



**HAL**  
open science

# Mise en place du dosage de la PTH 1-84 avec l'automate liaison XL dans le cadre de l'accréditation selon la norme NF en ISO 15189

Thibault Ferrandon

## ► To cite this version:

Thibault Ferrandon. Mise en place du dosage de la PTH 1-84 avec l'automate liaison XL dans le cadre de l'accréditation selon la norme NF en ISO 15189. Sciences du Vivant [q-bio]. 2012. hal-01732232

**HAL Id: hal-01732232**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732232v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**BIOLOGIE MÉDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

Par

**Thibault FERRANDON**

Le 26 octobre 2012

**MISE EN PLACE DU DOSAGE DE LA PTH 1-84 AVEC L'AUTOMATE LIAISON XL**  
**DANS LE CADRE DE L'ACCREDITATION SELON LA NORME NF EN ISO 15189**

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10  
septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE**  
**DOCTEUR EN MÉDECINE**

**Examineurs de la thèse :**

Monsieur le Professeur J-L. OLIVIER		Président
Madame le Professeur C. FINANCE	}	
Madame le Professeur D. HESTIN	}	Juges
Madame le Docteur B. DOUSSET	}	

# UNIVERSITÉ DE LORRAINE

## FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

**Président de l'Université de Lorraine : Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE**

**Vice Doyen « Pédagogie » : Professeur Karine ANGIOI**  
**Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD**  
**Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ**  
**Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN**  
**Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT**

### Assesseurs :

- 1 <sup>er</sup> Cycle :	Professeur Bruno CHENUÉL
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »	M. Christophe NÉMOS
- 2 <sup>ème</sup> Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 <sup>ème</sup> Cycle :	
« DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques »	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
« DES Spécialité Médecine Générale	Professeur Paolo DI PATRIZIO
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Commission de Prospective :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
<b>Assesseurs Relations Internationales</b>	Professeur Jacques HUBERT

### DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX  
Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

### PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY  
Patrick BOISSEL - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET -  
Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre  
DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard  
DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD  
Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET  
Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES -  
Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS  
Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ – Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-  
VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert  
PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL  
Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER  
Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET  
Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ  
Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

### PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

#### 42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anatomie*)  
Professeur Gilles GROSDIDIER  
Professeur Marc BRAUN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Professeur Bernard FOLIGUET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)**

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeur Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUUEL – Professeur Christian BEYAERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie Cellulaire)**

Professeur Ali DALLLOUL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)**

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeur Evelyne SCHVOERER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)**

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine et santé au travail)**

Professeur Christophe PARIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)**

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Professeur Pierre BORDIGONI - Professeur Pierre FEUGIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Gérard AUDIBERT – Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeur Marie-Reine LOSSER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)**

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Neurologie)**

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE  
Professeur Luc TAILLANDIER – Professeur Louis MAILLARD

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Neurochirurgie)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN  
Professeur Thierry CIVIT – Professeur Sophie COLNAT-COULBOIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)**

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)**

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**

Professeur Jean PAYSANT

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLÉ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)**

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénérologie)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE et VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pneumologie ; addictologie)**

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cardiologie)**

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIÈRE – Professeur Nicolas SADOUL  
Professeur Christian de CHILLOU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)**

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)**

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**

Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)**

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Christine PERRET-GUILLAUME

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER

Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)**

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)**

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeur Cécile PARIETTI-WINKLER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Ophthalmologie*)**

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)**

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON – Professeur Muriel BRIX

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**61<sup>ème</sup> Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Professeur Walter BLONDEL

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Professeur Jean-Marc BOIVIN

=====

**PROFESSEUR ASSOCIÉ**

**Médecine Générale**

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anatomie*)**

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteur Manuela PEREZ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cytologie et histologie*)**

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)**

Docteur Aude BRESSENOT

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)**

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)**

Docteur Damien MANDRY

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)**

Docteur Sophie FREMONT - Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Physiologie*)**

Docteur Mathias POUSSEL – Docteur Silvia VARECHOVA

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Biologie Cellulaire*)**

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)**

Docteur Véronique VENARD – Docteur Hélène JEULIN – Docteur Corentine ALAUZET

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)**

Madame Marie MACHOUART

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

**2<sup>ème</sup> sous-section (Médecine et Santé au Travail)**

Docteur Isabelle THAON

**3<sup>ème</sup> sous-section (Médecine légale et droit de la santé)**

Docteur Laurent MARTRILLE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Docteur Nicolas JAY

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))**

Docteur Lina BOLOTINE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)**

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Docteur Anne-Christine RAT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénérologie)**

Docteur Anne-Claire BURSZTEJN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Docteur Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE**

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

Docteur Stéphane ZUILY

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)**

Docteur Laure JOLY

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,  
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**3<sup>ème</sup> sous-section :**

Docteur Olivier MOREL

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)**

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

**MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Docteur Elisabeth STEYER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**5<sup>ème</sup> section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE**

Monsieur Vincent LHUILLIER

**19<sup>ème</sup> section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE**

Madame Joëlle KIVITS

**40<sup>ème</sup> section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

Monsieur Jean-François COLLIN

**60<sup>ème</sup> section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE**

Monsieur Alain DURAND

**61<sup>ème</sup> section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Monsieur Jean REBSTOCK

**64<sup>ème</sup> section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Mr Nick RAMALANJAONA

**65<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA

Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

**66<sup>ème</sup> section : PHYSIOLOGIE**

Monsieur Nguyen TRAN

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

**Médecine Générale**

Docteur Sophie SIEGRIST

Docteur Arnaud MASSON

Docteur Pascal BOUCHE

=====

**PROFESSEURS ÉMÉRITES**

Professeur Jean-Marie ANDRÉ - Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE

Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL - Professeur Michel BOULANGÉ

Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ

Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Michèle KESSLER - Professeur Henri LAMBERT

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL

Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT

Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT

Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET

**DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Norman SHUMWAY (1972)  
*Université de Stanford, Californie (U.S.A)*  
Professeur Paul MICHELSEN (1979)  
*Université Catholique, Louvain (Belgique)*  
Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*

Harry J. BUNCKE (1989)  
*Université de Californie, San Francisco (U.S.A)*  
Professeur Daniel G. BICHET (2001)  
*Université de Montréal (Canada)*  
Professeur Brian BURCHELL (2007)  
*Université de Dundee (Royaume Uni)*

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Centre Universitaire de Formation et de  
Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô  
Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*  
Professeur Marc LEVENSTON (2005)  
*Institute of Technology, Atlanta (USA)*  
Professeur David ALPERS (2011)  
*Université de Washington (USA)*  
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)  
*Université de WUHAN (CHINE)*

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)  
*Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)*

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS  
(1996)  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*

Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)*

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto  
(JAPON)*

**À Monsieur le Professeur Jean-Luc OLIVIER**

*Professeur de Biochimie et de Biologie Moléculaire*

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Je suis très reconnaissant de l'aide que vous m'avez apporté en me confiant ce travail.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon plus grand respect.

**À Madame le Professeur Chantal FINANCE**

*Professeur de Virologie*

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de mon très grand respect et l'expression de mes remerciements sincères.

**À Madame le Professeur Dominique HESTIN**

*Professeur de Néphrologie*

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Permettez-nous au travers de ce travail de vous témoigner notre profonde considération.

**À Madame le Docteur Brigitte DOUSSET**

*Praticien hospitalier*

Je vous remercie pour votre aide précieuse, votre patience et votre implication en tant que directrice de thèse. Merci pour tous les précieux conseils que vous m'avez prodigué tout au long de ce travail. Vous m'avez accueilli en me transmettant votre savoir impressionnant avec beaucoup de dynamisme, de passion et surtout une grande disponibilité !

Je vous remercie de l'honneur que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de toute mon admiration quant à votre rigueur scientifique et votre professionnalisme.

Permettez-nous au travers de ce travail de vous témoigner notre profonde considération et notre sincère respect.

Au laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Central du CHU de Nancy, je vous remercie pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté.

Au service de Biologie de la Reproduction du Pr Catherine Poirot, le sujet n'est plus mais j'ai énormément appris auprès de vous et je vous en remercie.

Ainsi qu'à tous les services dans lesquels je suis passé et qui m'ont accueilli durant ces quatre années d'internat avec beaucoup de sympathie et de savoir. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir fait partager vos connaissances et votre expérience. Apprendre à vos côtés a été un réel plaisir. Je garderai un excellent souvenir de mes stages dans vos services.

À l'ensemble du personnel du laboratoire BIOLAM, plus particulièrement Franck, Anne, Jacques, Jean, et Denis, que je remercie pour leur patience ainsi que leur accueil au sein de leurs laboratoires.

À ma famille,

À Margaux, ça y est ! Le cap est franchi ! On va pouvoir s'occuper de nous... et bien sûr, tu es la plus belle, la meilleure et la plus intelligente des femmes du Monde :)

À mes parents, qui se sont toujours dépassés pour nous apporter le meilleur, merci pour votre inconditionnel soutien qui m'a permis d'en être là aujourd'hui...

À mes grands-parents,

Mitsou, je te remercie pour ta gentillesse, ton regard à la fois discret et admiratif...

Grand-père, pour m'avoir donné l'envie et le goût pour la médecine...

Papy & Mamée, pour tous les délicieux moments passés ensemble, je ne vous oublierai jamais !

À mes frères,

Alexandre, je te passe le flambeau, à toi de jouer maintenant ! Je te souhaite de réussir brillamment.

Edouard & Pauline, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité...

Claude & Marie-France, Virginie & Christian, Jean & Dominique, Antoine & Juliette, Maud & Vincent... On se voit peu souvent, pour des occasions bien particulières, mais je pense souvent à vous !

À ma belle-famille,

Carole, merci de m'avoir soutenu et accueilli comme si j'étais l'un des vôtres, merci également pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir !

Luc, merci pour ta gentillesse, ton accueil, tes bons tuyaux ! Merci également de sponsoriser ce pot de thèse !

Clovis, Anthony, Vincent, Caro, Fred & les nains, merci à vous tous pour votre gentillesse, votre soutien, et tous ces instants agréables ici et là...

Anne-Marie, Lucette, merci à toutes les deux pour votre gentillesse et votre accueil... Le best-of doudou c'est moi !

À mes amis,

Côme & Fanny, Laurent & Alice, chaque retrouvaille est un plaisir immense, elles vont pouvoir être plus nombreuses à présent !

Marion & Gauthier, vivement l'été prochain ! Le bouquet, tu ne l'as pas attrapé pour rien Marion ! Et Gauthier, bientôt le ski mon ami !

Anne-Ca & Manu, Romu & Audrey, Camille, JB, Damien, PP, mes compères de route ! Amis de toujours !

Bert, je souhaite une longue vie à notre nouvelle cantine !

Cab, à quand le prochain moonwalk en chaussures de ski ?!

Matthieu, zefhoifhazoeifh !

Antoine, tu as fait le Mont-Blanc sans moi, à nous l'Everest !

Mes potes du vélo, Emilien, Brice et les vététistes du Team Galactique !

Mes co-internes, Mickael, XPV, Gaëlle, Christelle, Leila, Thomas, Gueric, Mathieu, Jean-François, Olivier, merci pour l'intérêt sincère que vous avez porté à mon parcours...

Clément P, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui...

Sans oublier Milka et Ginette !

Et bien entendu à tous ceux que j'ai malheureusement pu oublier... Si vous pensiez que votre nom aurait du y être, c'est qu'il aurait dû... Merci à vous aussi !

## SERMENT

*"Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés. J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque".*

## **Liste des abréviations et acronymes**

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

BIPM : Bureau International des Poids et Mesures

CaSR : Ca-Sensing Receptor

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CV : Coefficient de Variation

DMO : Densité Minérale Osseuse

EEQ : évaluation externe de la qualité

IL : Interleukines

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

KDIGO : Kidney Disease : Improving Global Outcomes

KDOQI : *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*

KO : Knock-Out

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

m : moyenne

ODR : Ostéodystrophie Rénale

OPG : Ostéoprotégérine

PTH : Parathormone

PTHR1 : Récepteur PTH1

PTHrP : Parathyroid Hormone-related Proteine

RANK : Receptor Activating NF Kappa B

RANK-L : Receptor Activating NF Kappa B-Ligand

s : écart-type

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

SNC : Système Nerveux Central

TA : Température Ambiante

TNF : Tumor Necrosis Factor

## **Table des tableaux**

Tableau n°1 : Signes cliniques d'hyper et d'hypocalcémie

Tableau n°2 : Chronologie des principales avancées sur la PTH

Tableau n°3 : Localisations tissulaires et fonctions du CaSR

Tableau n°4 : Formes circulantes de PTH, leurs différentes dénominations et leur reconnaissance en fonction du type de dosage utilisé

Tableau n°5 : Avantages et inconvénients en fonction du type de tube utilisé pour le dosage de la PTH

Tableau n°6 : Conditions pré-analytiques préconisées selon les fabricants des principaux kits de dosages disponibles en France

Tableau n°7 : Raccordement métrologique (rapport Afssaps 2009)

Tableau n°8 : Principales caractéristiques des trousse de parathormone disponibles en France en 2012

Tableau n°9 : Éléments de vérification à fournir selon la portée choisie (SH GTA 04)

Tableau n°10 : Caractéristiques principales des dosages de PTH utilisés au laboratoire

Tableau n°11 : Valeurs de PTH 1-84 obtenues (pg/mL) pour les 3 pools de sérum lors de l'étude de la répétabilité

Tableau n°12 : Valeurs obtenues (pg/mL) pour les 2 CIQ lors de l'étude de la reproductibilité

Tableau n°13 : Valeurs obtenues pour le calcul de la contamination inter-échantillons

Tableau n°14 : Valeurs obtenues pour l'étude de la stabilité des échantillons à différentes températures

Tableau n°15 : Valeurs obtenues pour l'étude de la stabilité des échantillons conservés à - 20°C

Tableau n°16 : Valeurs obtenues lors de la comparaison de la méthode de dosage PTH Intact (Dxi 800, Beckman Coulter) et le dosage PTH 1-84 (Liaison XL, DiaSorin)

Tableau n°17: Répartition des valeurs en fonction de la méthode de dosage et de l'intervalle de référence fourni par le fabricant

Tableau n°18 : Répartition des valeurs en fonction de la méthode de dosage et des valeurs cibles recommandées par le KDIGO

Tableau n°19 : Valeurs de répétabilité présentées par le fabricant dans la notice d'utilisation (référence 310630)

Tableau n°20 : Répétabilité escomptée selon le niveau de dosage fournie par le fabricant

Tableau n°21 : Synthèse des valeurs obtenues au laboratoire lors de l'évaluation de la répétabilité ainsi que des recommandations (fournisseur et littérature)

Tableau n°22 : Valeurs de reproductibilité présentées par le fabricant dans la notice d'utilisation (référence 310630)

Tableau n°23 : Reproductibilité escomptée selon le niveau de dosage fournie par le fabricant

Tableau n°24 : Synthèse des valeurs obtenues au laboratoire lors de l'évaluation de la reproductibilité ainsi que des recommandations (fournisseur et littérature)

Tableau n°25 : Valeurs limites fournies à titre indicatif (DiaSorin : dosage Liaison 1-84 PTH, référence 310630)

## **Table des figures**

Figure n°1 : Démarche d'exploration biologique d'une hypercalcémie

Figure n°2 : Démarche d'exploration biologique d'une hypocalcémie

Figure n°3 : Schéma des principaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie du métabolisme phosphocalcique

Figure n°4 : Schéma du remodelage osseux

Figure n°5 : Interaction OPG/RANK-L/RANK

Figure n°6 : Régulation du système OPG/RANK-L/RANK

Figure n°7 : Différentes formes circulantes de FGF23

Figure n°8 : Régulation et actions du FGF23

Figure n°9 : FGF23 et métabolisme phosphocalcique

Figure n°10 : Séquence complète en acides aminés de la PTH humaine et comparaison avec les molécules de PTH bovine et porcine

Figure n° 11 : Structure de la préparathormone (prépro-PTH)

Figure n°12 : Schéma illustrant les différentes étapes de la synthèse de la PTH dans les cellules principales des glandes parathyroïdes

Figure n°13 : Schéma du Récepteur au calcium – CaSR

Figure n°14 : Schéma représentant le métabolisme périphérique de la PTH

Figure n°15 : Nouveau concept d'activité de la PTH selon D'Amour

Figure n°16 : Représentation schématique des effets biologiques résultants de l'activation des récepteurs PTH1R et PTHR-C-terminal

Figure n°17 : Variations des formes moléculaires circulantes de la PTH chez les sujets sains et les sujets insuffisants rénaux

Figure n°18 : Fragments de PTH reconnus en fonction de la technique de dosage utilisée et des épitopes reconnus

Figure n°19 : Formes circulantes de PTH en fonction du type de pathologie parathyroïdienne

Figure n°20 : Représentation schématique du récepteur de type 1 de la PTH

Figure n°21 : Représentation schématique de la liaison de la PTH à son récepteur

Figure n°22 : Schéma des actions de la PTH sur les organes cibles

Figure n°23 : Schéma récapitulatif de la synthèse et des actions de la PTH

Figure n°24 : Protocole de travail de l'étude de Parent et Souberbielle

Figure n°25 : Stabilité des échantillons selon le type de tube, la température et la durée de conservation (étude de Gao)

Figure n°26 : Principe du dosage de 1<sup>ère</sup> génération

Figure n°27 : Épitope reconnu par les techniques de 1<sup>ère</sup> génération

Figure n°28 : Principe de la méthode de dosage de la PTH de « 2<sup>ème</sup> génération »

Figure n°29 : Sites de capture et de révélation pour les dosages de 2<sup>ème</sup> génération, exemple de la méthode « Allegro » (société Nichols)

Figure n°30 : Principe des dosages de la PTH dits de 3<sup>ème</sup> génération

Figure n°31 : Illustration d'Ac hétérophile interférant avec la méthode de dosage de la PTH et conduisant à un résultat faussement élevé

Figure n°32 : Méthodes de dosage reconnaissant les 4 formes moléculaires de la PTH les plus fréquentes

Figure n°33 : Type de PTH reconnu en fonction de la technique de dosage utilisée

Figure n°34 : Représentation graphique de la dispersion des valeurs obtenues lors de l'évaluation de la répétabilité

Figure n°35 : Représentation graphique de la dispersion des valeurs obtenues lors de l'évaluation de la reproductibilité des CIQ

Figure n°36 : Corrélation entre les 2 méthodes, tubes à température ambiante (TA) pour le transport (y) par rapport aux tubes à + 4°C (x)

Figure n°37 : Diagramme des différences (TA - 4°C) en fonction de la moyenne des valeurs selon la représentation de Bland-Altman

Figures n°38 et 39 : Représentations graphiques des pourcentages d'écart entre les valeurs obtenues à J0 et à J+2 mois lors de la congélation des aliquotes à - 20°C

Figure n°40 : Diagramme des différences (J2 - J0) en fonction de la moyenne des valeurs selon la représentation de Bland-Altman

Figure n°41 : Classement des patients par rapport aux différentes valeurs cibles

Figure n°42 : Représentation graphique de la droite de régression linéaire entre la technique de référence (X : Dxi 800) et la nouvelle technique (Y : Liaison XL)

Figure n°43 : Représentation graphique selon la méthode de Bland et Altman des différences entre les méthodes en fonction de la moyenne des valeurs

Figure n°44 et 45 : Stabilité de la PTH évaluée avec les réactifs PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison (DiaSorin) en fonction des modalités de recueil et de conservation des échantillons sanguins

Figure n°46 : Régression linéaire entre des concentrations de PTH, évaluées chez des patients ayant une IRC traitée par hémodialyse, avec les réactifs DiaSorin PTH Intact et PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison

Figure n°47 : Classification KDIGO des patients ayant une IRC traitée par hémodialyse à partir des concentrations de PTH évaluées avec les réactifs DiaSorin PTH Intact et PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison

