la formule :

$$S_{si} = \sqrt{\sum d^2 / 2n}$$

Alors $S_{si} = \sqrt{1437698 / 30} = 218,91 \text{ RLU}$

L'écart type S_{si} est transformé en concentration en pg/ ml (S_c) en fonction des valeurs moyennes observées au cours des 15 séries effectuées pour le point zéro et le premier point de la gamme (10 pg/ml= C_1) en supposant par approximation que la zone est linéaire :

Soit $LOD = 3 \times S_c$ avec

$$S_c = (C_1 - C_0) \times S_{si} / \Delta \text{ signal}$$

Où ($C_1 - C_0$) correspond à la différence obtenue entre les concentrations du premier point de gamme ($C_1=10\text{pg/mL}$) et celle du point zéro ($C_0=0 \text{ pg/mL}$).

$$S_c = (10 - 0) \times 218,91 / (21630,73 - 8464,47) = 2189,1 / 13166,26 = 0,17 \text{ pg / ml}$$

Soit $LOD = 3 \times 0,17 \text{ pg/ ml}$

$LOD = 0,5 \text{ pg/ ml}$

C.Limite de Quantification

Pour l'évaluation de la LOQ, nous avons utilisé la formule suivante :

$$LOQ = 10 \times S_c$$

Soit $LOQ = 10 \times 0,17$

$LOQ = 1,7 \text{ pg/ ml}$

D. Valeurs cibles des modules évalués (Tableaux 4, 5 et 6)

Les valeurs cibles des modules étudiés dans le présent travail sont celles du fabricant (Beckmann Coulter) [1] et des études menées sur le [-2] proPSA. Celles que nous avons pris comme référence sont l'étude de SOKOLL L.J et al. [35] qui a concerné 4 sites différents pour les modules 1, un seul site pour les modules 3 et 4 et l'étude Stephan C. et al [39].

Tableau 4: Valeurs Cibles de la Répétabilité [35]

Echantillon	Moyenne (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)			
	Etude multicentrique [35]			
	1 ^{ER} SITE	2 ^{ème} SITE	3 ^{ème} SITE	4 ^{ème} SITE
	m (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)	m (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)	m (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)	m (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)
Niveau 1	21,90 / 0,61 / 2,77	20,22 / 1,00 / 4,95	20,28 / 0,69 / 3,40	20,28 / 1,10 / 5,42
Niveau 2	201,92/4,84/2,40	190,01/4,46/2,35	184,12/3,50/1,90	180,91/8,93/4,94
Niveau 3	1124,54/28,93/2,57	990,06/21,07/2,13	967,44/16,71/1,73	970,89/36,12/3,72

**Tableau 5: Valeurs cibles de la fidélité intermédiaire
(Reproductibilité intra-laboratoire) [35]**

Echantillon	Moyenne (pg/mL)/E-T (pg/mL)/CV (%)			
	Etude multicentrique [35]			
	1 ^{ER} SITE	2 ^{ème} SITE	3 ^{ème} SITE	4 ^{ème} SITE
Niveau 1	21,90/0,40/1,80	20,22/0,39/1,93	20,28/0,71/4,49	20,28/0,44/1,80
Niveau 2	201,92/5,50/2,73	190,01/4,91/2,58	184,12/5,44/2,96	180,91/6,91/3,82
Niveau 3	1124,54/23,21/ 2,06	990,06/20,41/ 2,06	967,44/29,00/ 3,00	970,89/41,18/ 4,24

Tableau 6: Valeurs cibles de la Limite de détection (LOD) et la Limite de Quantification (LOQ) [1, 35]

Sensibilité	Concentration (pg/mL)
LOD	0,70
LOQ	3,23

III.DISCUSSION

Nous avons effectué une «vérification/validation de portée A» où les méthodes reconnues (DMDIV marqués CE ou méthodes « fournisseurs »), sont à priori validées dans leur domaine d'application.

Dans le cadre des normes NF EN ISO 15189 et 22870, le LBM doit, pour ses méthodes, vérifier qu'elles sont valides, qu'elles correspondent aux besoins de ses clients (patients/prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées au sein du laboratoire. Dans ce cas, il n'est pas demandé aux laboratoires d'effectuer de nouveau la caractérisation approfondie des techniques ou des analyseurs. Des études ont déjà été réalisées par les fabricants qui annoncent les performances de leurs méthodes. Il est demandé au LBM de procéder à une vérification lors de la mise en application, appelée vérification de performances sur site [16]. Celle-ci comporte plusieurs modules dont les plus pertinents ont été détaillés dans les parties théorique et pratique du présent travail.

A.Evaluation de la Fidélité

Elle concerne l'étude de la *fidélité ou précision*, c'est-à-dire la répétabilité et la fidélité intermédiaire sur trois niveaux de contrôle de qualité (*CIQ* 1, 2 et 3).

Cette vérification initiale doit répondre aux exigences du protocole Valtec et celles du document Cofrac, comme cela a été précisé [17]. Les résultats sont comparés aux études récemment menées sur ce paramètre et aux performances annoncées par le fournisseur dans ses documents techniques [1, 36].

1. Répétabilité

Les résultats de répétabilité sont comparés respectivement aux limites acceptables du fournisseur et des résultats d'une étude multicentrique dans le **Tableau 7**. A noter que **A** et **R** dénote respectivement *Accepté* et *Refusé*.

Pour un risque alpha préfixé 5%, nous pouvons dire que les coefficients de variation (CV) obtenus sont excellents pour l'analyte et répondent aux exigences émises par le fournisseur. Les résultats objectivés par la présente étude sont comparables à ceux obtenus par une étude multicentrique [35] ainsi que le travail de Stephan C. et ses collaborateurs [39].

Tableau 7: Comparaison des résultats de l'étude de la répétabilité (Spécimens de CIQ niveaux 1, 2 et 3) avec les spécifications du fournisseur et des études préalablement menées sur ce paramètre [35], [39].

Echantillons	CV Présent travail	CV fournisseur	CV Etudes [35]	CV Etude [39]	A/R
CIQ Niveau 1	1,78	3,08	2,77/4,95/3,40/5,42	< 6	A
CIQ Niveau 2	2,72	3,83	2,40/2,35/1,90/4,94	< 6	A
CIQ Niveau 3	2,52	3,09	2,57/2,13/1,73/3,73	< 6	A

2. Fidélité intermédiaire

Les résultats de la fidélité intermédiaire comparés aux CV annoncées par les études préalablement mentionnées ([35] et [39]) sont résumés dans le **Tableau 8**.

La colonne intitulée A/R répertorie les décisions prises en fonction du CV limite calculé au seuil de 5 %.

Tableau 8: Comparaison des résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire (Spécimens de contrôles niveaux 1, 2 et 3) avec des études [35, 39].

Echantillons	CV Présent travail	CV Etude (4 Sites) [35]	CV Etude [39]	A/R
QC1	2,43	1,80/1,93/4,49/1,80	< 8	A
QC2	3,20	2,73/2,58/2,96/3,82	< 8	A
QC3	3,80	2,06/2,06/3,00/4,24	< 8	A

Les coefficients de variation (CV) obtenus pour l'étude de la fidélité intermédiaire sont satisfaisants dans l'ensemble. Ces résultats semblent concordants avec ceux d'autres travaux [35, 39].

B.Evaluation de la Sensibilité

1. Limite de Détection

Cette évaluation permet de connaître la valeur à partir de laquelle on peut affirmer avec un risque donné que la substance est présente dans l'échantillon, et de ne pas communiquer une valeur qui n'est pas significative sur le plan analytique.

Cette détermination ne présente un intérêt que dans le cas des marqueurs qui sont normalement non-quantifiables (troponine, hCG, PSA, [-2] proPSA après prostatectomie, etc.).

Les résultats de l'étude de la Limite de Détection sont comparés, de façon significative, aux valeurs cibles d'autres travaux [35], comme l'indique le **Tableau 9**.

Tableau 9: Comparaison des résultats de l'étude de la sensibilité avec les valeurs cibles du fournisseur [1] et une autre étude [35].

Sensibilité analytique	Résultat en pg/mL	
	Dans le présent travail	Selon [1, 35]
LOD	0,50	0,70
LOQ	1,70	3,23

2. Limite de Quantification

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue (risque alpha = 5%).

Le résultat de la LOQ dans le présent travail paraît plus bas que celui d'autres travaux [1, 35] (Tableau 9). Cela semble lié aux méthodes de détermination de ce paramètre qui ne sont pas les mêmes (calcul dans la présente étude et mesure expérimentale dans les autres cas).