## **Liste des annexes**

Annexe 1 : Exemple de courbe de calibration avec l'automate Liaison XL

Annexe 2 : Exemple de courbe de calibration avec l'automate Dxi 800

Annexe 3 : Fiche du manuel de prélèvement pour le dosage de la PTH

## Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Métabolisme phosphocalcique .....</b>	<b>29</b>
1.1.1. Calcium.....	29
1.1.2. Phosphore .....	33
1.1.3. Système de régulation : hormones et vitamines .....	36
1.1.4. Système de régulation : OPG/RANK-L/RANK.....	39
1.1.5. Système de régulation : axe FGF23 – Protéine Klotho.....	42
1.1.6 Autres systèmes de régulation .....	47
<b>1.2 La parathormone (PTH) .....</b>	<b>48</b>
1.2.1 Historique (Tableau n°2) .....	48
1.2.2 Structure et synthèse.....	50
1.2.3 Métabolisme .....	56
1.2.4 Récepteurs de la PTH.....	66
1.2.5 Actions.....	68
1.2.6 Indications du dosage .....	71
<b>1.3 Méthodes de dosage .....</b>	<b>75</b>
1.3.1 Conditions pré-analytiques : tubes et température de transport .....	76
1.3.2 Standards internationaux .....	84
1.3.3 Dosages de 1 <sup>ère</sup> génération.....	86
1.3.4 Dosages de 2 <sup>ème</sup> génération.....	89
1.3.5 Dosages de 3 <sup>ème</sup> génération.....	94
1.3.6 Polémique 2 <sup>ème</sup> /3 <sup>ème</sup> génération .....	96
1.3.7 Interférences de dosage de la PTH .....	97
<b>Installation de la PTH 1-84 sur automate Liaison XL .....</b>	<b>102</b>
<b>2.1 Objectif : Accréditation .....</b>	<b>103</b>
2.1.1 Contexte .....	103
2.1.2 Portées A/B .....	104
2.1.3 Le dossier de validation de méthode .....	105
<b>2.2. Matériels et méthodes .....</b>	<b>107</b>
2.2.1 Choix des tubes.....	107

2.2.2 Phase pré-analytique.....	108
2.2.3 Méthodes de dosage.....	109
2.2.4 Conservation des échantillons après dosages.....	113
2.2.5 Étude de la répétabilité.....	113
2.2.6 Étude de la reproductibilité.....	114
2.2.7 Étude de la contamination inter-échantillons .....	115
2.2.8 Étude de la stabilité des échantillons avant analyse .....	116
2.2.9 Étude de la stabilité des échantillons après conservation pendant 2 mois à - 20°C .....	117
2.2.10 Comparaison de deux méthodes de dosage .....	119
2.2.11 Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure.....	119
<b>2.3. Résultats .....</b>	<b>121</b>
<b>2.4. Discussion.....</b>	<b>140</b>
2.4.1 Étape pré-analytique .....	141
2.4.2 Étape analytique .....	149
2.4.3 Étape post-analytique.....	164
<b>2.5 Conclusion .....</b>	<b>165</b>
<b><u>Annexes.....</u></b>	<b><u>170</u></b>
<b><u>Références bibliographiques.....</u></b>	<b><u>174</u></b>

## **INTRODUCTION**

## **Introduction**

L'hormone parathyroïdienne ou PTH joue un rôle capital dans la régulation du métabolisme phosphocalcique et de ce fait son dosage sanguin est utile pour contribuer à établir le diagnostic étiologique et le suivi thérapeutique des anomalies du métabolisme phosphocalcique (hypocalcémie ou hypercalcémie).

En fait, la quasi-totalité des prescriptions du dosage concerne deux types de pathologies :

- la pathologie rénale : l'évaluation des concentrations sanguines de PTH demandée de manière systématique dans le bilan de l'insuffisance rénale chronique traitée ou non par dialyse et/ou par transplantation rénale
- l'ostéoporose : dans ce cas cette prescription fait partie du bilan complémentaire demandé uniquement en seconde intention.

L'évolution constante des connaissances et des techniques de dosage de cette hormone depuis les années soixante a fait un large l'objet de nombreux travaux.

La découverte de la présence dans le sang de nombreux fragments en plus de la molécule de PTH intacte a contribué à approfondir les connaissances sur le métabolisme et la physiopathologie de la PTH et d'autre part à proposer des techniques de dosage spécifiques des formes de PTH ayant une signification clinique.

C'est ainsi que les méthodes de dosage ont évolué de la 1<sup>ère</sup> génération, dosant toutes les formes de PTH circulantes, à la 2<sup>ème</sup> génération, ne reconnaissant plus les larges fragments C-terminaux non actifs biologiquement. Tout récemment, une technique dite de 3<sup>ème</sup> génération, spécifique de la PTH 1-84 grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les quatre premiers acides aminés de la parathormone a été proposée par des fabricants de réactifs commercialisés en France et mise en place au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Hôpital central du CHU de Nancy.

La première partie de ce travail comprend d'une part les rappels sur le métabolisme phosphocalcique et les systèmes de régulation mis en évidence au cours de ces

dernières années (système RANK-RANKL ET OPG, axe FGF 23 et protéine Klotho) et d'autre part la PTH et ses méthodes de dosage.

Dans la seconde partie est présenté le travail effectué pour le dosage sanguin de la PTH 1-84 dans le cadre de la préparation du dossier d'accréditation de cette analyse. Les différentes étapes nécessaires à la vérification d'une méthode pour déterminer son aptitude à satisfaire des exigences analytiques ont été réalisées en suivant les recommandations du guide technique d'accréditation relatif à la vérification de méthode en biologie médicale (référence SH GTA 04 du COFRAC).

## **PREMIÈRE PARTIE**

## **1.1. Métabolisme phosphocalcique**

Les métabolismes du calcium et du phosphore sont étroitement liés, jouant un rôle très important dans la constitution, la structure et le turn-over du tissu osseux où ils sont stockés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite mais ils possèdent également des fonctions propres.

### **1.1.1. Calcium**

L'organisme contient environ 1 kg de calcium (pour un poids moyen de 70 kg) dont la répartition est la suivante : 99 % dans le tissu osseux, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite pour 85 % et de carbonate de calcium pour 15 %, et 1 % en dehors de l'os mais qui joue un rôle majeur.

Dans le plasma, le calcium est présent sous différentes formes :

- 40 à 45 % est lié à des protéines, essentiellement l'albumine
- 5 à 10 % est sous forme complexée, liée des anions
- environ 50 % est sous forme ionisée.

Ces deux dernières formes correspondent à la fraction ultrafiltrable du calcium.

La calcémie ionisée est hautement régulée et maintenue dans des limites étroites (concentration entre 1,15 et 1,30 mmol/L à pH 7,40). Donc une variation même minime de sa concentration peut entraîner des dérèglements importants de ses fonctions. Pour des raisons pré-analytiques et analytiques, c'est généralement le calcium total qui est dosé et une formule (prenant en compte pH et albuminémie) permet de corriger la valeur obtenue pour refléter au mieux la valeur du calcium ionisé.

La concentration plasmatique en calcium (calcium total) est comprise entre 2,2 et 2,6 mmol/L chez l'adulte.

Les apports nutritionnels conseillés (ANC) sont variables en fonction de l'âge et du sexe mais sont globalement compris entre 1000 et 1200 mg/j (les besoins sont plus élevés chez l'adolescent, la femme enceinte et la femme ménopausée).

### ***Absorption intestinale***

Elle concerne entre 20 et 60% du calcium provenant de l'alimentation et a lieu principalement au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon (1).

Elle fait intervenir deux mécanismes :

- une diffusion passive paracellulaire, non régulée, non saturable, due à un gradient de concentration entre les entérocytes et le plasma ; ce type de diffusion prédomine lorsque les apports calciques sont élevés. Une inversion du flux peut se voir notamment dans les diarrhées osmotiques (l'eau et les substances osmotiquement actives entraînant le calcium).
- un transport actif vitamine D dépendant, saturable, prédominant lorsque les apports sont faibles.

Sa régulation implique :

- la 1-25(OH)<sub>2</sub> vitamine D3 : par son activité génomique elle va intervenir sur la synthèse de protéines (calbindines et pompes à Ca<sup>2+</sup>) impliquées dans le transport du calcium au niveau de l'entérocyte mais va également favoriser le flux intracellulaire du calcium.
- le calcium ionisé lui même qui va réguler la synthèse de 1-25(OH)<sub>2</sub> vitamine D3 via un rétrocontrôle négatif sur la production de PTH (boucle Ca<sup>2+</sup>-PTH-1 a hydroxylase) et également en stimulant directement la synthèse de 1 a hydroxylase en cas d'hypocalcémie.

### ***Dans le tissu osseux***

Il existe des échanges entre le tissu osseux et le calcium ionisé plasmatique intervenant dans l'homéostasie calcique.

Le remodelage osseux libère quotidiennement environ 200 mg de calcium dans la circulation sanguine mais nécessite également la même quantité de calcium pour la minéralisation du tissu osseux nouvellement formé. En situation d'équilibre, les entrées et les sorties sont donc équivalentes.

Pour corriger des variations rapides de la calcémie, un autre mécanisme cellulaire est nécessaire. En effet, le remodelage osseux est un phénomène lent, inadapté pour libérer rapidement le calcium du tissu osseux. C'est donc la libération du calcium situé au niveau des couches superficielles de l'os qui va permettre de réguler rapidement la calcémie. Ce mécanisme est plus rapide, permet de libérer rapidement une quantité plus importante de calcium mais est de plus faible capacité (1).

### ***Elimination rénale***

Elle est nécessaire au maintien d'une balance calcique nulle (ce qui est la règle dans les situations physiologiques), elle est régulée par (2) :

- la PTH, en augmentant la réabsorption tubulaire du calcium. Elle favorise le transport actif du calcium au niveau du tubule contourné distal.
- la 1-25(OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub>, en augmentant la réabsorption du calcium au niveau du tubule contourné distal, mais également par d'autres mécanismes. Elle va augmenter la synthèse des récepteurs de la PTH sur les tubules contournés distaux ainsi que celle de la *calcium-binding protein* (CaBP) qui favorise la réabsorption du calcium
- la calcitonine : aux doses physiologiques, elle inhibe l'excrétion rénale du calcium, mais les mécanismes impliqués sont actuellement mal connus.

La calcémie ultrafiltrable joue un rôle direct sur l'élimination rénale du calcium, en effet, plus la calcémie est élevée, plus le rein va éliminer du calcium (à l'exception de l'hypercalcémie hypocalciurique familiale).

Quant à l'hypophosphatémie, elle augmente également la calciurie par deux mécanismes : le rétrocontrôle négatif sur la synthèse de PTH mais également sur la réabsorption tubulaire du calcium.

## **Rôles du calcium**

Le rôle principal du calcium est structural. Il intervient dans la minéralisation du tissu osseux avec les phosphates en constituant des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite insérés dans la trame de collagène.

En dehors du squelette, le calcium a d'autres fonctions.

En hémostase, le calcium est nécessaire à toutes les étapes d'activation enzymatique de la coagulation. Cette propriété est d'ailleurs utilisée dans l'industrie du diagnostic *in vitro*. Les tubes de prélèvement destinés à des analyses d'hémostase contiennent un chélateur du calcium ce qui a pour effet de rendre l'échantillon sanguin incoagulable transitoirement.

Il intervient également à différents niveaux de la conduction neuromusculaire : le contrôle de l'excitabilité musculaire, la libération de neurotransmetteurs ou encore l'initiation de la contraction musculaire.

Au niveau moléculaire, il agit en tant que cofacteur enzymatique et comme second messenger intracellulaire dans les phénomènes de transmission du signal.

## **En clinique**

Les principaux signes cliniques d'hyper- et hypocalcémie sont présentés dans le tableau n°1.

Hypercalcémie	Hypocalcémie
Fatigue, dépression, confusion, difficulté à se concentrer, besoin accru de sommeil, faiblesse musculaire	Irritabilité musculaire, paresthésie, laryngospasme, bronchospasme, tétanie, convulsion
Constipation, anorexie, nausée, vomissements	Allongement de QT à l'ECG
Polyurie, polydypsie, déshydratation, lithiase rénale, néphrocalcinose	
Réduction de l'intervalle QT à l'ECG, bradycardie ou arythmie	

ECG : électrocardiogramme.

**Tableau n°1 : Signes cliniques d'hyper et d'hypocalcémie (1)**

Quant au diagnostic étiologique, les démarches d'exploration d'une hypercalcémie et d'une hypocalcémie sont indiquées respectivement dans les figures n°1 et 2.

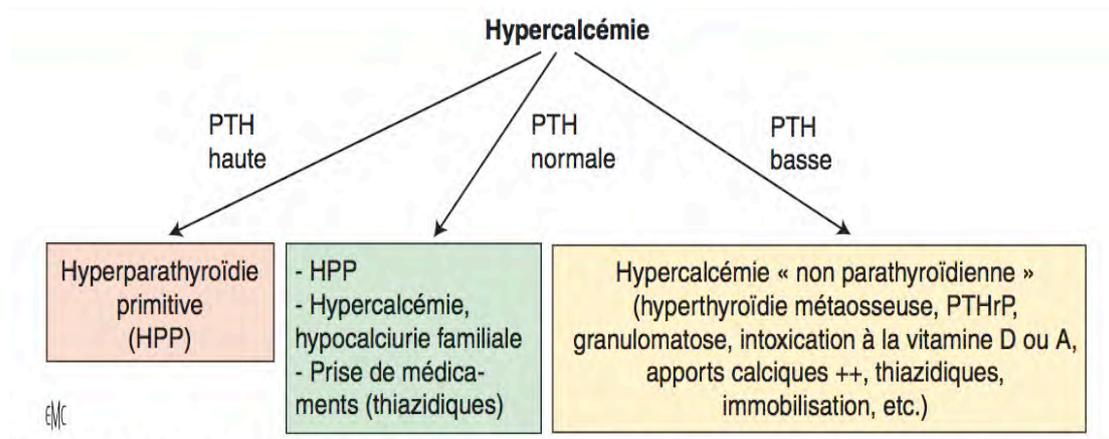


Figure n°1 : Démarche d'exploration biologique d'une hypercalcémie (1)

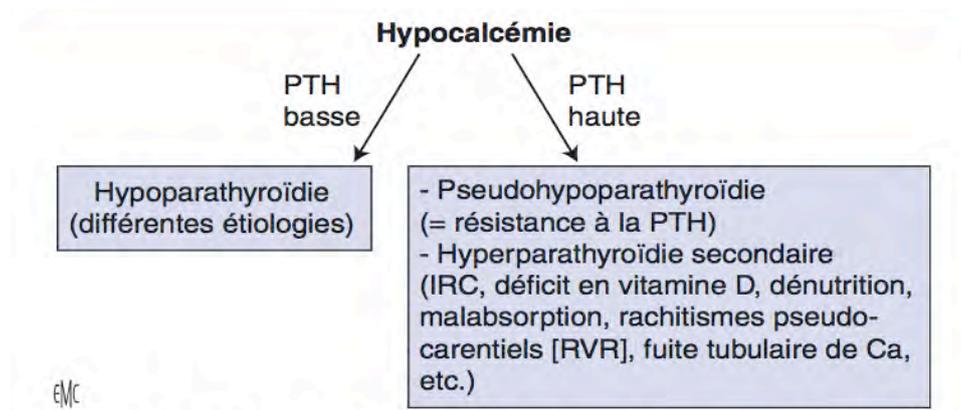


Figure n°2 : Démarche d'exploration biologique d'une hypocalcémie (1)

### 1.1.2. Phosphore

L'organisme contient environ 550 g de phosphore (pour un poids moyen de 70 kg) qui existe sous 2 formes dans l'organisme :

- phosphore organique non actif directement (phospholipides, phosphoprotéines)

- phosphore inorganique (Pi) sous forme de phosphate, c'est la fraction active biologiquement.

La répartition des phosphates est identique à celle du calcium avec une localisation préférentielle dans le tissu osseux (85 %, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite) et une fraction de 14 % dans le secteur intracellulaire, essentielle car constituant des protéines, phospholipides, ATP et acides nucléiques. Seul 1 % se trouve dans le secteur extracellulaire.

Dans le plasma, le phosphate est présent sous forme inorganique (on dose les phosphates et non le phosphore) :

- au pH physiologique, 80 % des phosphates sont sous forme divalente  $\text{HPO}_4^{2-}$  et 20 % sous forme monovalente  $\text{HPO}_4^-$
- 55 % sous forme ionisée
- 10 % sont liés à des protéines
- 35 % sont liés à des cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ )
- l'intervalle de référence est de 0,87 à 1,50 mmol/L (soit de 30 à 46,5 mg/L) chez l'adulte (3).

La phosphatémie subit des variations beaucoup plus importantes que la calcémie. C'est le reflet d'importants mouvements des phosphates entre les secteurs intra- et extracellulaire (2).

Les apports journaliers de phosphore représentent environ 800 mg correspondant aux besoins quotidiens (15 mg/kg/j). Pendant la croissance, il existe une augmentation des besoins (liée en grande partie au mécanisme de minéralisation osseuse). L'absorption intestinale est de 60 à 80 % de cet apport alimentaire.

### ***Absorption intestinale***

Comme pour le calcium, elle se fait d'une part par un processus d'absorption passif non saturable et d'autre part par un processus actif saturable.

Le processus passif est le plus utilisé dans les conditions physiologiques, c'est un gradient de concentration entre la lumière intestinale et le liquide interstitiel.

Le processus actif est un cotransport  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  (via le cotransporteur NPT2b exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes) qui est stimulé par la  $1\text{-}25(\text{OH})_2$  vitamine D3 (2).

### ***Le tissu osseux***

Il joue un rôle important dans l'homéostasie du phosphore par le biais des mêmes mécanismes que pour l'homéostasie calcique. Les échanges de phosphates entre l'os et le pool plasmatique sont en situation physiologique à l'équilibre (2).

### ***Elimination rénale***

Le rein possède une grande capacité de régulation du phosphate car en fonction des besoins de l'organisme, il va moduler la réabsorption tubulaire des phosphates.

La quantité de phosphates éliminée correspond à celle entrée par voie intestinale.

Le glomérule va filtrer environ 90 % des phosphates (correspond à la portion ultrafiltrable) :

- 80 à 90 % sont réabsorbés et seulement 10 à 20 % sont excrétés
- la réabsorption a lieu essentiellement au niveau du tube contourné proximal (2) (pour 85 % contre 15 % environ au niveau des tubules plus distaux) (1).

Il existe 4 cotransporteurs  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  différents pour assurer la réabsorption tubulaire des phosphates (NPT2a qui assure la majeure partie des échanges tubulaires, NPT2c, NPT1 et Pit2).

L'expression des cotransporteurs NPT2a et NPT2c au niveau des cellules des tubules proximaux est régulée par différents facteurs : les apports de phosphore alimentaire (une diminution de ces apports entraîne une augmentation de NPT2a au

niveau tubulaire), la PTH qui va exercer son effet hypophosphatémiant par la dégradation de NPT2, et le FGF23 qui inhibe l'expression de NPT2a et NPT2c au niveau des cellules des tubules proximaux (1).

Les mécanismes régulateurs qui interviennent dans la régulation de la réabsorption tubulaire sont :

- les apports alimentaires et les besoins cellulaires en phosphates
- la PTH et le calcitriol : la PTH a un effet inhibiteur et le calcitriol un effet stimulant.

### ***Rôles des phosphates***

Tout comme le calcium, les phosphates ont un rôle structural via les cristaux d'hydroxyapatite qui vont s'intégrer au tissu osseux pour assurer la résistance du squelette.

Dans les tissus mous, les phosphates participent essentiellement aux processus énergétiques (ATP, AMPc) mais ont également un rôle dans la transmission du signal.

Dans le milieu extracellulaire, les phosphates assurent un rôle de tampon et sont ainsi primordiaux à l'équilibre acido-basique.

### **1.1.3. Système de régulation : hormones et vitamines**

Le produit phosphocalcique doit rester constant afin de maintenir une minéralisation osseuse idéale. Trop élevé, il entraînerait l'apparition de calcifications en dehors de l'os, trop bas, c'est la minéralisation de l'os qui serait altérée. Ainsi, une variation de la concentration de l'un de ces ions entraînerait une variation inverse de l'autre.