Mais, globalement, le test [-2]proPSA (hybritech p2PSA) présente une excellente sensibilité, comme le soulignent d'autres travaux [39].



CONCLUSION

Dans le cadre de la prise en charge du Cancer de la prostate, le [-2]proPSA apporterait un bénéfice de spécificité supérieur aux dosages existants. Sa détermination permet le calcul de l'index *phi* qui apparait au regard de toutes les études réalisées à ce jour, comme le meilleur élément prédictif du cancer de prostate pour un PSA total compris dans la zone grise (entre et 2 et 10 ng/mL selon le standard Hybritech), permettant ainsi de réduire de manière significative les indications de biopsies. Il a montré également un intérêt pour différencier au stade précoce les cancers potentiellement agressifs. Son utilisation en test de routine pourrait permettre, en augmentant les performances d'une première série de biopsies, de limiter les indications de re biopsies ainsi que d'éviter certaines biopsies inutiles.

L'intégration de ce nouveau marqueur dans la pratique du laboratoire de biochimie de l'HMIMV requiert son évaluation à la fois clinique, objet d'un autre travail en cours de réalisation, mais également et avant tout technique. C'est dans ce cadre que le présent travail s'inscrit.

En effet, la réalisation d'un dossier de validation des techniques constitue un élément important pour tout laboratoire d'analyses médicales qui souhaite répondre aux exigences des référentiels qualité. La vérification/ validation d'une méthode est une étape primordiale à réaliser au préalable avant son utilisation. Elle s'applique à plusieurs domaines comme il a été précisé dans les différents référentiels.

La présente étude montre des résultats jugés globalement satisfaisants pour les items évalués, notamment la répétabilité, la fidélité intermédiaire ainsi que la sensibilité analytique, dans les conditions normales de l'utilisation de l'automate UNICEL DXI600®, comparativement aux données du fournisseur et de la littérature.

D'autres items, certes non exigés par les protocoles de validation/vérification des méthodes, auraient pu être étudiés si les réactifs et consommable requis étaient moins coûteux pour être livrés en quantité suffisante et à titre gratuit par le fournisseur. Cela constitue la principale limite de cette étude.



RÉSUMÉ

RESUME

Titre: *Vérification de la méthode de dosage du [-2]proPSA (Hybritech p2PSA) sur le DXI 600® (Beckmann Coulter)*

Auteur : WAANA-ANG Emmanuel B. S. A

Rapporteur : Pr OUZZIF Zohra

Mots clés: Cancer de la prostate, [-2]proPSA, Vérification technique, Unicel DXI600®.

La détection précoce du cancer de la prostate, basée à ce jour, sur le dosage sanguin du PSA, marqueur diagnostique de référence, demeure un sujet très controversé. Cela a conduit à étudier de nouveaux marqueurs, notamment le **[-2] pro PSA**, dans le but d'améliorer la spécificité du PSA dans la zone grise, comprise entre **2 et 10 ng/ml**. Pour ce faire, une *évaluation analytique* de ce paramètre a été réalisée au laboratoire de biochimie. Cela consiste à *procéder à une vérification de la méthode de dosage du [-2]proPSA* et représente le principal objectif du présent travail.

Nous avons utilisé l'automate Unicel DxI 600® (société Beckmann Coulter) et le test Access Hybritech p2PSA (test immuno-enzymatique à deux sites (type «sandwich»). Le protocole d'évaluation s'inspire des recommandations du protocole Valtec de la SFBC, de celles du protocole SH-GTA O4 du COFRAC et du protocole MABIOTECH. Nous avons adopté la *stratégie 1 ou portée A* et nous sommes ainsi intéressés à l'étude de *la fidélité*, de *la Limite de Détection* et de *la Limite de Quantification*.

- **Pour la répétabilité**, le %CV pour *le CIQ1, CQ2 et CQ3* était respectivement de *1,78%, 2,72% et 2,52%*.
- **Pour la fidélité intermédiaire**, il était respectivement de *2,43%, 3,20% et 3,80%* pour *le CIQ1, CQ2 et CQ3*
- **La LOD et la LOQ** étaient respectivement de *0,5 pg/ml* et de *1,70 pg/ml*.