#### ***Le calcium***

En période postprandiale, il existe une augmentation de la valeur de la calcémie d'où la nécessité d'effectuer le dosage du calcium sanguin chez un sujet à jeun. En

effet, à jeun, la calcémie n'est régulée que par le tissu osseux et le rein (équilibre entre la quantité de calcium relarguée par l'os et celle excrétée par le rein).

Il y a donc un système régulé, le calcium ionisé, qui est un état d'équilibre entre trois acteurs :

- l'absorption intestinale
- le tissu osseux
- l'élimination rénale

qui est caractérisé par des entrées et des sorties de calcium dans le liquide extracellulaire.

Un système régulateur avec :

- 2 hormones, la PTH et la 1-25(OH)<sub>2</sub> vitamine D3
- le « *calcium sensing receptor* » (CaSR) qui va détecter les variations de la calcémie ionisée pour assurer une régulation médiée par le calcium lui-même.

Le CaSR est présent à la fois au niveau des organes produisant les hormones régulant la calcémie (les glandes parathyroïdes et les cellules C de la thyroïde) mais aussi au niveau des organes participant à la régulation du taux de calcium (intestin, os et reins). Il possède donc un rôle majeur dans la régulation de la calcémie.

Un système de stockage qui permet d'avoir en permanence suffisamment de calcium pour corriger rapidement un déséquilibre.

### ***Le phosphore***

L'homéostasie du phosphore est également un équilibre entre ces 3 mêmes acteurs : l'intestin (absorption du phosphore alimentaire), le tissu osseux (stockage lors de la formation osseuse et relargage dans la circulation sanguine lors de la résorption osseuse) et le rein (élimination urinaire du phosphore).

La concentration plasmatique du phosphore est par contre, comme nous l'avons vu plus haut, contrôlée dans un intervalle plus large que la calcémie.

La régulation de la phosphatémie :

- jusqu'au début des années 2000 (découverte de FGF23), régulation par 2 hormones
- la PTH entraîne une diminution de la réabsorption tubulaire proximale du phosphate (effet phosphaturiant)
- le métabolite actif de la vitamine D (le calcitriol) stimule l'absorption intestinale des phosphates (via le processus actif) et la réabsorption tubulaire proximale du phosphate
- le FGF23 (ses actions seront décrites ci-dessous).

Pendant de très nombreuses années, les notions concernant les mécanismes de contrôle de l'homéostasie du calcium et du phosphore faisaient intervenir une boucle de régulation comprenant 3 organes (l'intestin, l'os et le rein) et l'action conjointe de 2 facteurs : une hormone, la PTH et la vitamine D sous sa forme de métabolite actif (la 1-25 dihydroxy vitamine D ou calcitriol). Le schéma des principaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie du métabolisme phosphocalcique est présenté dans la figure n°3).

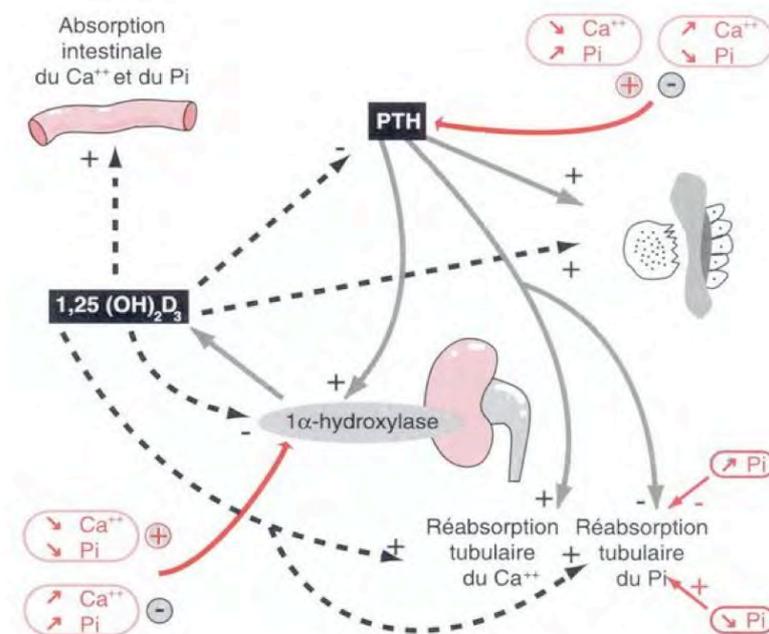


Figure n°3 : Schéma des principaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie du métabolisme phosphocalcique (2)

Deux autres mécanismes de régulation ont été mis en évidence ces dernières années : le système RANK/RANK-L/OPG et l'axe FGF23-protéine Klotho.

### 1.1.4. Système de régulation : OPG/RANK-L/RANK

Ce système découvert il y a une quinzaine d'années constitue le mécanisme de régulation prépondérant de la résorption osseuse (première partie du cycle de remodelage osseux : figure n°4) et donc de la libération de calcium. D'autres fonctions ont également été décrites mais ne seront pas développées dans ce travail.

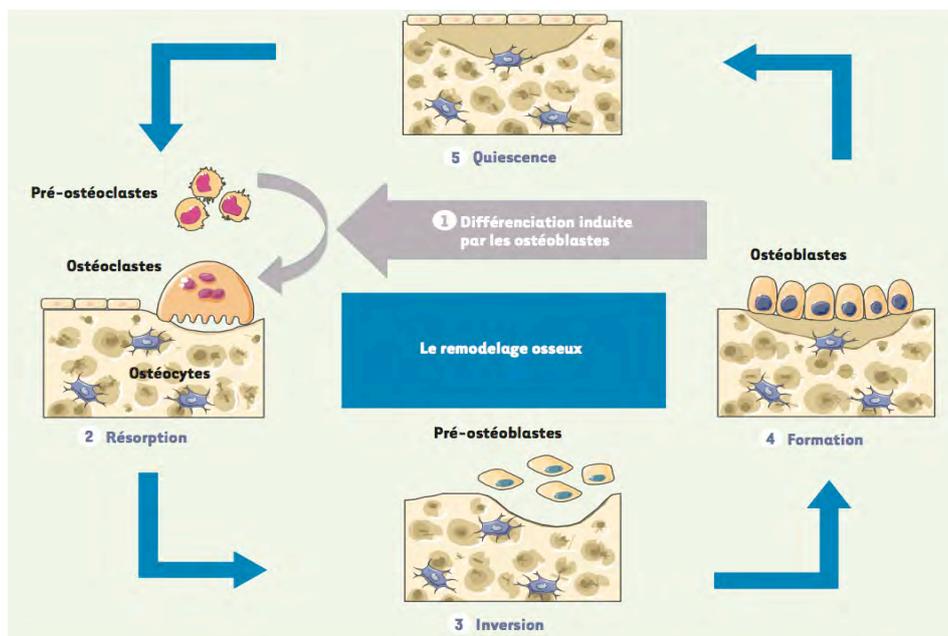


Figure n°4 : Schéma du remodelage osseux (4)

#### ***Il comprend 3 facteurs***

- RANK-L : le ligand.

« *Receptor Activating NF Kappa B-Ligand* »

C'est une protéine transmembranaire de la famille des TNF (« *Tumor Necrosis Factor* »). Elle possède un court segment intracytoplasmique N-terminal et un long

domaine C-terminal extracytoplasmique qui peut d'ailleurs être libérée sous forme soluble. Elle est synthétisée par différentes cellules (ostéoblastes essentiellement, ostéoclastes, cellules endothéliales, cellules stromales et lymphocytes T activés).

- RANK : le récepteur.

C'est également une protéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des récepteurs au TNF.

Elle est exprimée à la surface des cellules cibles de RANK-L : les cellules de la lignée ostéoclastique (précurseurs ostéoclastiques mononucléés et ostéoclastes matures polynucléés) mais également les chondrocytes, les cellules dendritiques et les cellules T matures.

- OPG : le récepteur qui « piège » RANK-L.

L'ostéoprotégérine est une protéine de la famille des récepteurs du TNF. Elle est exprimée dans de nombreux tissus (cœur, foie, rein, cerveau) mais son action principale se situe au niveau de l'os où elle est synthétisée par les ostéoblastes.

### ***Fixations ligand-récepteur***

La fixation de RANK-L à son récepteur RANK :

Elle active différentes voies de signalisation (dont l'augmentation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B) aboutissant à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures permettant ainsi l'activité des ostéoclastes pour favoriser la résorption osseuse. RANK-L va également prolonger la durée de vie des ostéoclastes en inhibant leur apoptose.

Dans le système immunitaire, RANK-L, synthétisé par les lymphocytes T, se fixe au niveau des récepteurs RANK des cellules dendritiques pour réguler leurs fonctions et leur survie.

### La liaison de l'OPG à RANK-L :

L'OPG (qui est l'équivalent d'un récepteur soluble) empêche la fixation de RANK-L à son récepteur et inhibe la résorption osseuse (inhibe la différenciation et l'activité des ostéoclastes).

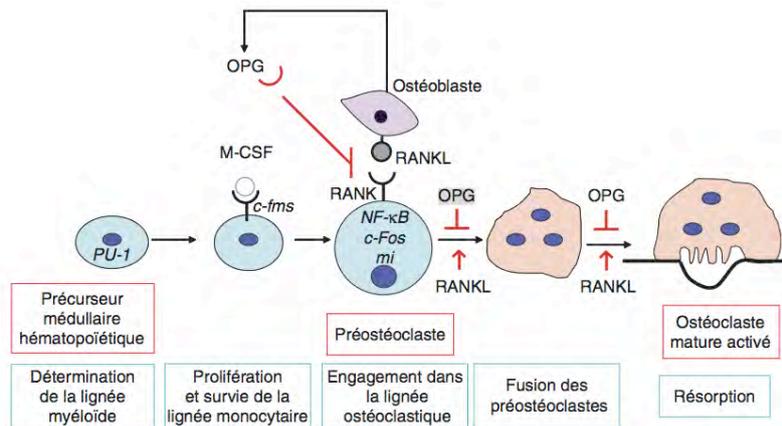


Figure n°5 : Interaction OPG/RANK-L/RANK (5)

Il a été démontré qu'une délétion du gène codant pour l'OPG entraînait une ostéoporose sévère et qu'à contrario une surexpression provoquait une ostéopétrose (5). Cela démontre donc que le ratio RANK-L/OPG va réguler de manière importante la résorption ostéoclastique et ainsi déterminer la masse osseuse.

### **Régulation du système OPG/RANK-L/RANK (figure n°6)**

La synthèse de RANK-L est augmentée par les activateurs de l'ostéoclastogénèse (calcitriol, PTH, glucocorticoïdes, certaines interleukines (IL) et le  $TNF\alpha$ ) mais diminuée par les oestrogènes, l'IL-4 et le  $TGF\beta$ .

L'OPG est également hautement régulée.

La prostaglandine E2, les glucocorticoïdes et la PTH diminuent son expression alors que les oestrogènes et plusieurs cytokines (IL-1, IL-4, IL-13, IL-18,  $TNF\alpha$  et  $TGF\beta$ ) vont l'augmenter (4).

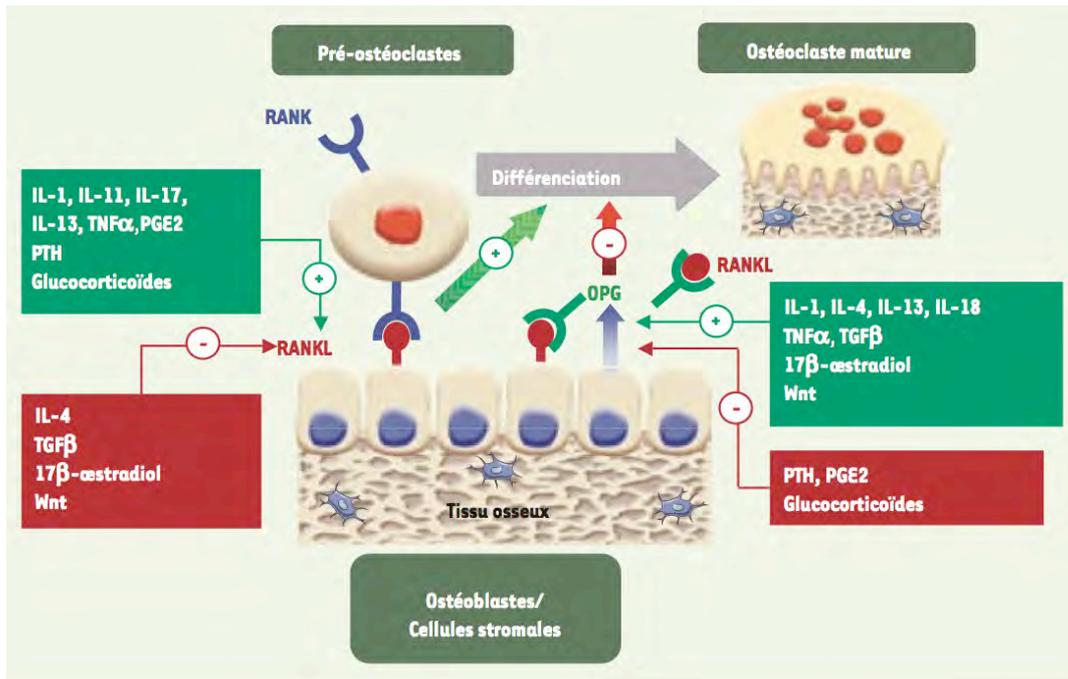


Figure n°6 : Régulation du système OPG/RANK-L/RANK (4)

En pathologie osseuse lytique, le système OPG/RANK-L/RANK joue un rôle fondamental.

Dans la perte osseuse liée au myélome, les plasmocytes favorisent la production de RANK-L et diminuent celle de l'OPG (6). Chez les patientes ostéoporotiques, un déséquilibre de la balance RANK-L/OPG pourrait être à l'origine de la perte osseuse avec une augmentation de RANK-L, ce qui en fait une cible dans la thérapeutique de l'ostéoporose (4).

### 1.1.5. Système de régulation : axe FGF23 – Protéine Klotho

#### ***Structure et synthèse du FGF23***

Découvert au début des années 2000, ce facteur appartient par sa structure à la famille des « *fibroblast growth factors* », facteurs de croissance non hématopoïétiques. Ce facteur, bien que phylogénétiquement proche du FGF19 et

FGF21, fait partie des phosphatonines (7) car il est en fait considéré comme une hormone ayant une action phosphaturiante majeure.

Le FGF23 est une protéine de 251 acides aminés dont le gène est situé sur le chromosome 12 en position 12p13 (8).

Sa synthèse a lieu essentiellement au niveau de l'os, surtout par les ostéocytes mais également par les ostéoblastes et les odontoblastes (9, 10, 11, 12). L'ARNm de FGF23 a été également détecté dans le foie, les ganglions lymphatiques, le thymus, le coeur, la thyroïde (13, 14) et les cellules endothéliales des capillaires sinusoides de la moelle osseuse (13). Il n'a pas été retrouvé dans le rein (15).

L'expression et la production de FGF23 sont régulées par la phosphatémie et le calcitriol : (14, 15, 16, 17)

- augmentation par des apports chroniques en phosphates ou l'administration de calcitriol par l'intermédiaire d'un récepteur à la vitamine D situé dans la région du promoteur de FGF23
- diminution si régime pauvre en phosphate.

En revanche, ni le calcium ni la PTH ne semblent jouer un rôle direct dans la régulation.

Le FGF23 est clivé par une proprotéine convertase sur un site Arg-His-Thr-Arg (RHTR) en deux peptides biologiquement inactifs N- et C-terminaux. Ce site se situe entre les positions 176 et 179 (176RHTR179). Il possède une région NH<sub>2</sub>-terminale de 180 acides aminés contenant un peptide signal de 24 acides aminés, le domaine commun de FGF et une partie COOH-terminale de 71 acides aminés (9, 18).

Il existe sous différentes formes dans la circulation (figure n° 7) :

- la forme intacte est la seule forme active et sa stabilité nécessite une O-glycosylation

- des peptides de dégradation FGF23 qui sont des formes inactives résultant d'un clivage par une proprotéine convertase entre acides aminés 176 et 179 (19).

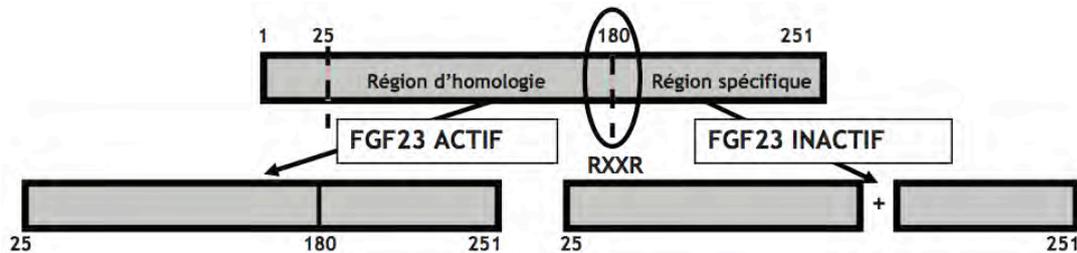


Figure n°7 : Différentes formes circulantes de FGF23 (19)

### ***Liaison aux récepteurs***

Pour produire son effet sur ses cellules cibles, FGF23 doit disposer d'un récepteur spécifique.

Comme les FGF, le FGF23 se lie avec des affinités voisines aux récepteurs spécifiques de cette famille de facteur de croissance (FGFR) existant sous plusieurs isoformes et résultant de l'épissage différentiel des protéines codées par 4 gènes. Cependant *in vitro* aucun d'entre eux n'a pu être activé par le FGF23.

### ***Protéine Klotho***

En revanche, deux observations ont mis en exergue l'importance de la protéine Klotho :

- les souris Klotho *knock-out* (KO) manifestent une forte hyperphosphatémie et une élévation importante de FGF23
- le phénotype de souris invalidées pour Klotho est quasi similaire à celui de souris KO pour FGF23.

Ceci montre la nécessité de la présence de la protéine Klotho pour l'activité biologique de FGF23 (1).

Klotho est une protéine de 1014 acides aminés transmembranaire exprimée dans le tubule distal du rein, les glandes parathyroïdes, les plexus choroïdes et les cellules germinales.

Elle est codée par un gène du nom de la déesse grecque (Κλωθώ - qui file la trame de vie), porté par le chromosome 13 en position 13q12.

Après clivage elle peut être détectée dans le sang et le LCR et cette forme circulante est dotée d'une activité  $\beta$ -glucuronidase.

Cette protéine Klotho se lie avec différents récepteurs FGFR avec une affinité plus particulière de la protéine Klotho avec FGFR1c, FGFR3c et FGFR4 (20).

Chez les souris KO pour le gène *KLOTHO*, l'espérance de vie est diminuée, elles présentent une atrophie cutanée, une moins bonne densité minérale osseuse, des calcifications ectopiques et une infertilité. Alors que celles qui surexpriment *KLOTHO*, ont au contraire une espérance de vie augmentée. Cela suggère donc une importance physiologique majeure de cette protéine (21).

### ***Actions (figure n°8)***

Les deux organes cibles du FGF23 sont le rein et les glandes parathyroïdes.

Le FGF23 circulant agit au niveau du rein en provoquant :

- une inhibition de la réabsorption des phosphates par les tubules rénaux proximaux (effet phosphaturiant) par inhibition de l'expression membranaire des cotransporteurs NPT2a et NPT2c (19)
- une inhibition de la synthèse du calcitriol (par suppression de l'expression du gène *CYP27B1* qui code pour la 1  $\alpha$  hydroxylase au niveau du tubule proximal) et augmentation de sa dégradation par la stimulation de l'expression du gène *CYP24* qui code pour la 24-hydroxylase) (22, 23).

Au niveau des glandes parathyroïdes, le FGF23 interviendrait dans la régulation de la synthèse de la PTH par une action directe au niveau parathyroïdien mise en évidence chez le rat : diminution de l'ARNm (24) et donc de sa sécrétion (19).

Il n'exercerait pas d'effet direct sur l'os car aucune relation entre la DMO et les concentrations sanguines n'a été observée dans une étude réalisée chez des sujets dialysés (25).

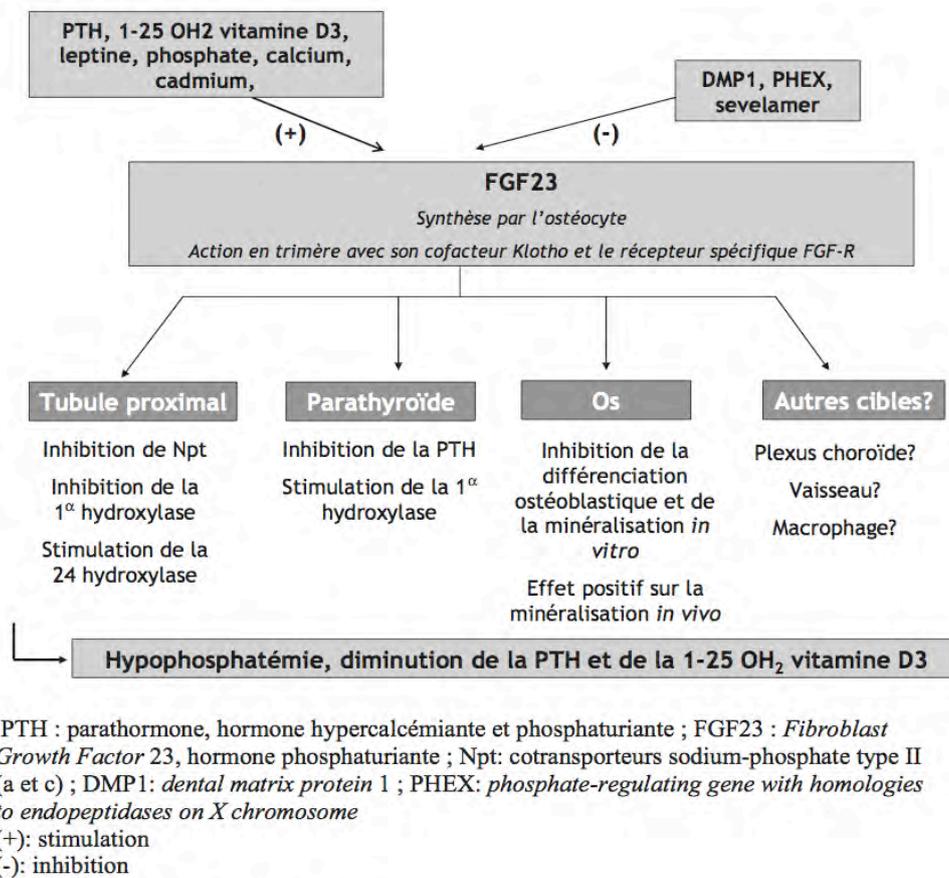


Figure n°8 : Régulation et actions du FGF23 (19)

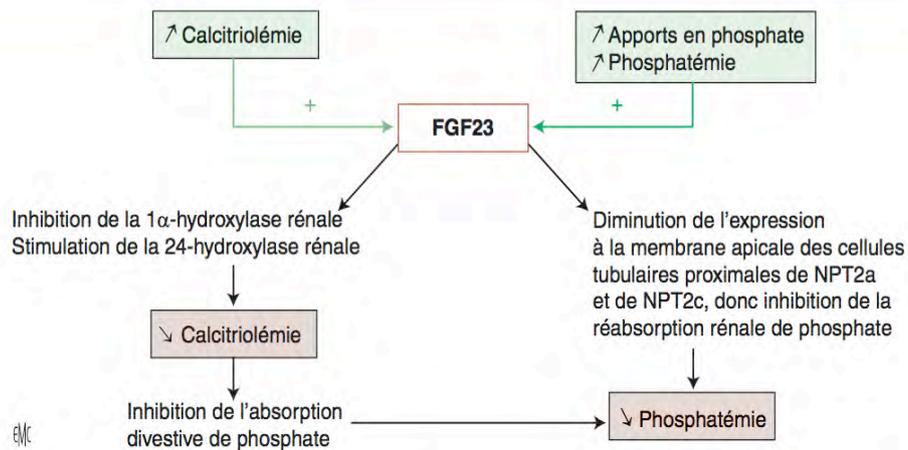


Figure n°9 : FGF23 et métabolisme phosphocalcique (1)

### 1.1.6 Autres systèmes de régulation

Comme le FGF23, d'autres molécules impliquées dans la régulation du phosphore font partie de la famille des phosphatonines :

- la phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire (MEPE)
- la « Dentin Matrix acidic Phosphoprotein-1 » (DMP-1)
- la « secreted Frizzled-Related Protein-4 » (sFRP-4).

## **1.2 La parathormone (PTH)**

### **1.2.1 Historique (Tableau n°2)**

C'est en novembre 1849 que furent pour la première fois décrites les glandes parathyroïdes. Sir Richard Owen, Professeur au Collège Royal des Chirurgiens d'Angleterre, découvrit, lors de l'autopsie d'un rhinocéros unicornis décédé au Zoo de Regent's Park à Londres, au niveau du cou « quatre petites formations jaunâtres à l'endroit où les veines émergent du corps thyroïde ». La publication de sa découverte n'eut pas de suite, jusqu'en 1880, date à laquelle Viktor Ivar Sandström (anatomiste suédois) publia les résultats de ces travaux de recherche. Il démontra, à partir de dissections de cadavres humains, la présence constante mais en nombre variable de formations parathyroïdiennes. Il proposa le terme de « glandes parathyroïdiennes ».

La découverte de leurs fonctions fut beaucoup plus tardive. En 1891, Eugène Gley, Professeur de Physiologie et d'Endocrinologie au Collège de France, attira à nouveau l'attention sur ces glandes parathyroïdes en décrivant chez l'animal les conséquences de leur ablation (tétanie puis décès de l'animal). Mais pour lui leur fonction est liée à celle de la glande thyroïde. En 1897, Gustave Moussu, un autre français, publie ses travaux dans lesquels il soutient une théorie contraire : il existe deux fonctions distinctes, l'une thyroïdienne et l'autre parathyroïdienne.

À la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, deux avancées majeures sont donc établies : le lien entre l'absence de parathyroïde et la tétanie ainsi que le fait que les glandes parathyroïdes sont une entité anatomiquement mais également fonctionnellement différente de la thyroïde.

Ce n'est qu'en 1925, après d'intenses débats, que la fonction de régulation du calcium des glandes parathyroïdes est définitivement établie. Collip montre qu'un extrait de glandes parathyroïdes prévient totalement l'apparition de crise de tétanie

chez des sujets parathyroïdectomisés. Les parathyroïdes sont donc des glandes endocrines sécrétant une hormone : la parathormone (PTH).

Trente cinq ans plus tard, Handler et son équipe publient leur frustration de ne pas réussir à purifier la PTH pour pouvoir analyser sa structure. Ce sont finalement Aurbach puis Rasmussen et Craig qui en 1959 résolvent le problème en utilisant des solvants organiques à la place des acides forts pour réaliser l'extraction.

En 1978, Keutmann est le premier à établir, à l'aide de techniques de séquençage, la structure de la PTH (26, 27).

Ensuite dans les années 1990, les récepteurs de la PTH furent mis en évidence et au début de ce siècle fut établi l'intérêt de la PTH dans la thérapeutique de l'ostéoporose.

Date	
1850–1900	Parathyroid glands discovered as separate entities from thyroid Function unknown
1900–1925	Parathyroid gland function debated Tetany after parathyroidectomy: cause—hypocalcemia vs methyl guanidine
1925	Active gland extract purified Calcium regulation established
1927–1950s	Pathophysiology of hormone excess and deficiency defined Hyper- and hypoparathyroidism
1929	Bone mass increase in rats Paradox (largely ignored)
1970s	Hormone structure and synthesis Bone anabolic effects in animals confirmed Human clinical trials in osteoporosis start
1990s	Parathyroid hormone receptor cloned Rapid advances in understanding hormone action at the cellular and molecular level
2001	PTHrP gene knockout—abnormal bone development Striking clinical benefit in osteoporosis established Era of skeletal 'anabolic' agents begins

Tableau n°2 : Chronologie des principales avancées sur la PTH (27)

## 1.2.2 Structure et synthèse

Le gène humain de la PTH est situé sur le bras court du chromosome 11 en 11p15 et code pour une protéine de 115 acides aminés, la préparathormone (28).

### Structure

La séquence complète de la PTH humaine (figure n°10) a été décrite par Keutmann en 1978, après la PTH bovine en 1970 par Brewer et Ronan et l'équipe de Niall puis de la PTH porcine en 1974 par Sauer (29).

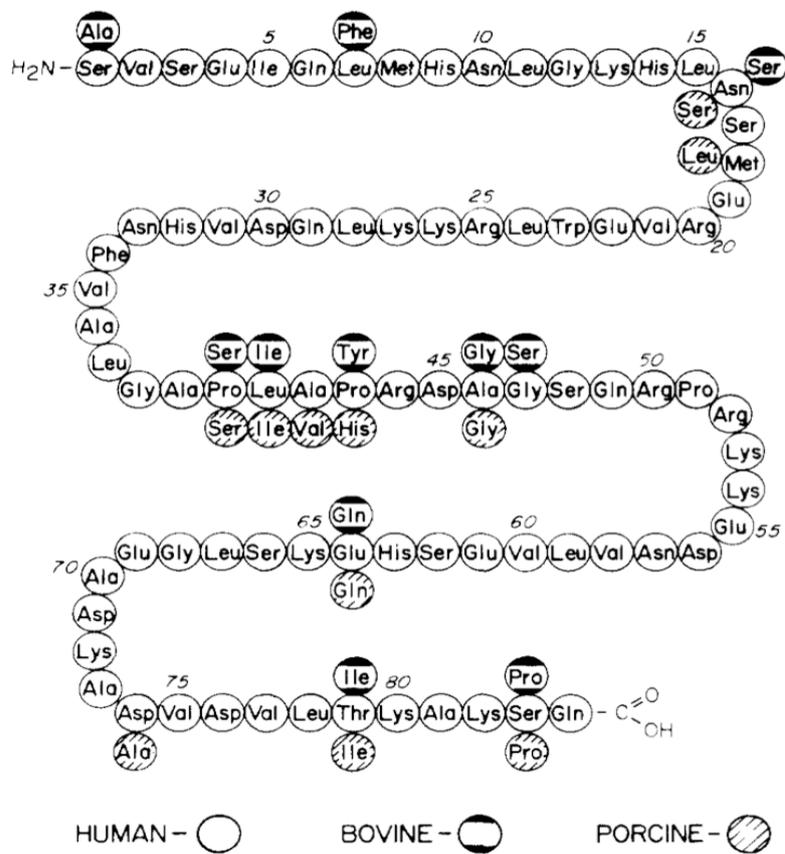


Figure n°10 : Séquence complète en acides aminés de la PTH humaine et comparaison avec les molécules de PTH bovine et porcine (29)

Sa structure peut être divisée en 3 zones (30) :

- la région amino-terminale (N-terminale), (1-34), présente une structure régulière (2 hélices  $\alpha$  séparées par une zone flexible en feuillet plissé), c'est la zone active biologiquement.
- la région moyenne (« mid-C-terminale ») présente une structure souple en feuillet plissé.
- la région carboxy-terminale (C-terminale) a une hélice  $\alpha$  en position 65-74 entourée de configurations  $\beta$  en positions 58-60 et 76-81.

Son poids moléculaire est d'environ 9400 daltons (31).

### Synthèse

Elle est synthétisée sous forme de pré-pro-PTH (figure n°11) par les cellules principales des glandes parathyroïdes qui sont situées normalement au pôle inférolatéral de la thyroïde. Elles sont au nombre de 4 mais il existe des glandes surnuméraires (jusqu'à 4) chez 2 à 5% de la population. Elles mesurent 6 x 4 x 2 mm et pèsent environ 30 à 50 mg (30).

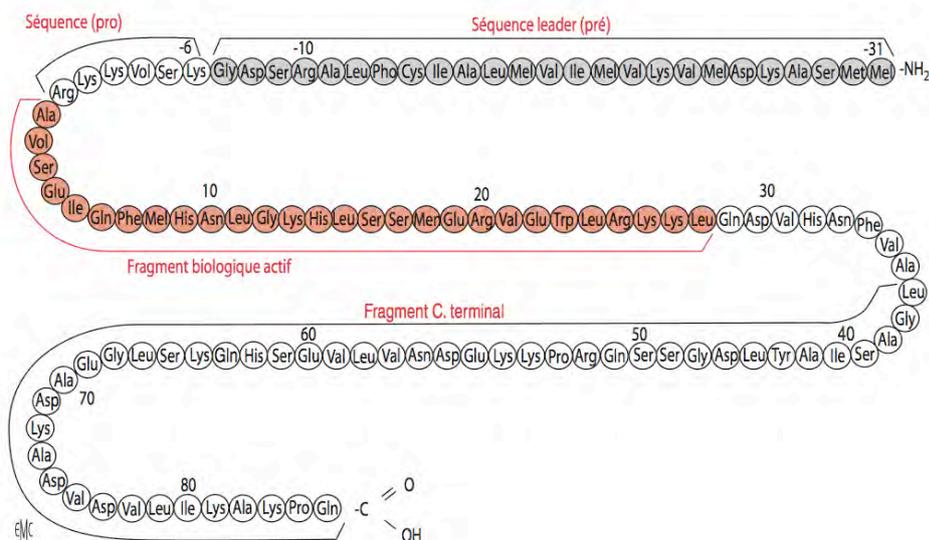
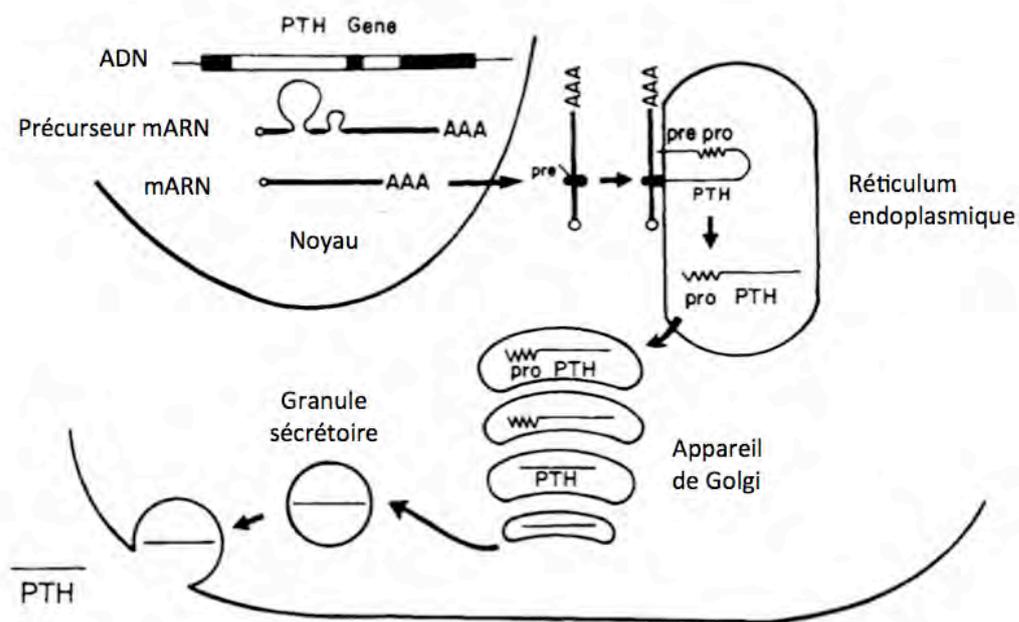


Figure n°11 : Structure de la préparathormone (prépro-PTH) (30)

La préparathormone subit 2 clivages successifs libérant 2 peptides situés en position amino-terminale : le premier est la proparathormone (pro-PTH), 90 acides aminés, au niveau du réticulum endoplasmique (libération d'un fragment de 25 acides aminés = séquence « pré ») puis le second est la PTH, 84 acides aminés, dans le complexe de Golgi (après libération d'un peptide de 6 acides aminés = séquence « pro ») (32).

Une fois sortie de l'appareil de Golgi, la PTH est soit sécrétée immédiatement dans la circulation sanguine, soit stockée dans des granules sécrétoires où elle peut être dégradée (clivée en fragments C-terminaux) ou simplement accumulée.

L'ensemble du processus de synthèse représentée dans la figure n°12 dure environ 15 à 20 min (de la transcription du gène de la PTH au clivage de la pro-PTH) (30).



mARN : ARN messenger

Figure n°12 : Schéma illustrant les différentes étapes de la synthèse de la PTH dans les cellules principales des glandes parathyroïdes (33)

La concentration sanguine de PTH est dépendante de deux phénomènes : la synthèse de nouvelles molécules de PTH et la libération de PTH stockée dans les granules sécrétoires, hautement régulée également.

### ***Régulation de la synthèse de la PTH***

Sa synthèse dépend de la quantité d'ARN messenger (ARNm) de prépro-PTH présente (34). Elle même régulée négativement par la  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D et le calcium mais positivement par le phosphore (35, 36).

Les variations de concentration en calcium ionisé sont détectées par des récepteurs au calcium (Ca-Sensing Receptor ou CaSR) situés sur les membranes plasmiques des cellules principales des glandes parathyroïdiennes. Ces récepteurs au calcium sont également présents dans d'autres tissus (tableau n°3) notamment au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henle où ils jouent un rôle important dans la régulation de réabsorption rénale du calcium.

<i>Type cellulaire</i>	<i>Action</i>
<b>cellules principales parathyroïdiennes</b>	réduction de libération et de synthèse de PTH
<b>cellules C thyroïdiennes</b>	augmentation de libération et de synthèse de calcitonine
<b>tubule rénal</b>	diminution de réabsorption de calcium
<b>ostéoblastes, ostéoclastes</b>	action inconnue
<b>fibroblastes</b>	action inconnue
<b>système nerveux central</b>	action inconnue
<b>cellules G gastriques</b>	action inconnue
<b>cellules épithéliales ovariennes</b>	action inconnue
<b>cellules ovariennes, placentaires</b>	action inconnue
<b>cellules hématopoïétiques</b>	action inconnue
<b>cellules hypophysaires à GH, ACTH</b>	action inconnue

Tableau n°3 : Localisations tissulaires et fonctions du CaSR (37)

Le gène du CaSR est localisé sur le chromosome 3 en position 3q21-24. Le récepteur est composé de 1078 acides aminés. Il possède un large domaine extra cellulaire amino-terminal de 612 acides aminés, 7 domaines transmembranaires en hélice (250 acides aminés) et un domaine carboxy-terminal intra cellulaire de 216 acides aminés présentant de nombreux sites de phosphorylation (figure n°13). Il fonctionne sous la forme d'un dimère relié par 2 ponts disulfures. Il fait partie des récepteurs couplés à la protéine G. Le calcium ionisé se lie au récepteur au niveau de son domaine extra cellulaire (37).