Globalement, les résultats étaient satisfaisants et concordait avec les données du fournisseur et de la littérature pour les modules évalués

SUMMARY

Title: *Verification procedure for Quantitative measurement of [-2] proPSA (Hybritech p2PSA) on DXI 600® (Beckmann Coulter).*

Author: *WAANA-ANG Emmanuel B.S.A*

Supervisor: *Professor OUZZIF Zohra*

Keywords: Prostate Cancer, [-2]proPSA, Technical Verification, Unicl DXI 600®

The subject of the early detection of prostate cancer is based nowadays on the quantitative measurement of PSA in the blood, marker of reference of diagnosis, remains highly controversial subject. This has led to the study of new markers especially the [-2]proPSA with the aim of increasing the specificity of PSA in the grey area of measurement falling within 2 and 10ng/ml.

In this light, an analytical evaluation of this parameter was realized in the Biochemistry laboratory of the Rabat Military hospital. This consist of a quantitative verification of the [-2]proPSA in the blood which is the principal objective of this work.

We used the Unicl DXI 600® automated machine and the Access Hybritech p2PSA assay (2-site Chemiluminescent sandwich immunoassay). The protocol for the evaluation was inspired from recommendations from *Valtec* of *SFBC*, *SH-GTA* protocol of *COFRAC* as well as the protocol of *MABIOTECH*.

We adopted the **strategy 1** also called **entry A** so we therefore placed emphasis on the study of the **Precision**, the **Detection Limit** and the **Quantitation Limit**.

- **Repeatability**, the % CV for the *CIQ1*, *CIQ2* and *CIQ3* were respectively **1.78%**, **2.72%** and **2.52%**.
- **Intermediate Precision**, the % CV was **2.43%**, **3.20%** and **3.80%** respectively for the *CIQ1*, *CIQ2* and *CIQ3*.
- **LOB and LOD** was respectively **0.5pg/ml** and **1.70pg/ml**.

Globally, the results were satisfactory and in accordance with data from the supplier and previous documentations on the modules evaluated.

ملخص

أطروحة: التحقق من طريقة مقايسة [-2] برو ب.س.أ (هبريتش ب2 ب.س.أ على د.س.أ.®) 600 بيكمان كولتر

الطالب : إيمانويل ونونغ

المشرفة: الأستاذة زهرة أوزيف

كلمات البحث: سرطان البروستات، [-2] برو ب.س.أ، التحقق التقني، انيسيل د.س.أ.®600.

الكشف المبكر عن سرطان البروستات على أساس مقايسة ل ب.س.أ بالدم كعلامة تشخيص مرجعية لازال موضوعا مثيرا للجدل، ما أدى لدراسة علامات جديدة أهمها [-2] برو ب.س.أ، لهدف تحسين خصوصية ب.س.أ في المنطقة الرمادية بين 2 و 10 نانوغرام / مل، للقيام بذلك تم إجراء تقييم تحليلي لهذه المعلمة في مختبر الكيمياء الحيوية، هذا التقييم يعتمد على إجراء تحقق من طريقة المقايسة [-2] برو ب.س.أ و يمثل الهدف الأساسي من هذه الدراسة

استعملنا آلية انيسيل د.س.أ.® 600 (بيكمان كولتر) واختبار أكسس ب2 ب.س.أ (المعايرة المناع.انزيمية في موقعين ("ساندويتش"). بروتوكول التقييم يعتمد على توصيات كل من بروتوكول فاتيك، بروتوكول أطق.ه 04 5 لكوفاك، بروتوكول مابوتش. اعتمدنا إستراتيجية 1 أو أ، ونحن مهتمون بدراسة الدقة، حد الكشف و حد التحديد الكمي.