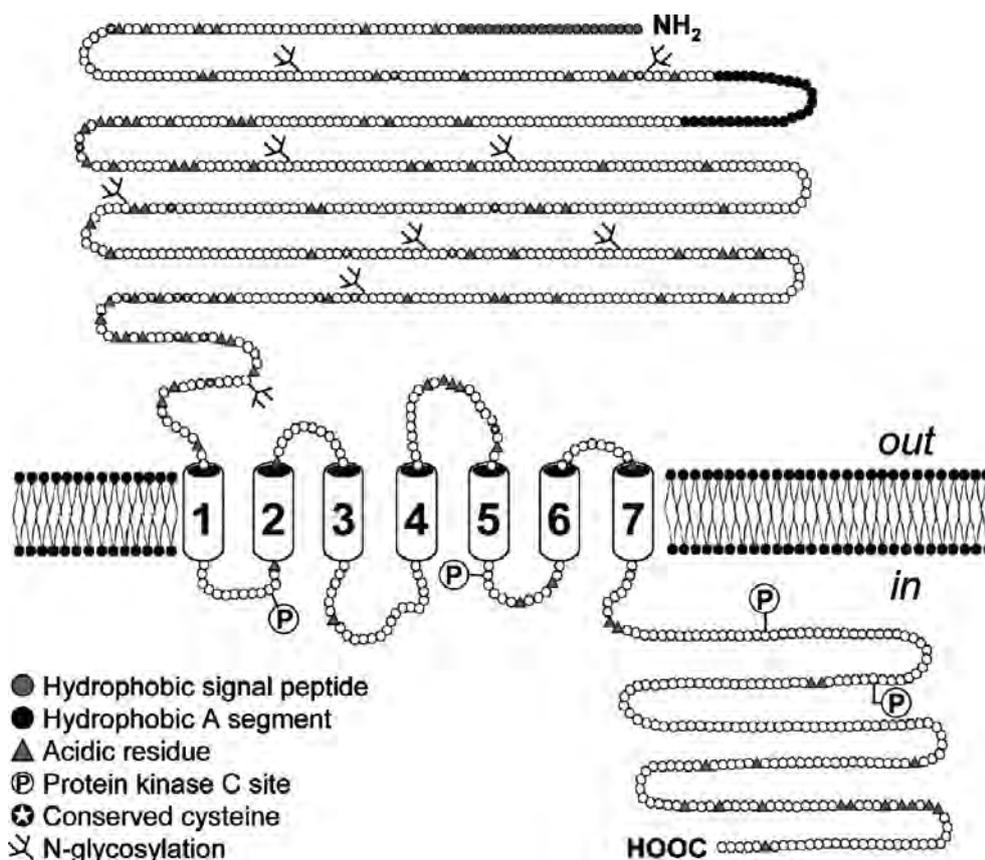


Figure n°13 : Schéma du Récepteur au calcium – CaSR (38)

Une diminution du taux de calcium ionisé extra-cellulaire va activer les processus de la synthèse de nouvelles molécules de PTH. L'hypocalcémie va également retarder la dégradation de la PTH dans les glandes parathyroïdes augmentant ainsi le stock disponible à libérer dans la circulation sanguine (39).

Il a été démontré que les cellules parathyroïdiennes possèdent des récepteurs au calcitriol (ce dernier provenant soit de l'hydroxylation rénale de la 25(OH) vitamine D soit d'une hydroxylation au niveau des glandes parathyroïdes par l'action d'une 1 $\alpha$  hydroxylase locale), permettant une action sur la synthèse d'ARNm codant pour la prépro-PTH. Son action inhibitrice est directe. Le complexe calcitriol-récepteur cytosolique se fixe sur le fragment 5' non codant du gène de la PTH pour empêcher sa transcription (30). Ces récepteurs possèdent également une action indirecte sur la sécrétion de la PTH en augmentant l'expression des CaSR (39).

La phosphatémie joue également un rôle dans la sécrétion de PTH. Une hypophosphatémie entraîne la synthèse d'endonucléases qui vont diminuer la stabilité du transcrit. Elle va être au contraire augmentée au cours d'une hyperphosphatémie.

Le magnésium serait aussi un régulateur de la PTH mais une variation de la magnésémie influencerait beaucoup moins la sécrétion de PTH que celle du calcium (cependant, l'hypomagnésémie chronique serait responsable d'une hypoparathyroïdie réversible) (40).

La 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D exerce donc une action directe sur l'ARNm de la prépro-PTH alors que calcium et phosphate agissent sur la production de protéines qui vont moduler la dégradation de cet ARNm.

### ***La libération de la PTH stockée dans les granules sécrétoires***

La sécrétion à travers la membrane plasmique est un phénomène complexe qui va faire intervenir deux systèmes différents :

- un système calcium-dépendant par l'intermédiaire des CaSR sur les cellules principales qui va également agir sur la synthèse de la PTH comme cela a été décrit précédemment. La liaison du calcium à son récepteur entraîne une cascade de réactions intra cellulaires faisant intervenir différents éléments (dont la protéine G, l'AMP cyclique et la phospholipase C) et aboutit au relargage rapide des molécules de PTH préformées et stockées dans les granules sécrétoires (39)
- un système AMP cyclique-dépendant qui va agir seulement sur les granules de stockage (41).

### **1.2.3 Métabolisme**

Les différentes formes circulantes de la PTH sont soit sécrétées par les glandes parathyroïdes soit produites par son métabolisme périphérique.

### ***Au niveau des glandes parathyroïdes***

La dégradation de la PTH est due à 2 mécanismes :

- soit les granules sécrétoires se lient à des lysosomes pour dégrader complètement la PTH
- ou la PTH est clivée par des cystéine-protéases pour générer des fragments C-terminaux (42).

Ce phénomène est régulé par la calcémie. Alors qu'en présence d'une hypocalcémie, la plupart de la PTH synthétisée reste intacte et est libérée dans la circulation sanguine, en présence d'une hypercalcémie, elle est majoritairement dégradée. L'augmentation de la calcémie va favoriser la protéolyse des régions amino-terminale de la PTH par les cystéine-protéases et produire des formes tronquées de la PTH. Le rapport fragments C-terminaux/PTH 1-84 augmente donc en présence d'une hypercalcémie.

### ***Dans la circulation sanguine***

La PTH 1-84 est rapidement éliminée, sa demi-vie plasmatique étant inférieure à 4 min (entre 2 et 4 min) (43).

### ***Au niveau hépatique***

Le métabolisme de la PTH emprunte 2 voies :

- une voie ne concerne que la PTH intacte : elle a lieu dans les cellules de Kupffer, par des enzymes membranaires, elle libère dans la circulation sanguine des fragments ayant perdu leur région amino-terminale, généralement appelés « fragments carboxy-terminaux ». Cette voie est responsable des 2/3 du métabolisme hépatique
- une autre voie, intervient dans le métabolisme de la PTH intacte et de celui des fragments N-terminaux. Elle a lieu dans les hépatocytes qui ont des récepteurs membranaires pour ces différents fragments, c'est une voie

partiellement inhibée par une baisse de la calcémie, elle représente 1/3 de l'extraction hépatique de la PTH intacte et la totalité de la N-PTH.

Le foie va donc libérer des fragments de PTH de différentes tailles dans la circulation sanguine (42).

La demi-vie des fragments issus du métabolisme (parathyroïdien et hépatique) est plus élevée (20 à 40 min) que celle de la PTH intacte (4 minutes maximum pour la PTH intacte).

### ***Au niveau du rein***

L'élimination de l'ensemble des ces éléments (PTH 1-84 intacte et les différents fragments issus du métabolisme) est rénale. Ceci va provoquer leur accumulation dans la circulation sanguine en cas d'insuffisance rénale et avoir un impact :

- d'une part d'un point de vue analytique car les différents dosages de la PTH ne reconnaissent pas les mêmes fragments
- et d'autre part sur l'activité de la PTH et de ces fragments que l'on pensait dénués d'activité biologique mais qui en fait semblent exercer une activité.

Les glandes parathyroïdes sécrètent de la PTH 1-84 ainsi que différents fragments (comme vu ci dessus). Une augmentation de la calcémie inhibe la sécrétion de la PTH 1-84 et favorise la synthèse de peptides tronqués. Le foie produit également des fragments issus de la protéolyse. Tous ces peptides (PTH 1-84 et ces différents fragments) ont deux issues possibles : agir sur les organes cibles ou être éliminés par le rein (figure n°14).

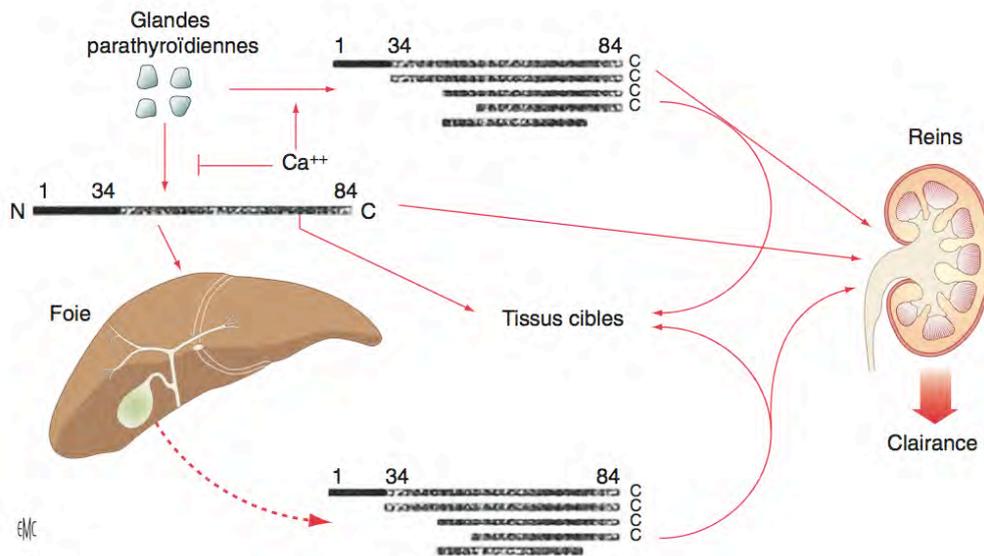


Figure n°14 : Schéma représentant le métabolisme périphérique de la PTH (30)

### ***Différents fragments issus du métabolisme de la PTH***

Le résultat de ce métabolisme complexe comme le montre la figure n°14 est la présence dans le sang d'un pool de différents peptides de PTH non seulement dans des situations pathologiques mais aussi chez des individus sains (31).

La PTH circule sous différentes formes moléculaires : la PTH 1-84 et de nombreux fragments issus soit de la synthèse par les parathyroïdes soit du métabolisme périphérique (rénal et hépatique).

Comme cela été décrit précédemment, la portion active biologiquement est la région 1-34 de la PTH, en effet seuls ces 34 premiers acides aminés sont reconnus par le récepteur de la PTH de type 1. Les fragments C-terminaux (composés des 50 derniers acides aminés de la PTH) ne sont pas reconnus par ce récepteur et ont donc été longtemps décrits comme des formes moléculaires ne présentant aucune activité biologique. Cette version est remise en cause depuis la découverte d'un récepteur spécifique de ces fragments C-terminaux dont la structure n'a pas encore été établie.

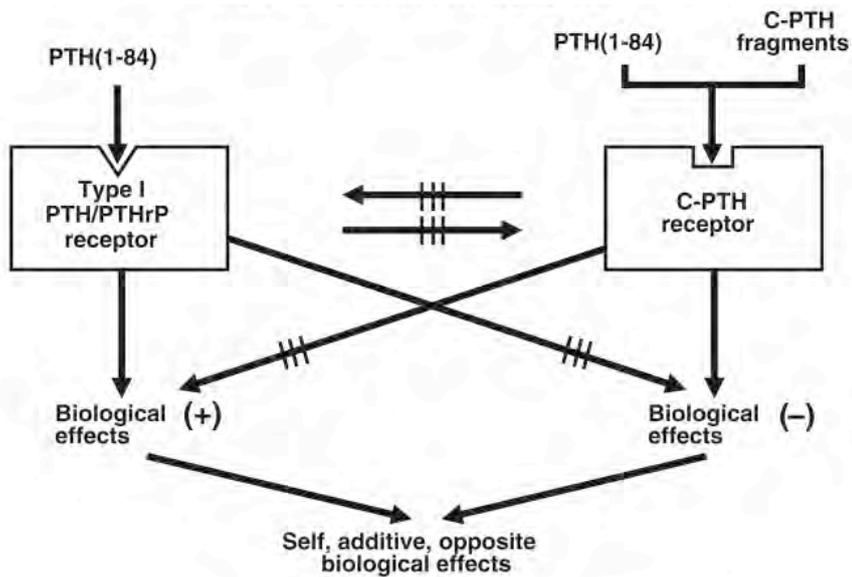


Figure n°15 : Nouveau concept d'activité de la PTH selon D'Amour (42)

Cette découverte a une importance capitale (figure n°15).

D'une part, cette activité biologique nouvellement évoquée des fragments C-terminaux serait à l'opposé de celle de la PTH 1-84 ou de sa portion 1-34 comme l'indiquent Rodriguez et Lorenzo (44) qui attribuent 3 effets biologiques à la liaison des formes C-PTH à leurs récepteurs (figure n°16) : baisse de la calcémie, augmentation de la phosphatémie et diminution du turn-over osseux.

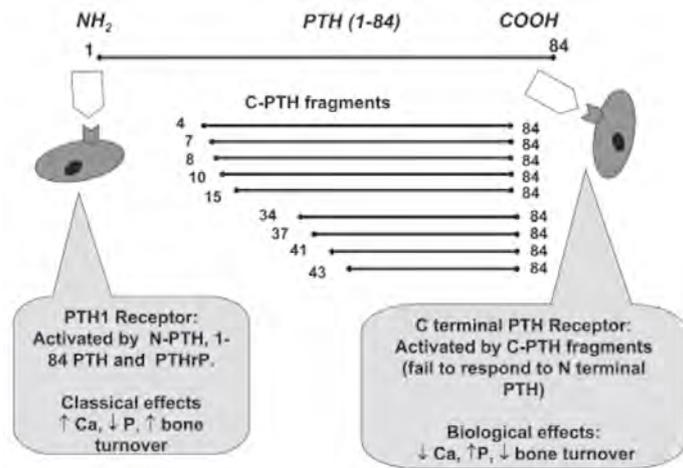
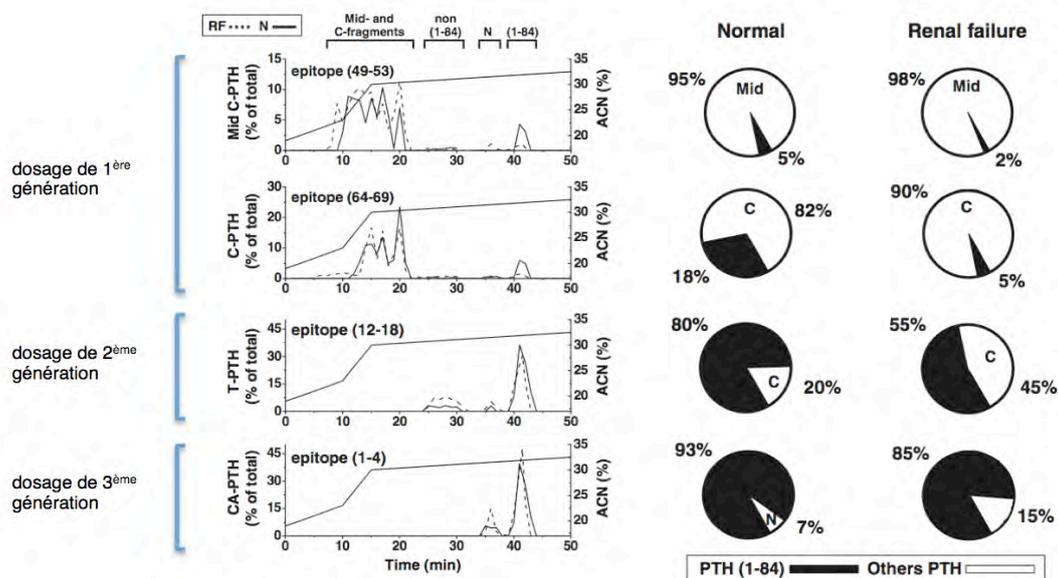


Figure n°16 : Représentation schématique des effets biologiques résultants de l'activation des récepteurs PTH1R et PTHR-C-terminal (44)

D'autre part, les fragments C-terminaux représentent une part non négligeable des formes circulantes de PTH tant chez les individus sains que chez les patients présentant une insuffisance rénale chez qui ces fragments vont s'accumuler comme le montre la figure n°17 (42).



RF --- : PTH circulante chez les individus insuffisants rénaux au stade terminal

N — : PTH circulante chez les individus sains

Figure n°17 : Variations des formes moléculaires circulantes de la PTH chez les sujets sains et les sujets insuffisants rénaux (42)

La composition des formes circulantes de PTH varie en fonction de la présence d'une pathologie rénale associée et de leur reconnaissance par les anticorps utilisés dans les dosages. Ainsi chez des individus sains, avec une technique de 1<sup>ère</sup> génération, seulement 5 à 18 % de la PTH reconnue est de la PTH 1-84 alors que cette proportion atteint 80 % avec un test de 2<sup>ème</sup> génération et 93 % avec ceux de la 3<sup>ème</sup> génération. Chez les individus présentant une insuffisance rénale, la PTH 1-84 représente respectivement 2 %, 5 %, 55 % et 85 % selon la technique de dosage. Les fragments reconnus par les méthodes de dosage de 3<sup>ème</sup> génération sont des fragments N-terminaux, seuls fragments pouvant réagir avec ces dosages.

Avec le développement des techniques de 2<sup>ème</sup> et de 3<sup>ème</sup> génération, les formes moléculaires de PTH ont pu être correctement identifiées.

Ainsi, 4 entités ont été mises en évidence (figure n°18) :

- la PTH 1-84 : forme originelle de l'hormone
- les fragments C-terminaux (formes moléculaires débutant en position 34, 37, 38 ou 45 et ne possédant pas de portion amino-terminale)
- les formes non-(1-84) PTH (fragments C-terminaux avec une structure amino-terminale préservée partiellement, débutant en position 4, 7, 10 ou 15, souvent appelés PTH 7-84 en raison de la présence d'une majorité de forme moléculaire débutant en position 7)
- la N-PTH (forme correspondant à une molécule de PTH 1-84 phosphorylée sur une sérine en position 17) est reconnue par certains kits de dosages de 2<sup>ème</sup> génération seulement, en fonction de l'épitope de révélation utilisé et est également détectée par les dosages de 3<sup>ème</sup> génération. Présente chez les individus sains, elle est produite en proportion plus importante dans l'hyperparathyroïdie primaire et le carcinome parathyroïdien (45).

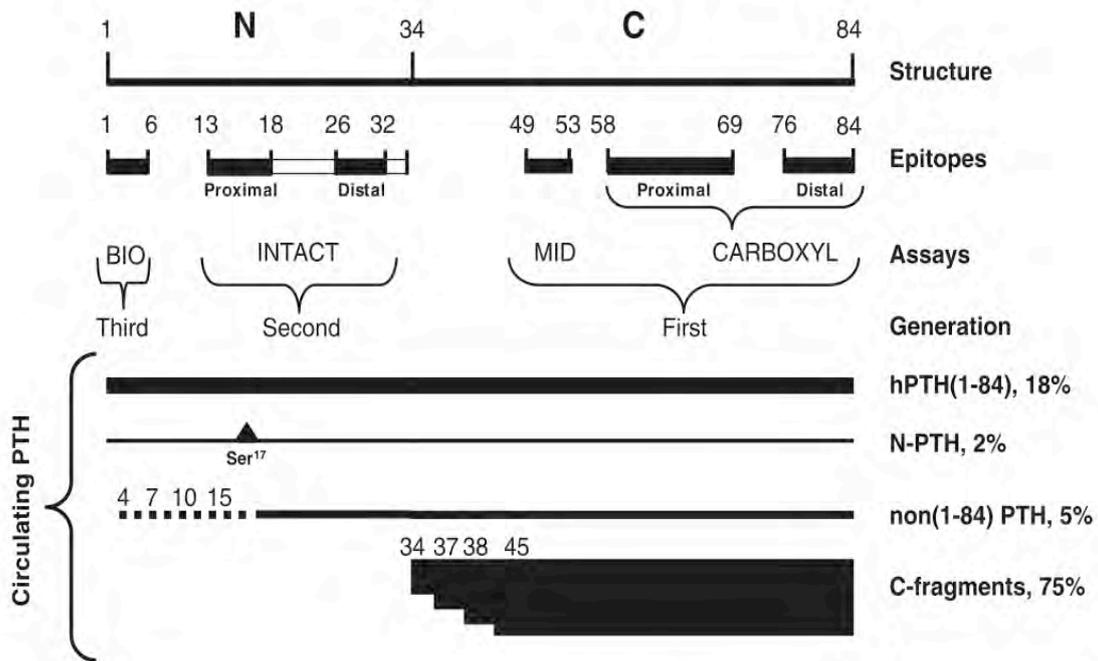


Figure n°18 : Fragments de PTH reconnus en fonction de la technique de dosage utilisée et des épitopes reconnus (42)

Les dosages de 1<sup>ère</sup> génération reconnaissant toutes les formes moléculaires de PTH ont permis de décrire et de quantifier les différentes formes moléculaires.

Ainsi, chez un individu sain, les pourcentages respectifs de chaque forme par rapport à l'ensemble des formes circulantes sont pour :

- la PTH 1-84 : 18 %
- la N-PTH : 2 %
- les fragments non-(1-84) PTH : 5 %
- les fragments C-terminaux : la grande majorité avec 75 %.

Il faut également noter que la N-PTH n'est pas détectée par tous les kits de dosages de 2<sup>ème</sup> génération, en effet ceux utilisant un anticorps de révélation dirigé contre un épitope comprenant la sérine en position 17 ne seront pas en mesure de la doser.

Il a été également démontré que ces formes moléculaires sont retrouvées dans des proportions différentes en fonction de la situation clinique (figure n°19) :

- hypercalcémie d'origine non parathyroïdienne :

la PTH 1-84 existe en quantité plus faible mais les formes C-terminales sont maintenues à un taux élevé ce qui conduit à un ratio C-PTH/PTH 1-84 augmenté. Cela reflète l'adaptation des glandes parathyroïdes devant une hypercalcémie chronique et explique le chevauchement des valeurs que l'on observe, avec les kits de dosages reconnaissant les formes C-terminales, entre hyperparathyroïdie primaire et hypercalcémie d'origine non parathyroïdienne.

- hyperparathyroïdie primaire :

chez les patients présentant une hyperparathyroïdie primaire, le seuil de la concentration en calcium au delà duquel la sécrétion de PTH est stoppée est augmenté. Mais l'évolution du ratio C-PTH/PTH 1-84 reste identique à celui d'un sujet normal. Une hypersécrétion de N-PTH a été décrite dans l'hyperparathyroïdie primaire mais aussi secondaire sans que le mécanisme exact ne soit élucidé.

- hyperparathyroïdie secondaire à une insuffisance rénale :

chez les patients dialysés, on observe une accumulation des formes C-PTH (longues et courtes) d'autant plus importante que la pathologie rénale est avancée. En effet, au stade terminal, les fragments C-terminaux représentent jusqu'à 95 % de la PTH circulante (figure n°17). La sécrétion des différentes formes de PTH varie en fonction du degré d'hypocalcémie. Le ratio C-PTH/PTH 1-84 est plus bas en présence d'une hyperparathyroïdie sévère que modérée.

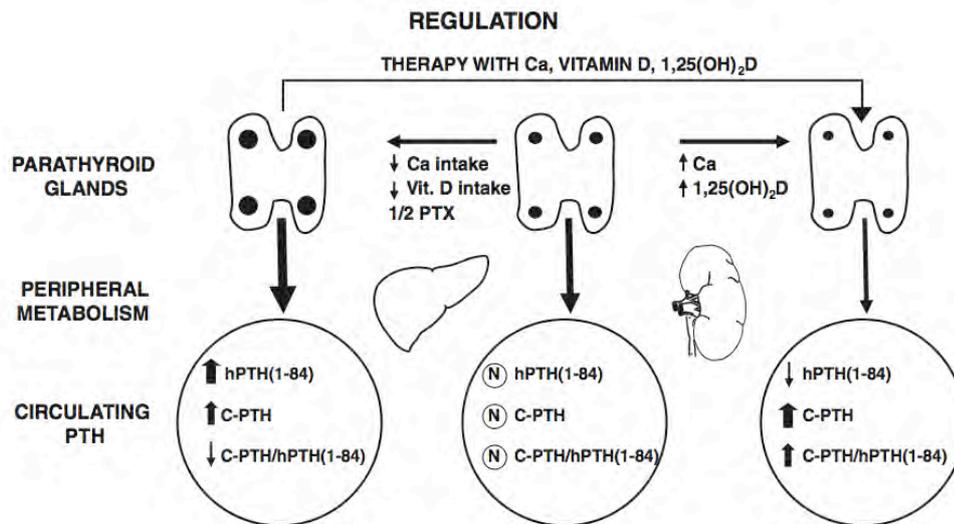


Figure n°19: Formes circulantes de PTH en fonction du type de pathologie parathyroïdienne (42)

Le tableau n°4 présente la synthèse des éléments qui ont été abordés ci-dessus ainsi que les différentes dénominations retrouvées dans la littérature.

		1 <sup>ère</sup> génération	2 <sup>ème</sup> génération	3 <sup>ème</sup> génération
<b>1-84 PTH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTH intacte</li> <li>• «cyclase activating PTH» (CAP)</li> <li>• «whole PTH»</li> </ul>	Oui	Oui	Oui
<b>non 1-84 PTH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7-84 PTH</li> <li>• «cyclase inactive PTH» (CIP)</li> </ul>	Oui	Oui (mais réactions croisées possible selon les kits)	Non
<b>fragments C-terminaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTH C-terminale</li> <li>• tout fragment ne comprenant pas la portion 1-34</li> </ul>	Oui	Non	Non
<b>fragments N-terminaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• amino-PTH</li> <li>• N-PTH</li> </ul>	Oui	Selon les kits de dosage, en fonction de l'épitope reconnu : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oui si portion 26-32</li> <li>• Non si portion 13-24</li> </ul>	Oui

Tableau n°4: Formes circulantes de PTH, leurs différentes dénominations et leur reconnaissance en fonction du type de dosage utilisé

## 1.2.4 Récepteurs de la PTH

Le rôle principal de la PTH est d'augmenter la calcémie.

Son action ne s'exerce qu'après liaison à l'un de ses récepteurs spécifiques, situés sur les cellules des organes cibles.

Trois récepteurs à la PTH ont été identifiés : (46)

### ***Le récepteur PTH1 (PTHR1)***

Il est responsable de la plupart des activités biologiques de la PTH. Il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et reconnaît puis lie la PTH par sa portion N-terminale (40).

Ce récepteur (figure n°20) forme un homodimère à 7 domaines transmembranaires de nature glycoprotéique et son poids moléculaire est d'environ 85000 Da (30).

Il est commun au PTHrP qui va induire les mêmes actions biologiques que la PTH.

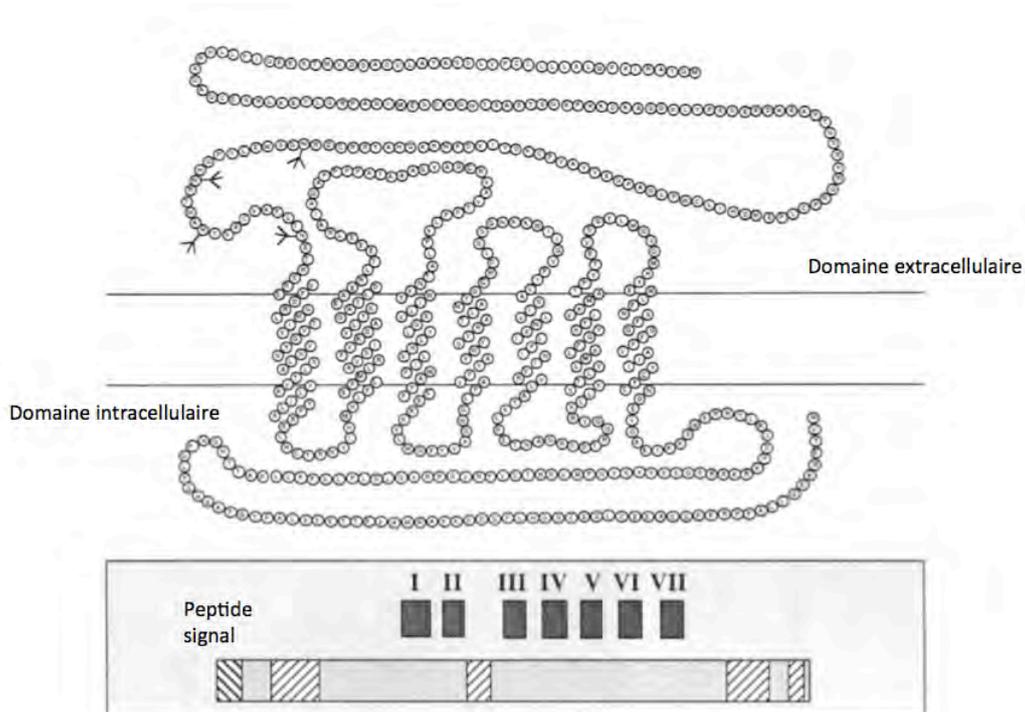


Figure n°20 : Représentation schématique du récepteur de type 1 de la PTH (33)

### ***Le récepteur PTH2 (PTHR2)***

Il fait également partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est exprimé dans le SNC, les testicules et le placenta mais surtout dans le pancréas, les cellules parafolliculaires de la thyroïde et les cellules endocrines du tube digestif.

Il présente 70% d'homologie avec le PTHR1 mais il semblerait que la PTH ne soit pas son ligand naturel. Quant à la PTHrP, elle ne se fixe pas sur le PTHR2.

Et son rôle physiologique est encore non élucidé.

### ***Le récepteur PTH3 (PTHR3)***

Il n'a été identifié que chez le poisson zèbre (46).

### ***Fixation de la PTH à son récepteur***

La fixation de la PTH (figure n°21) à son récepteur au niveau des principaux organes cibles (os et rein) entraîne la modification de différentes activités enzymatiques : l'adényl cyclase (avec production d'AMP cyclique) et la phospholipidase C (avec production d'inositol triphosphate - IP3) (47).

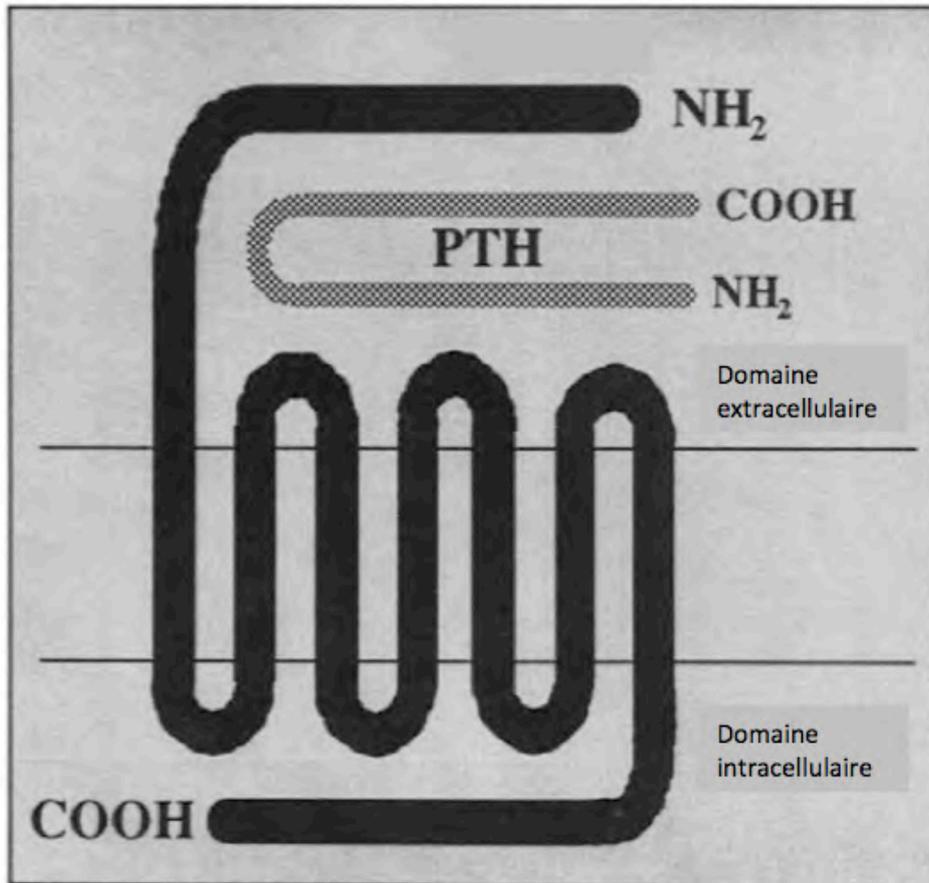


Figure n°21 : Représentation schématique de la liaison de la PTH à son récepteur (33)

La région carboxy-terminale du ligand se lie à la portion amino-terminale du récepteur (au niveau du domaine extracellulaire) alors que la partie amino-terminale du ligand interagit avec les hélices transmembranaires et la boucle extracellulaire.

### 1.2.5 Actions

#### *Au niveau de l'os*

Les récepteurs sont situés au niveau des ostéoblastes (et non des ostéoclastes) (47).

En réponse à une hypocalcémie, la PTH va entraîner une ostéolyse superficielle permettant la libération de calcium ionisé par l'intermédiaire des ostéocytes. Le but étant d'établir un flux de calcium entre le compartiment osseux et le secteur extracellulaire. Il persistera tant que la calcémie ne sera pas corrigée. Elle va également provoquer une augmentation de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes pour stimuler le remodelage osseux.

La PTH va donc provoquer une mobilisation du calcium (action à court terme) puis une activation du remodelage osseux (à plus long terme) (30).

Elle va également avoir un effet anabolique sur l'os par la production locale d'IGF1 (cette propriété est d'ailleurs maintenant utilisée en clinique dans le traitement de certaines formes d'ostéoporose) (40).

### ***Au niveau du rein***

La PTH exerce 3 actions principales :

- elle diminue la réabsorption tubulaire proximale des phosphates (augmente donc la phosphaturie et diminue la phosphatémie)
- elle augmente la réabsorption tubulaire distale du calcium (augmente donc la calcémie et diminue la calciurie)
- elle augmente l'activité de la  $1\alpha$ -hydroxylase rénale (permet la transformation de la 25(OH) vitamine D (calcidiol) en  $1,25(\text{OH})_2$  vitamine D (calcitriol) au niveau des cellules du tube proximal).

### ***Au niveau de l'intestin***

La PTH agit indirectement. En fait, c'est le calcitriol qui agira sur les entérocytes pour augmenter l'absorption du calcium et du phosphore (40) et qui agira également sur la synthèse d'ARN messager de la prépro-PTH.

Les actions de la PTH sur les différents organes cibles sont présentées dans la figure n°22.

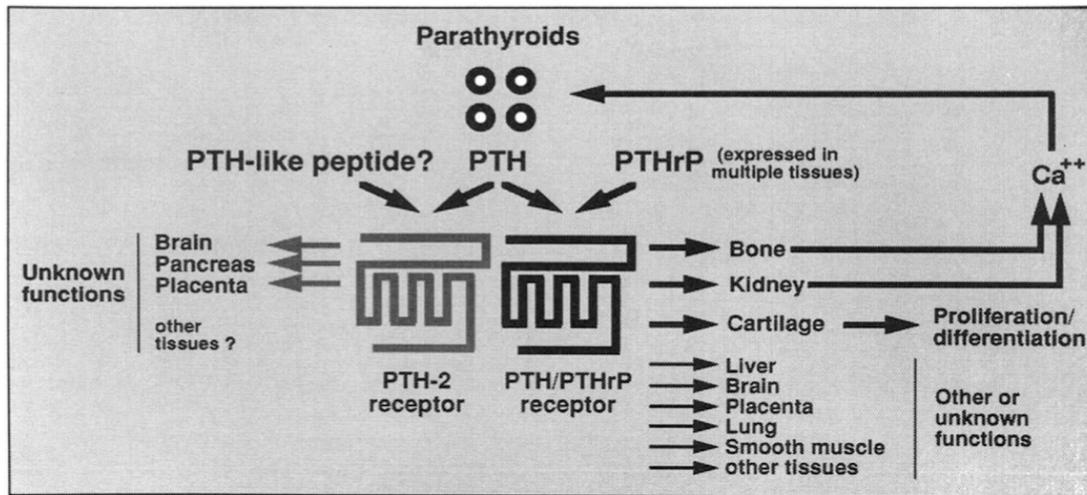


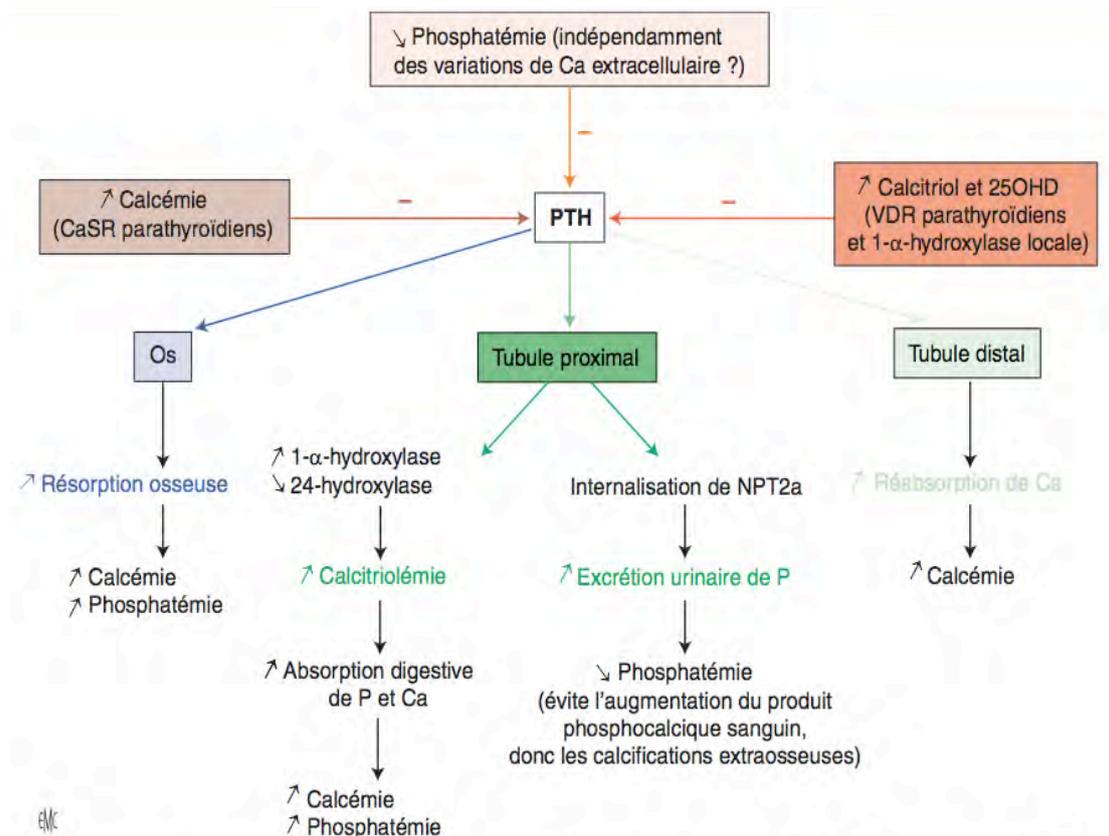
Figure n°22 : Schéma des actions de la PTH sur les organes cibles (33)

La PTH se différencie de la *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), sécrétée par de nombreux tissus fœtaux ou adultes, qui comprend 8 des 13 premiers acides aminés de la portion N-terminale de la PTH. La PTHrP peut se lier aux récepteurs de la PTH et induire les mêmes effets biologiques (48).

Elle est présente sous 3 isoformes comprenant 139, 141 ou 179 acides aminés. La synthèse de PTHrP en excès par certaines tumeurs est responsable de l'hypercalcémie humorale maligne (46).

Par contre, la PTHrP n'est pas détectée par les dosages de PTH, une technique spécifique est disponible pour son évaluation.

La PTH est donc une hormone hypercalcémiant et hypophosphatémiant dont la synthèse est soumise à une régulation complexe (figure n°23).



P : phosphate ; Ca : calcium ; VDR : récepteur à la vitamine D

Figure n°23 : Schéma récapitulatif de la synthèse et des actions de la PTH (1)

### 1.2.6 Indications du dosage

Le dosage de la PTH peut être indiqué devant différentes situations pathologiques mais sera toujours associé à la mesure concomitante de la calcémie (ionisée ou corrigée). En effet, une valeur de PTH ne s'interprète que par rapport à la calcémie.