بالنسبة للتكرار %ص.ف ل ص.إ.ك 1 ، ص.ك2 ، ص.3 على التوالي 1،78%، 2،72%

2،52

بالنسبة للدقة الوسيطة: ص.إ.ك 1 ، ص.ك2 ، ص.ك3 كانت على التوالي 2،43%، 3، 20%

3،80 وكانت ل.أ.د.ول.أ.ك على التوالي 0،5 جزء من الغرام / مل و 1.7

خاتمة: عموما النتائج كانت مرضية ومتوافقة مع معطيات الممون و معطيات دراسات أخرى

للوحدات التي تم تقييمها



ANNEXES

Annexe 1 : Résultats de l'étude de la répétabilité (spécimen de CQ niveau1, 2 et 3)

SERIES	QIC1 (niveau bas)	QIC2 (niveau moyen)	QIC3 (niveau haut)
1	20,03	165,05	905,32
2	19,58	168,36	877,61
3	20,07	173,02	929,12
4	19,98	176,3	900,17
5	19,64	175,3	877,28
6	20,3	175,08	852,04
7	19,11	169,01	884,76
8	20,02	175,14	875,19
9	19,92	164,36	873,85
n	9	9	9
m (pg/ml)	19,85	171,29	886,15
Ecart type(s)	0,35	4,66	22,36
CV %	1,78	2,72	2,52

Annexe 2: Résultats de l'étude de la Fidélité intermédiaire
(Spécimen de CIQ niveau 1, 2 et 3)

SERIES	CQ1 (Niveau bas)			CQ2 (Niveau Moyen)			CQ3 (Niveau haut)		
	B	B'	B-B'	M	M'	M-M'	H	H'	H-H'
1	19,87	19,86	0,01	177,61	177,6	0,01	953,68	953,66	0,02
2	20,41	20,42	0,01	170,91	170,92	0,01	937,85	937,87	0,02
3	19,71	19,69	0,02	166,69	166,68	0,01	940,1	940,08	0,02
4	20,03	20,05	0,02	165,05	165,06	0,01	905,32	905,33	0,01
5	19,58	19,57	0,01	168,36	168,35	0,01	877,61	877,6	0,01
6	20,07	20,09	0,02	173,02	173,03	0,01	929,12	929,13	0,01
7	19,98	19,97	0,01	176,3	176,2	0,1	900,17	900,17	0
8	19,64	19,65	0,01	175,3	175,4	0,1	877,28	877,26	0,02
9	20,3	20,30	0	169,01	169,00	0,01	852,04	852,06	0,02
10	19,11	19,1	0,01	175,14	175,17	0,03	884,76	884,75	0,01
11	20,02	20,03	0,01	164,36	164,35	0,01	875,19	875,21	0,02
12	19,92	19,91	0,01	171,41	171,42	0,01	873,85	873,83	0,02
13	19,17	19,19	0,02	177,45	177,43	0,02	933,82	933,85	0,03
14	19,6	19,5	0,1	185,49	185,49	0	929,19	929,16	0,03
15	21,08	21,09	0,01	175,08	175,09	0,01	970,26	970,3	0,04
N	30		15	30		15	30	30	15
m (pg/ml)	19,9		19,9	172,75		172,75	909,35		909,35
S	0,48		0,02	5,53		0,03	34,51		0,00
CV(%)	2,43		0,11	3,20		0,02	3,80		0,00

Annexe 3: Résultat de l'étude de la LOD

SERIES	Point zéro				Ier point 10 pg/ml
	1(RLU)	2(RLU)	d	d ²	Valeurs en RLU
1	8828	8348	480	230400	21987
2	8466	8282	184	33856	21641
3	8828	8348	480	230400	20822
4	8273	8085	188	35344	20822
5	8466	8282	184	33856	21396
6	8522	8278	244	59536	21641
7	8273	8085	188	35344	21632
8	8466	8356	110	12100	21632
9	8744	8636	108	11664	21632
10	8522	8278	244	59536	21637
11	8781	8425	356	126736	22083
12	8781	8425	356	126736	22083
13	8789	8374	415	172225	22083
14	8470	8264	206	42436	21685
15	8868	8391	477	227529	21685
n	30		15		15
m	8464,47			95846,53	21630,73
Ssi					
∑ (Somme)				1437698(d²)	



**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] **Beckman Coulter, Inc.** Access immunoassay Systems Hybritech p2PSA ref A49752; 2010.
- [2] **Haute Autorité de Santé.** Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer de la prostate. Guide Affection de Longue Durée 2012 ; N° 30.
- [3] **Fournier G, Valeri A, Cussenot O.** Cancer de la prostate. Épidémiologie. Facteurs de risques. Anatomopathologie. Annales d'urologie 2004 ; 38 : 187-206.
- [4] **Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O.** Cancer de la prostate. Diagnostic et bilan d'extension. Annales d'urologie 2004 ; 38 :207-224.
- [5] **Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, 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.
- [6] **NF EN ISO 17025.** Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais 2005.
- [7] **EL AMRI A., OUZZIF Z.** –Validation de la méthode de dosage de l'hémoglobine A1C par CLHP sur D10® Bio-Rad –Thèse de Pharmacie Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohamed V 2009 ; N°39.
- [8] **Rigollet L, Chauvelier S, Schuch G, Prigent A, Gauchez AS.** Précurseurs et dérivés du PSA : Application en clinique, revue de la littérature. Immuno Anal Biol Spe 2007; 22:1–4.