#### ***Hyper- et hypocalcémie***

Il est nécessaire au diagnostic étiologique d'une hyper- ou d'une hypocalcémie mais également pour la recherche d'anomalie osseuse chez les patients insuffisants rénaux, le bilan d'une ostéoporose ou en peropératoire pour le suivi de l'ablation d'une ou de plusieurs glandes parathyroïdes.

Devant une hypercalcémie ou une hypocalcémie, le dosage de la PTH est l'examen à réaliser en première intention pour orienter le diagnostic. Les schémas du chapitre « 1.1.1 Calcium » reprennent les démarches d'exploration à suivre devant ces situations.

Par exemple, l'association d'une hypercalcémie avec une PTH dans la moitié haute des valeurs normales (ou de concentration franchement anormale) permet de poser le diagnostic d'hyperparathyroïdie primitive (HPP), 3<sup>ème</sup> endocrinopathie la plus fréquente.

### ***Ostéoporose***

Lors de la découverte d'une ostéoporose, un bilan du métabolisme phosphocalcique doit être prescrit et seulement en 2<sup>ème</sup> intention, devant des désordres de ce métabolisme, un dosage de la PTH est recommandé. Il aidera à la recherche d'une cause d'ostéoporose secondaire.

### ***Insuffisance rénale***

Chez les patients en insuffisance rénale (dialysés ou non), la PTH est dosée régulièrement pour rechercher et caractériser « une ostéodystrophie rénale » (ODR).

### **KDOQI**

En 2003, les néphrologues ont publié une série de recommandations (cliniques, biologiques et thérapeutiques) pour le suivi des patients insuffisants rénaux et notamment pour le métabolisme minéral et osseux de ces patients : les *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI).

Les valeurs biologiques à suivre sont : la phosphatémie, la calcémie corrigée, le produit phosphocalcique et la PTH (avec comme valeur cible l'intervalle 150-300 pg/mL).

## **KDIGO**

En 2009, devant la publication de nombreux articles apportant de nouvelles connaissances sur l'insuffisance rénale, les recommandations du KDOQI ont été remplacées par celles du KDIGO (*Kidney Disease : Improving Global Outcomes*) (49). Le terme d'ostéodystrophie n'est plus à employer qu'en cas d'atteinte histologique de l'os et ne représente donc plus que la partie squelettique de troubles plus généralisés.

Le concept d'ODR est donc remplacé par les « troubles du métabolisme minéral et osseux » (en anglais *Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disease*).

Un certain nombre de nouvelles recommandations concernant la biologie médicale sont introduites :

- le laboratoire doit communiquer au prescripteur la technique de dosage de la PTH (ainsi que tout changement intercurrent) ; en effet, il existe une grande variabilité des résultats selon les kits utilisés (entre les dosages de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération mais également entre les kits d'une même génération) ce qui peut entraîner des erreurs d'interprétation (diagnostique ou de suivi)
- des modifications de valeurs cibles pour la phosphatémie et la calcémie selon les stades
- de nouvelles analyses sont recommandées (phosphatase alcaline totale et osseuse, statut vitaminique D)
- et surtout, au stade 5D, les cibles de PTH recommandées sont maintenant entre deux et neuf fois la limite supérieure de la trousse de dosage utilisée ce qui constitue une amélioration importante par rapport au KDOQI (50).

## **HAS**

L'HAS, quant à elle, recommande le dosage de la PTH tous les 6 mois au stade 4 (Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) entre 15 et 29), tous les 3 mois au stade 5 avant épuration extra rénale (DFG < 15) mais seulement en fonction de la concentration initiale et de sa progression pour le stade 3B (DFG entre 30 et 44).

## ***Dosage peropératoire***

Lors d'une parathyroïdectomie le chirurgien s'aide d'un monitoring peropératoire de la mesure de la PTH pour vérifier le succès de l'opération.

### ***Préconisation d'une méthode de dosage en fonction de l'indication***

Actuellement, deux grands principes de dosages sont commercialisés : les dosages de 2<sup>ème</sup> et de 3<sup>ème</sup> génération. Selon l'indication du dosage de la parathormone, il pourrait être intéressant de préconiser l'une ou l'autre de ces méthodes.

Dans le cadre de l'insuffisance rénale chronique, les avis sont partagés ; certains auteurs préconisent l'utilisation du ratio PTH 1-84/« non 1-84 PTH » pour différencier les troubles du métabolisme minéral et osseux, d'autres n'en voient pas l'utilité. La question est de savoir si les techniques de 3<sup>ème</sup> génération ont une meilleure sensibilité dans le diagnostic des différents types d'ostéodystrophie rénale par rapport à celles de 2<sup>ème</sup> génération.

En 2001, Monier-Faugère et al. ont publié un article dans *Kidney International* (51) qui a attiré particulièrement l'attention de la communauté scientifique. Dans cette étude, ils ont comparé, chez 51 patients hémodialysés, le ratio PTH 1-84/« non 1-84 PTH » avec les résultats de la biopsie osseuse. Ils découvrent que tous les patients présentant un turn-over osseux diminué ont un ratio PTH 1-84/« non 1-84 PTH » < 1 et proposent donc de l'utiliser comme outil diagnostique pour identifier les différents types d'ostéodystrophie rénale.

Par la suite, d'autres auteurs (Coen (52) en 2002, Salusky (53) en 2003 et Lehmann (54) en 2005) ont publié leurs travaux sur le sujet. Mais aucune conclusion ne va dans le sens de celle de Monier-Faugère. Ils n'ont retrouvé aucune supériorité des dosages de 3<sup>ème</sup> génération dans cette indication.

A ce jour, aucun texte officiel ne recommande l'utilisation des dosages de 3<sup>ème</sup> génération en néphrologie clinique. D'autres études, avec notamment des comparaisons avec la biopsie osseuse, seront donc nécessaires pour justifier d'une utilisation quotidienne des techniques de dernière génération dans cette indication.

Pour le monitoring de la PTH lors d'une parathyroïdectomie, un dosage de 3<sup>ème</sup> génération pourrait être préférable. En effet, selon Yamashita, après exérèse, la PTH 1-84 aurait une décroissance plus rapide que la « non 1-84 PTH » (55).

Pour le diagnostic d'HPP, Eastell et al. ont publié en 2009 (56) des préconisations dans le cadre du diagnostic des hyperparathyroïdies primaires asymptomatiques. Après avoir effectué une revue de la littérature (4 études seulement ont comparé la sensibilité des dosages de 2<sup>ème</sup> et de 3<sup>ème</sup> génération), ils en sont arrivés à la conclusion qu'il n'y avait pas de différence significative entre ces 2 techniques de dosage pour le diagnostic biologique d'hyperparathyroïdies primaires asymptomatiques.

Des données récentes sur la forme N-PTH (phosphorylée sur la sérine 17) qui représentent 10 % de la PTH chez le sujet normal indiquent qu'elle serait augmentée de manière importante dans certaines formes d'HPP et dans le carcinome parathyroïdien (45). Or cette amino-PTH est principalement reconnue par les dosages de 3<sup>ème</sup> génération.

Cavalier trouve dans une population de 24 patients atteints d'un carcinome parathyroïdien un ratio PTH 1-84/« non 1-84 PTH » < 1. Ce ratio est normalement inversé chez les individus sains (ce qu'il a démontré chez 245 sujets témoins). L'utilisation d'une technique de dosage de 3<sup>ème</sup> génération est donc selon lui dans ce cas de figure particulièrement indiquée (57).

### **1.3 Méthodes de dosage**

Depuis les années 1960, différents dosages ont été mis sur le marché pour l'évaluation de la PTH.

Les dénominations attribuées à ces dosages reconnaissant des formes moléculaires différentes sont à l'origine d'un problème de sémantique qui peut être source d'erreurs d'interprétation des valeurs par les cliniciens, présentées dans le tableau n°4 « Formes circulantes de PTH, leurs différentes dénominations et leur reconnaissance en fonction du type de dosage utilisé ».

### **1.3.1 Conditions pré-analytiques : tubes et température de transport**

L'importance des modalités de prélèvements, de conservation et de transport des échantillons en vue d'un dosage de PTH est décrite dans la littérature depuis plus de 20 ans.

Ces modalités pré-analytiques conditionnent les résultats et ne sont pas à négliger d'autant plus que la PTH est une hormone fragile à demi-vie courte avec une dégradation en fragments interférant dans les dosages.

Pour les dosages de 1<sup>ère</sup> génération, le problème ne se pose plus car la commercialisation est arrêtée.

Pour les dosages de 2<sup>ème</sup> génération, de nombreuses études se sont attachées à définir l'importance du tube à utiliser pour le dosage (tube sec, tube avec EDTA (+/- aprotinine), tube hépariné ou tube citrate) et des conditions de température et de durée de conservation des échantillons.

En 2002, De Talancé (58) publie les résultats d'une étude dont le but était de vérifier sur une population de patients hémodialysés (n=11) que l'attente avant la phase analytique des prélèvements reçus par le laboratoire n'altérerait pas la qualité du résultat.

Les dosages ont été réalisés avec le kit ELSA PTH de Cis Bio International (dosage de 2<sup>ème</sup> génération).

Pour les échantillons de sérum, elle met en évidence une baisse de la concentration de PTH d'environ 30% pour les tubes conservés 24h à température ambiante par rapport aux tubes conservés à + 4°C.

A contrario, les taux sont stables si les prélèvements sont conservés à + 4°C.

Elle montre également que la centrifugation 24h après le prélèvement entraîne une baisse de la concentration de PTH d'environ 10% mais ne retrouve pas de différence significative entre dosage sur sérum ou plasma EDTA.

Joly, en 2008 (59), groupe de travail de la SFBC, a défini les conditions de prélèvement et de conservation avant analyse avec 6 automates (méthode de

dosage de 2<sup>ème</sup> génération), à partir de 3 types d'échantillon (sérum, plasma EDTA et plasma citraté) et en comparant les valeurs de dosage réalisés immédiatement après décongélation et 18h après décongélation.

Les conclusions tirées de son travail sont résumées dans le tableau n°5.

	<b>Sérum</b>	<b>Plasma EDTA</b>	<b>Plasma citraté</b>
<b>Stabilité de la PTH 4h à TA</b>	Bonne	Bonne	Bonne
<b>Stabilité de la PTH 18h à TA</b>	Variation maximale (diminution) de 20%	Variation maximale (augmentation) de 12%	Variation maximale (augmentation) de 13%
<b>Stabilité de la PTH 24h à + 4°C</b>	Bonne	Bonne	Non testée
<b>Possibilité de dosage du calcium dans le même échantillon</b>	Oui	Non	Non
<b>Remplissage correct (&gt; 50%) du tube obligatoire</b>	Non	Oui	Non testée
<b>Délai d'attente avant centrifugation</b>	Oui (30 minutes)	Non	Non

Tableau n°5 : Avantages et inconvénients en fonction du type de tube utilisé pour le dosage de la PTH (59)

En pratique, il recommande l'utilisation de tube sec pour réaliser le dosage de la PTH sur sérum.

Parent et Souberbielle (60), en 2009, devant l'éloignement fréquent des centres de dialyse des laboratoires de biologie médicale, ont étudié la stabilité de la PTH à partir de prélèvements non décantés, conservés 18h à température ambiante ou à + 4°C pour pouvoir définir les conditions dans lesquelles les tubes doivent être conservés avant leur transport à J+1.

Selon eux, les conditions idéales de conservation pré-analytique sont les suivantes :

- échantillon sanguin adressé rapidement (dans la 1/2h) au laboratoire
- centrifugé (30 min après le prélèvement pour la formation du caillot si tube sec ou immédiatement si tube EDTA)

- puis décanté et congelé (à - 20°C) jusqu'au dosage.

Leur protocole de travail a été le suivant :

- les prélèvements d'échantillons chez 31 patients avant leur séance de dialyse sont utilisés pour l'étude et comprennent pour chaque patient quatre types de tube :
  - tube sec avec gel séparateur
  - tube EDTA
  - tube EDTA + aprotinine (antiprotéase)
  - tube sec sans gel supplémentaire qui sera « centrifugé-aliquoté-congelé » immédiatement et pris comme « tube de référence »
- l'ouverture du tube et la décantation sont réalisées par du personnel de laboratoire (et non des soignants)
- pour chaque groupe : prélèvement des 3 tubes spécifiques du groupe avec
  - tube 1 « centrifugé-aliquoté-congelé » immédiatement
  - tube 2 centrifugé uniquement pour le groupe « gel » et conservé 18h à + 4°C puis « centrifugé-aliquoté-congelé »
  - tube 3 centrifugé uniquement pour le groupe « gel » et conservé 18h à température ambiante puis « centrifugé-aliquoté-congelé »
- l'étude de l'impact de la nature du tube a été faite avec 3 automates différents en comparant les valeurs de PTH entre les aliquotes des tubes 1 avec celles des tubes de référence
- l'étude de l'influence des conditions de conservation a également été faite avec 3 automates en comparant les valeurs de PTH obtenues à partir des aliquotes des tubes 2 et 3 par rapport au tube 1
- les 3 automates (techniques automatisées de 2<sup>nde</sup> génération) utilisés sont :
  - Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Meylan, France)
  - Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics SAS, Puteaux, France)
  - Liaison (DiaSorin SA, Antony, France).

La figure n°24 résume les conditions de réalisation de l'étude.

31 patients hémodialysés ; prélèvement sanguin avant séance de dialyse

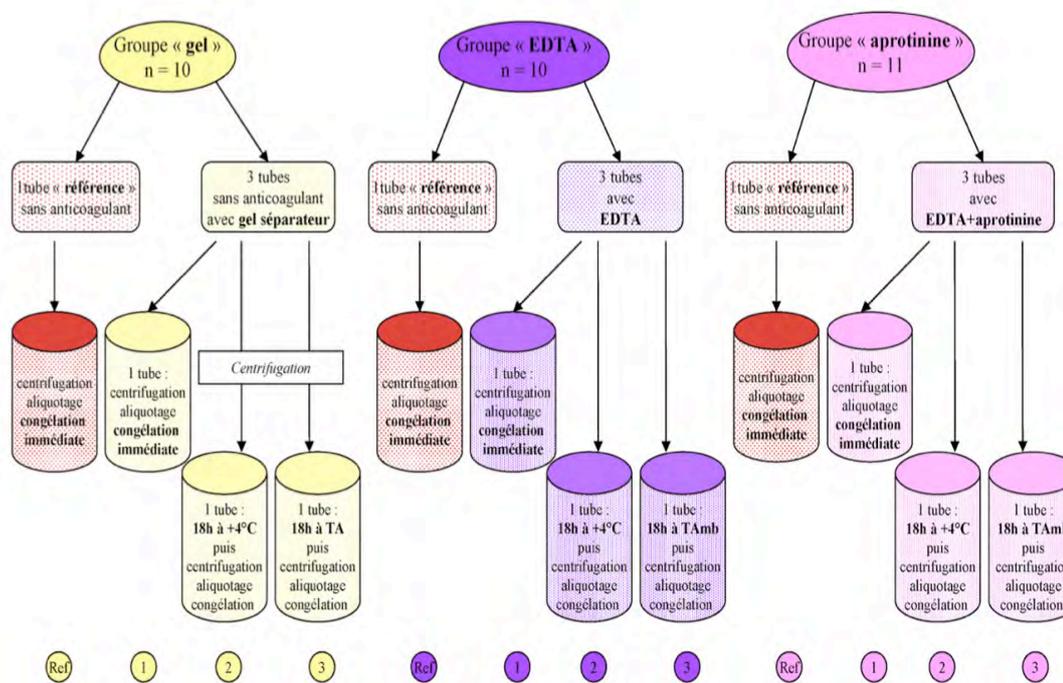


Figure n°24 : Protocole de travail de l'étude de Parent et Souberbielle (60)

Ils arrivent aux conclusions suivantes :

- les échantillons primaires non décantés et conservés 18h à température ambiante subissent une altération de la valeur de la concentration de PTH (diminution ou augmentation) dont l'intensité dépend à la fois du type de tube et de la technique utilisée
- pour les échantillons conservés à + 4°C, quel que soit le tube utilisé, la concentration de PTH n'est pas, ou très peu, altérée
- l'ajout d'une antiprotéase n'a pas d'intérêt si le tube est conservé à + 4°C (avantage important en terme de coût).

## ***Type de tube préconisé***

### Plasma EDTA :

Les avantages sont :

- un traitement plus rapide de l'échantillon (centrifugation immédiate)
- une meilleure conservation à température ambiante.

Les inconvénients sont :

- tubes à remplir à plus de 50 % du volume
- moins bonne corrélation intertechnique sur tube EDTA (déjà retrouvé par d'autres auteurs : 61, 62, 63, 64)
- de plus les concentrations obtenues sont majorées jusqu'à 10 à 20% selon les techniques lorsque l'on emploie le plasma EDTA par rapport au sérum (61, 62), il faut donc bien vérifier que l'intervalle de référence utilisé corresponde au type d'échantillon analysé (65)
- enfin, le dosage du calcium ne peut pas être réalisé à partir du même prélèvement.

### Sérum :

L'avantage est :

- possibilité de réaliser d'autres analyses sur le même prélèvement (Ca ionisé demandé systématiquement avec la PTH, phosphore, créatinine, ionogramme, ...)

Les inconvénients sont :

- attendre 30 à 45 min avant centrifugation (formation du caillot)
- centrifugation sur site si tube avec gel séparateur (60)
- risque de présence de fibrine qui interfère avec le dosage si la centrifugation est trop précoce.

### Ajout d'antiprotéase :

L'ajout d'antiprotéase n'est pas nécessaire (58,60), la PTH ne subissant pas de protéolyse à + 4°C comme à - 20°C.

### ***Mode de conservation (température et durée)***

La conservation des échantillons préconisée par la plupart des auteurs est de 6h maximum à température ambiante avant la congélation pour un dosage de 2<sup>ème</sup> génération (66) comme de 3<sup>ème</sup> génération (67, 68).

Une précision est toutefois importante à prendre en compte si les délais d'acheminement des échantillons sont longs entre les lieux de prélèvement et le laboratoire : Souberbielle (65) rappelle en 2006 que les tubes EDTA sont à préférer aux tubes secs si le délai est long avant congélation.

Pour le dosage de la PTH avec la méthode Liaison 1-84 PTH de chez DiaSorin, le fournisseur précise dans sa notice d'utilisation qu'une durée de 7h à température ambiante et de 24h entre + 2 et + 8°C ne doit pas être dépassée, ce qui est confirmé par Gao (67). Il étudie la stabilité de la concentration de PTH évaluée à partir de 3 types de prélèvement (sérum, plasma EDTA et plasma hépariné) à 2 températures différentes (+ 2 à + 8°C et température ambiante) jusqu'à 64h (figure n°25).

Il conclut que les échantillons de plasma EDTA ou hépariné peuvent être conservés soit à température ambiante soit entre + 2 et + 8°C mais pour un maximum de 24h (moins de 5 % de dégradation), quant aux échantillons de sérum, un maximum de 6h à température ambiante et 24h entre + 2 et + 8°C doit être respecté.