- [9] **Laurence Rigollet, Sophie Chauvelier, Géraldine Schuch, Antoine Prigent, Anne-Sophie. Gauchez,** Précurseurs et dérivés du PSA: Nouveaux marqueurs dans les Pathologies prostatiques? *Ligand Assay* 2007, 12(2).
- [10] **Gauchez A.-S.** Cancer de la prostate: les marqueurs biologiques. *Medecine Nucleaire* 2011 ; 35 : 373-377.
- [11] **Amine BENCHIKH EL FEGOUN, Arnauld VILLERS.** Les formes moléculaires du PSA. *Progrès en Urologie* 2007 ; 17, 165-171.
- [12] **Michael Peyromaurea, Yvonne Fullab, Bernard Debre, Anh Tuan Dinh-Xuan.** Pro PSA: a «pro cancer» form of PSA? *Medical Hypotheses* 2005 ; 64, 92–95.
- [13] **Guéry T, Forzy G, Bonnal J.-L.** Le Prostate Health Index (PHI) a-t-il une place dans l'arsenal du dépistage biologique du cancer de la prostate ? Étude préliminaire. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2011 ; 26 : 143-146.
- [14] **LUXINNOVATION G.I.E.** L'Agence Nationale pour la Promotion de l'Innovation et de la Recherche au Luxembourg 2008.
- [15] **Morcrette C.** **ADES:** Le diagramme d'Ishikawa 2007.
- [16] **Cofrac.** Guide Technique d'Accréditation, de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale. SH GTA 04 ; Révision 00 Avril 2011.
- [17] **Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C et les membres du sous-groupe 2 analytiques de la SFBC.** Vérification/ Validation des performances d'une méthode d'analyse. *Annales biologie clinique* 2010 ; 68 (hors série n°1) : 247-294.

- [18] Bureau international des poids et mesure (BIPM). International vocabulary of metrology- Basic and general concepts associated terms (VIM, 3 editions). JCGM 200: 2008.
- [19] **Hubert P, Nguyen- Huujj, Boulanger B, et al.** Validation de procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches-rapport d'une commission SFSTP.STP Pharma Pratiques 2003; 13 (3): partie I.
- [20] **Vassault A, Grafmeyer J, Graev R, et al.** Analyses de biologie médicale, spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. Ann. Biol Clin 1999, 57 ; 685-695.
- [21] **Pascal P, Beyerle F.** Les référentielles qualités applicables dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale. Pathologie Biologie 2006, 54 :317324
- [22] **Guide de Bonnes Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA)**, arrêté du ministre de la santé No 2598-10 du 27 Ramadan 1431 (07 septembre 2010) relatif au guide de bonne exécution des analyses de biologie, BO No 5892 -11hija 1431 (18-11-2010).
- [23] Normes techniques minima des laboratoires privés d'analyses de biologie médicale. Article 54, BO N° 5636 du premier Joumada II 1429 (05/06/2008).
- [24] **NF EN ISO 9001.** Système management de la qualité Exigences, AFNOR 2008.
- [25] **NF EN ISO 15189:** Laboratoire d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. Aout 2007

- [26] Réforme de la Biologie Médicale. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
- [27] Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des Laboratoires de Biologie Médicale.SH REF 02 Révision 00 – Septembre 2010.
- [28] **Dumontet M, Vassault A, Fuss-Ohlen I, Guitel F, Perrin A, Giroud C, Robineau S, Braconnier F, Beaudeau J-L, Le Moel G.** Recommandations pour l'installation dans le laboratoire de la fonction métrologie et de la documentation correspondante (Document B). *Ann Biol Clin* 2004, 62 : 479-86.
- [29] **NF EN ISO 22870.** Analyses de biologie délocalisée (ACBD), Exigences concernant la qualité et la compétence 2006.
- [30] **ISO 9000: 2005.** Quality management system, Fundamentals and vocabulary. Systèmes de management de la qualité. Principes essentiels et vocabulaire. Genève, ISO, 2005.
- [31] **Kallmer A, McQueen M, Heuck C .**The Stockholm Consensus Conference on quality specifications in laboratory medicine, 25-26 April 1999. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 475-6.
- [32] **Scherrer F, Boisson R.C, Charmard D, Poggi B, Grafmeyer D.** Etat de l'art et validation de techniques: Application aux performances de fidélité. *Ann Biol Clin* 2008 ; 66 : 721-5.
- [33] **Vassault A.** Procédure de validation d'une technique. *Spectra Biologie* 1997, 16, 9 : 43-50.

- [34] **Capolaghi B, Vassault A, Grafmeyer D, et al.** Le protocole Valtec: évolution du concept et du contenu. *Annales de biologie Clinique* 1997, 2 : 167-173.
- [35] **Lori J. Sokoll, Daniel W. Chan, George G. Klee, William L. Roberts, Ron H.N Van Shaik, Dorithy A. Arockiasamy, Dennis L. Broyles, Corey M. Carlson, Isaac A. Mizrahi, Tina B. Pierson, Jeffrey E. Tam.** Multi-center analytical performance evaluation of the Access Hybritech® p2PSA immunoassay. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413: 1279-1283.
- [36] **Beckmann Coulter®.** Brochure of UniCel® DxI 600 Access® Immunoassay System
- [37] **Sokoll LJ, Chan DW, Mikolajczyk SD, et al.** Proenzyme PSA for the early detection of prostate cancer in the 2.5–4.0 ng/ml total PSA range: preliminary analysis. *Urology* 2003; 61:274–6.
- [38] **Naya Y, Fritsche HA, Bhadkamkar VA, Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG, Babaian RJ.** Evaluation of precursor prostate-specific antigen isoform ratios in the detection of prostate cancer. *Urol Oncol* 2005; 23:16–21.
- [39] **Stephan C, Kahrs A-M, Cammann H, et al.** A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases. *Prostate* 2009; 69:198–207.
- [40] **Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, et al.** A prospective, multicenter, NCI EDRN study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19:1193–200.

- [41] **Guazzoni G, Lazzeri M, Nava L, et al.** Preoperative prostate-specific antigen isoform p2PSA and its derivatives, %p2PSA and Prostate Health Index, predict pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Eur Urol* 2012; 61:455–66.
- [42] **Laffin RJ, Chan DW, Tanasijevic MJ, et al.** Hybritech total and free prostate-specific antigen assays developed for the Beckman Coulter access automated chemiluminescent immunoassay system: a multicenter evaluation of analytical performance. *Clin Chem* 2011; 47:129–32.
- [43] **Ricos C, Alvarez V, Cava F et al.** Current data bases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:491-500.
- [44] Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, et al. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61:6958–63.
- [45] [Mikolajczyk SD, Marks LS, Partin AW, Rittenhouse HG. Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology* 2002; 59:797–802.
- [46] Linton HJ, Marks LS, Millar LS, Knott CL, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clin Chem* 2003; 49:253–9.
- [47] Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, Vorm O, Hoesel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res* 2001; 61:957–62.

- [48] Chan TY, Mikolajczyk SD, Lecksell K. Immunohistochemical staining of prostate cancer with monoclonal antibodies to the precursor of prostate-specific antigen. *Urology* 2003; 62:177–81.
- [49] Sokoll LJ, Chan DW, Mikolajczyk SD, et al. Proenzyme PSA for the early detection of prostate cancer in the 2.5–4.0 ng/ml total PSA range: preliminary analysis. *Urology* 2003; 61 :274-6.
- [50] Khan MA, Partin AW, Rittenhouse HG, et al. Evaluation of proprostate specific antigen for early detection of prostate cancer in men with a total prostate specific antigen range of 4.0 to 10.0 ng/ml. *J Urol* 2003;170:723–6.

PAGES WEB

- www.medwow.com/med/immunoassay-analyzer/dade-behring/dimension-rxl-maw-whm-50-60hz/31387.model-spec
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001418/>
- <http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/1220-diagnostic-et-traitement-du-cancer-de-la-prostate>
- [http://www-dep.iarc.fr\).73](http://www-dep.iarc.fr).73)
- www.BIPM.org
- <http://www.moody-certification.fr/certification-iso-9001.php>
- www.afnor.fr
- http://www.beckmancoulter.de/beckman2_media/Klinische+Diagnostik/Instrumente/Immunchemie/Immunchemiesysteme/UniCel+Dxl+Access+Immunoassay_Systeme/Brosch%C3%BCren+Dxl600/UniCel%C2%AE+Dxl+600+Access%C2%AE+Immunoassay+System_Brosch%C3%BCre+.pdf
- <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/immunoassay/unicel-dxl-600/index.htm>

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

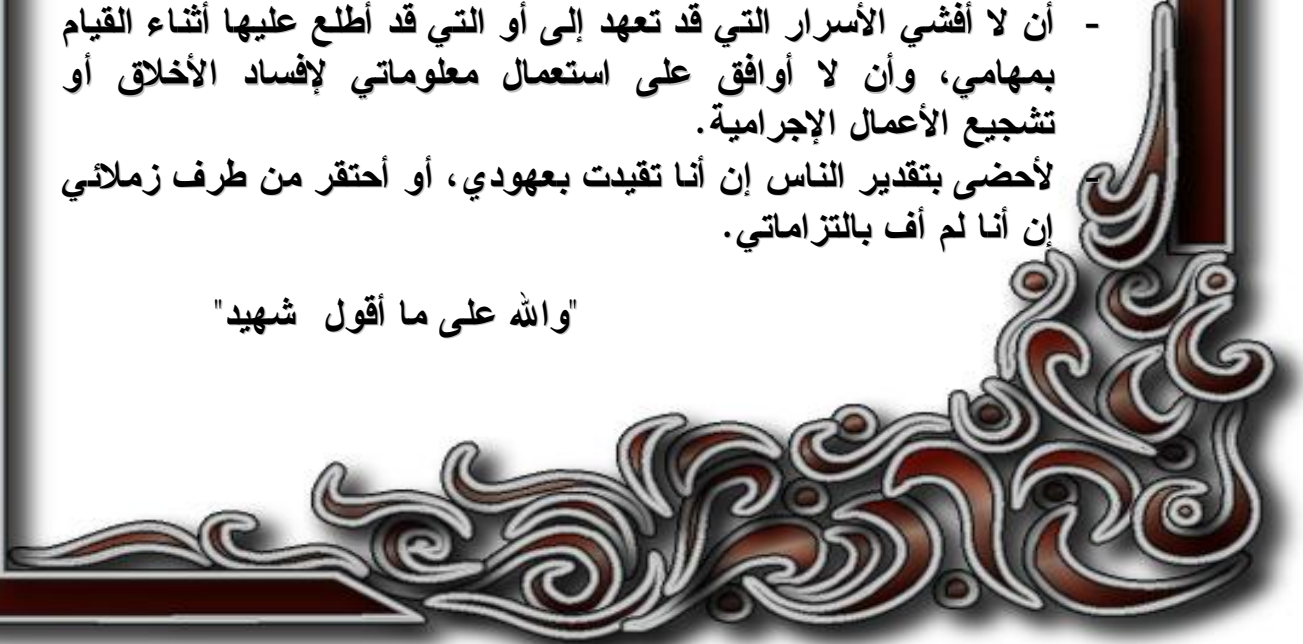
قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحسب بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيما لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



**التحقق من طريقة مقايسة [2-] برو ب.س.ا
(هبريتش ب 2 ب.س.ا على د.س.ا 600®)**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : 12 دجنبر 2012

من طرفه

السيد: إيمانويل وانا انك

المرداد في 10 غشت 1984 بالأكرا (غانا)

من المدرسة الملكية لمصلحة الصحة العسكرية - الرباط

لنبيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: سرطان البروستات - [2-] برو ب.س.ا - التحقق التقني - انيسيل د.س.ا 600®.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس	السيد: يحيى الشراح أستاذ في علم الصيدلة
مشرف	السيدة: الزهرة أوزيف أستاذة غي الكيمياء الإحيائية
أعضاء	السيد: أحمد عامر أستاذ في المسالك البولية
	السيدة: نوال الشرقاوي أستاذة مبرزة في الصيدلة الجالينوسية