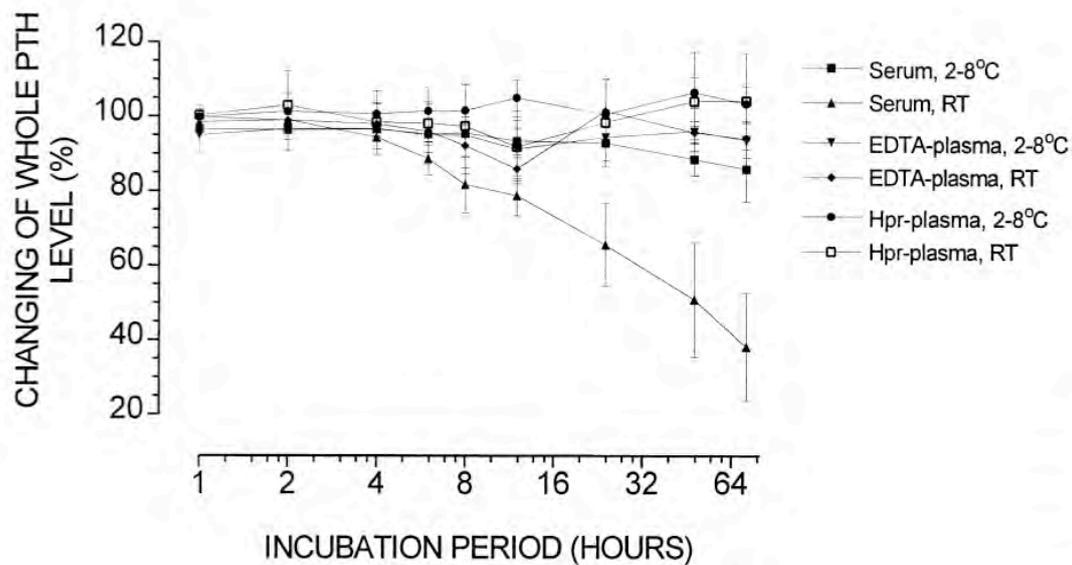


Figure n°25 : Stabilité des échantillons selon le type de tube, la température et la durée de conservation (étude de Gao, 67)

Inaba (68) observe des concentrations de PTH stables jusqu'à 7 jours à + 4°C et plus de 28 jours à - 20 ou - 80°C alors qu'à température ambiante (+ 25°C) les résultats de concentration de PTH sont très rapidement altérées (diminution), mais la technique qu'il a utilisée n'est actuellement plus commercialisée.

#### Cycles de congélation-décongélation :

Selon les auteurs, plusieurs cycles peuvent être supportés. 4 selon Gao et Souberbielle (67,69) et jusqu'à 6 pour Inaba. (68)

Les préconisations pré-analytiques des principaux fabricants de kits de dosage de la PTH sont présentées dans le tableau n°6.

Fabricant	Référence	Génération de dosage	Tube de prélèvement	Température de stockage et délai avant analyse	Cycle(s) de congélation/décongélation
<b>Beckman Coulter</b>	Intact PTH	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (hépariné ou EDTA)</li> <li>décanter dans les 2h suivant la centrifugation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pour plasma : 8h à TA, 48h entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> <li>pour sérum : 4h à TA, 8h entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> </ul>	3 maximums
<b>Cis Bio</b>	ELSA-PTH	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum de préférence sinon plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 mois à -20°C</li> </ul>	à éviter
<b>DiaSorin</b>	1-84 PTH	3 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (EDTA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>7h à TA, 24h entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> </ul>	3 maximums
	N-tact PTH	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (EDTA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8h à TA, 48h entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> </ul>	3 maximums
<b>Diasource</b>	hPTH-EASIA	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8h entre +2 et +8°C</li> <li>-20°C au delà</li> </ul>	à éviter
	hPTH-120 min-IRMA	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (hépariné ou EDTA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8h entre +2 et +8°C</li> <li>-20°C au delà</li> </ul>	à éviter
<b>Laboratoire Scantibodies</b>	Total Intact PTH (tubes)	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (EDTA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>à -20°C</li> <li>ne pas conserver à TA ni entre +2 et +8°C</li> </ul>	2 maximums
	Total Intact PTH (billes)	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>48h entre +2 et +8°C</li> <li>au delà -20°C</li> </ul>	2 maximums
	Whole PTH (1-84)	3 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>48h entre +2 et +8°C</li> <li>au delà -20°C</li> </ul>	2 maximums
	Duo PTH Kit	2 <sup>ème</sup> /3 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2h entre +2 et +8°C</li> <li>au delà -20°C</li> </ul>	2 maximums
<b>Roche</b>	PTH Intacte	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (EDTA)</li> <li>préférer le plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pour plasma : 2j à TA, 3j entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> <li>pour sérum : 8h à TA, 2j entre +2 et +8°C et 6 mois à -20°C</li> </ul>	non précisé
	PTH (1-84)	3 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (hépariné ou EDTA)</li> <li>préférer le plasma EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pour plasma EDTA : 24h à TA, 48h entre 2 et 8°C et 6 mois à -20°C</li> <li>pour plasma hépariné : 24h à TA, 48h entre +2 et +8°C et 3 mois à -20°C</li> <li>pour sérum : 7h à TA, 24h entre +2 et +8°C et 3 mois à -20°C</li> </ul>	non précisé
<b>Tosoh</b>	ST AIA-PACK Intact PTH	2 <sup>ème</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>sérum ou plasma (EDTA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>24h entre +2 et +8°C</li> <li>au delà -20°C</li> </ul>	à éviter

Tableau n°6 : Conditions pré-analytiques préconisées selon les fabricants des principaux kits de dosages disponibles en France

### **1.3.2 Standards internationaux**

Le seul standard international destiné aux dosages de PTH a été préparé en 1981 par le « National Institute for Biological Standards and Control » (NIBSC) de Londres à partir de PTH humaine intacte (hPTH 1-84) extraite et purifiée à partir de glandes parathyroïdiennes (43). Identifiée par le code 79/500 du WHO (World Health Organisation), cette préparation a démontré l'hétérogénéité des résultats obtenus à cette époque par les différentes trousse disponibles (« maison » ou du commerce d'ailleurs) (70).

Selon la fiche technique disponible sur le site du NIBSC, chaque ampoule contient 100 ng ou 10 pmol de PTH humaine (ou 0,1 unité internationale).

Le rapport du contrôle de marché du dosage de la PTH de l'Afssaps de 2009 (71) rappelle les recommandations de la directive 98/79/CE relative à la conception des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro : ils doivent être conçus selon « l'état de l'art » et utiliser des matériaux d'étalonnage de référence de niveau supérieur. Il fait également le point sur les types de standardisation indiqués dans les notices des dispositifs analysés (tableau n°7).

Sur 22 dispositifs évalués :

- 4 trousse de dosage sont étalonnées par rapport au standard WHO 79/500
- 2 le sont selon la préparation 95/646 du NIBSC contenant de la PTH recombinante
- 1 selon celle proposée par l'Institut Peptide japonais
- les autres notices, soit ne précisent pas le type de standardisation soit décrivent une autre méthode de standardisation : corrélation avec une autre méthode, gravimétrie.

Cela représente déjà une amélioration par rapport à 2005, époque à laquelle selon Souberbielle (72), aucune des techniques commercialisées et utilisées n'était calibrée avec cet étalon international. Les fabricants utilisaient alors de la PTH 1-84 synthétique d'origines diverses.

Annexe 4. Raccordement métrologique et facteur de conversion			
Fabricant	Nom du dispositif	Facteur de conversion (unité utilisée)	Raccordement métrologique
Abbott Diagnostics	Architect	pg/ml x 0,106 = pmol/l (notice calibrateurs) (pg/ml)	1st WHO 79/500
Beckman Coulter	Access Intact PTH	pg/ml x 0,106 = pmol/l (pg/ml)	Oui OMS 79/500 57 % de récupération : mode routine 53 % de récupération : mode intraopératoire
Biosource	PTH 120 min IRMA	Non précisé (pg/ml)	95/646
	hPTH-EASIA	Non précisé (pmol/l)	1 pg = 1 pg de PTH (1-84) de l'institut peptide japonais
CIS Bio International	Elsa PTH	Non précisé (pg/ml)	NIBSC 95/646 1 µg Cis Bio = 0,65 µU NIBSC 95/646
Diasorin	Liaison n TACT PTH	pg/ml x 0,106 = pmol/l (pg/ml)	Non précisé
	N-TACT-PTH SP IRMA	Non précisé (pg/ml)	Non précisé
Future Diagnostics	STAT-IOI-PTH	pg/ml x 0,105 = pmol/l (pg/ml)	Corrélation avec Nichols PTH IRMA
Immunodiagnostic Systems	Intact PTH Elisa	1 pmol/l = 9,5 pg/ml (pg/ml)	Non précisé
Laboratoires Scantibodies	Total Intact PTH - tubes	Non précisé (pg/ml)	Gravimétrique
	Whole PTH (1-84) Specific - Tubes	Non précisé (pg/ml)	Gravimétrique
	Whole PTHA (1-84) Specific - Billes	(pg/ml)	Gravimétrique
	Total Intact PTH Billes	(pg/ml)	Gravimétrique
	Duo PTH IRMA (Billes)	Non précisé (pg/ml)	Non précisé
MDSS	Intact PTH Elisa	Non précisé (pg/ml)	Corrélation avec Nichols PTH IRMA
Roche Diagnostic	PTH Intacte	pg/ml x 0,106 = pmol/l pmol/l x 9,43 = pg/ml (pg/ml ou pmol/l)	Standardisé sur un test RIA du commerce
Siemens (Bayer)	PTH Intact Advia Centaur XP/CP	pg/ml x 0,106 = pmol/l (pg/ml)	Oui 79/500 OMS Recouvrement moyen 73 % ou 62 % du standard
	PTH Intact (iPTH)ACS 180	pg/ml = 0,106 pmol/l (pg/ml)	Oui 79/500 OMS Recouvrement moyen 73 % du standard
Siemens - DPC	Immulite 2500/Stat Intact PTH	pg/ml x 0,1053 = pmol/l (pg/ml)	Non précisé
	Immulite 2000/Intact PTH	pg/ml x 0,1053 = pmol/l (pg/ml)	Non précisé
	Immulite 1000/Intact PTH	pg/ml x 0,1053 = pmol/l (pg/ml)	Non précisé
Tosoh Bioscience	ST AIA Pack Intact PTH	Non précisé (pg/ml)	Non précisé

Tableau n°7 : Raccordement métrologique (rapport Afssaps 2009) (71)

Le standard 79/500 est le seul standard international actuel sur le marché mais d'une part à cause de sa faible disponibilité et d'autre part à cause de sa difficulté d'utilisation (problèmes de reconstitution), il est aujourd'hui peu adopté par les fabricants. L'Afssaps recommande donc d'utiliser comme alternative la préparation de PTH recombinante 95/646 du NIBSC en attendant un nouveau standard international reconnu.

### **1.3.3 Dosages de 1<sup>ère</sup> génération**

#### ***Généralités***

En 1963, Solomon Berson et Rosalyn Yalow, du service des radio-isotopes du Bronx Veterans Administration Hospital à New-York mettent au point le premier dosage de l'hormone parathyroïdienne (73).

Ce dosage (figure n°26) est une méthode radioimmunologique dite par compétition avec utilisation d'un seul anticorps reconnaissant des épitopes situés dans la région « mid-C » et « C-terminale » de la PTH (74). La PTH a été obtenue à partir d'extraits de glandes parathyroïdes d'origine bovine purs couplés à de l'iode<sup>131</sup>.

Les anticorps anti-PTH sont en fait des antisérums résultant de l'injection de la même PTH bovine à des cochons d'Inde ou des lapins (73).

Ces auteurs parviennent ainsi à doser la PTH dans 2 échantillons de patients en hyperparathyroïdie (chirurgicalement prouvée) mais ne détectent pas la PTH chez 9 patients en hypoparathyroïdie. Ils décrivent également la mise en évidence de PTH dans des échantillons de plasma de patients sans pathologie parathyroïdienne connue. Leur méthode de dosage est donc une avancée très importante dans le domaine du dosage hormonal mais ne permet la détection que de taux élevés de PTH (73).

Pendant les années 70, de nombreuses équipes ont travaillé à améliorer cette technique mise au point par Berson et Yalow que l'on appellera dosage de « première génération ».

Ainsi, Claude Arnaud en 1971 a utilisé un antisérum dirigé contre la PTH porcine car il existe une meilleure réaction croisée entre PTH porcine et PTH humaine.

Le ligand reste en compétition avec la PTH bovine radiomarquée et permet donc de détecter des valeurs plus basses de PTH notamment dans les valeurs normales (75).

Les anticorps utilisés, soit produits par le laboratoire lui même soit achetés dans le commerce, étaient polyclonaux et reconnaissent le plus fréquemment des épitopes au niveau C-terminal (figure n°27), « mid-C-terminal » ou même amino-terminal (42).

Les traceurs utilisés évoluent aussi avec le temps de PTH 1-84 purifiée, marquée à l'iode 131 puis 125, ils passent à des fragments synthétiques marqués (42).

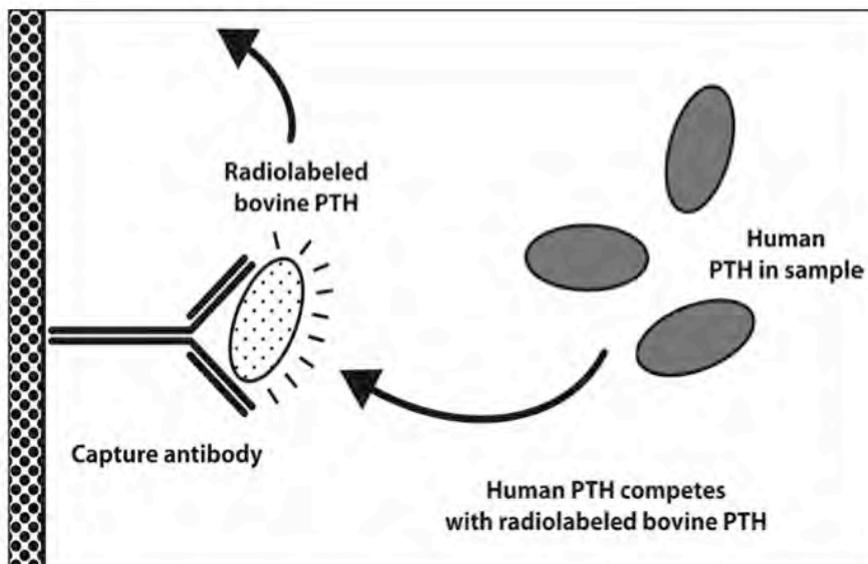


Figure n°26 : Principe du dosage de 1ère génération (76)

Rosalyn Yalow (Berson est décédé en 1972) a reçu le Prix Nobel de Médecine en 1977 pour l'ensemble de leurs travaux qui sont à l'origine de tous les dosages par techniques d'immuno-analyse (Encyclopédie Universalis).

Cette première génération de dosage a donc été très importante pour poser les bases du dosage de la PTH. Elle a permis également de mieux comprendre le métabolisme phospho-calcique, de décrire et de prouver l'hétérogénéité des formes circulantes de la PTH, il a ainsi été démontré que chez l'homme 20% des formes circulantes sont de la PTH 1-84 et 80% sont des fragments C-terminaux. Ces fragments C-terminaux débutent chez l'homme en position 34, 37, 38 ou 45 et ne contiennent donc pas de région amino-terminale (région active biologiquement) (42).

Les inconvénients de la méthode sont nombreux :

- elle détecte de nombreux fragments C-terminaux ou de la région médiane de la PTH qui sont éliminés par le rein et s'accumulent chez les patients insuffisants rénaux et dialysés. De ce fait, on retrouvait chez les patients ayant une insuffisance rénale traitée par hémodialyse des concentrations presque systématiquement surestimées même pour des patients présentant une ostéopathie adynamique documentée par une biopsie osseuse (et qui devraient avoir une PTH normale ou basse) ce qui limite son intérêt clinique car ces fragments n'ont pas d'activité biologique (65, 74, 76).
- la difficulté à produire des anticorps ayant une bonne sensibilité analytique et une spécificité définie rendait compliqué de différencier valeurs basses et valeurs normales (31).

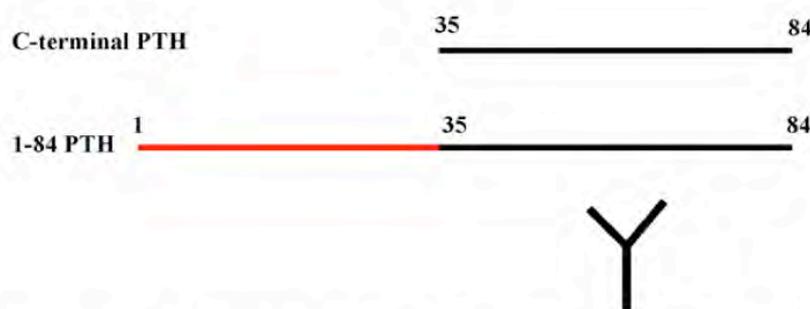


Figure n°27 : Épitope reconnu par les techniques de 1ère génération (60)

### ***Kits disponibles***

Cette première génération est donc aujourd'hui totalement obsolète et a été remplacée par des dosages de 2<sup>ème</sup> puis de 3<sup>ème</sup> génération, il n'y a donc plus de trousse de ce type sur le marché des réactifs.

#### **1.3.4 Dosages de 2<sup>ème</sup> génération**

##### ***Généralités***

Appelé également : dosage de PTH intacte.

En 1987, Nussbaum (77) met au point en collaboration avec le Nichols Institute le premier dosage de la PTH de 2<sup>ème</sup> génération et le commercialise sous le nom de « Allegro Intact PTH Assay ».

C'est un dosage radioimmunométrique (IRMA). La méthode (figure n°28) utilise 2 anticorps purifiés, un anticorps de capture (fixe, couplé à des billes de polyester) dirigé contre la portion [39-84] de la hPTH (région C-terminale) et un anticorps de révélation (marqué à l'iode<sup>125</sup>) contre la portion [1-34] de la hPTH (région N-terminale) (77), plus précisément contre [13-24] chez Allegro Intact PTH Assay (48). L'intervalle de référence déterminé à partir de sérums de 72 sujets normaux (sans trouble du métabolisme phosphocalcique) est de 12-65 pg/mL (77).

D'autres épitopes sont reconnus par les anticorps de coffrets de réactifs développés par d'autres équipes : [12-18] PTH pour la trousse Total Intact PTH Assay de chez Scantibodies (74) ou encore un épitope plus distal en [26-32] PTH pour le dosage Elecsys de chez Roche Diagnostics.

Cette méthode immunométrique à 2 sites (ou méthode « sandwich ») ne reconnaît plus les fragments C-terminaux ou « mid-C-terminaux » détectés par les dosages de

1<sup>ère</sup> génération. Ces dosages présentés initialement comme ne reconnaissant que la PTH 1-84 entière ont donc été appelés « dosage de PTH intacte » (74, 76).

Les techniques se sont au fil des ans améliorées et d'autres kits sont mis sur le marché. En radioimmunologie mais également de nouveaux dosages automatisés utilisant d'autres types de marqueurs (chimiluminescence, enzymatique) (48).

Les améliorations suivantes ont été réalisées par la suite :

- utilisation de marqueurs chimiluminescents (acridinium par exemple) ce qui permet d'éviter l'utilisation de marqueurs radioactifs comme l'iode-125
- réduction du temps de réalisation de l'analyse (environ 20 min) ce qui permet désormais de pouvoir proposer des dosages pour un monitoring per-opératoire lors de geste de chirurgie parathyroïdienne (76).

Toutes ces modifications ont contribué à améliorer la faible sensibilité et la spécificité des dosages de 1<sup>ère</sup> génération (76).

Avantages des techniques de 2<sup>ème</sup> génération :

- sensibilité accrue
- simplicité d'utilisation
- rapidité (résultat en moins de 24h contre 7j pour la première génération)
- la limite de détection est basse (1ng/L)
- standard international purifié
- comparaisons de dosages inter-laboratoires possibles (et donc entre études)
- largement utilisée pour la gestion des dysparathyroïdies et de l'ostéodystrophie rénale
- détection théorique seulement de la PTH 1-84 et non les fragments C-terminaux (31, 74, 76, 77).

Mais, bien que les résultats semblent beaucoup plus concordants avec la clinique que ceux obtenus avec les dosages de 1<sup>ère</sup> génération, certains auteurs montrent quelques limites à la technique :

- considérée initialement comme le « gold standard » pour la mise en évidence de dysfonctionnements parathyroïdiens, ces dosages de seconde génération font l'objet de nombreux travaux par des auteurs qui démontrent que ce n'est finalement pas le cas. En effet, avec certains de ces dosages de PTH les valeurs obtenues sembleraient surestimées chez des patients insuffisants rénaux qui présentaient d'après une biopsie osseuse une ostéopathie adynamique. (78, 79)
- ces dosages de 2<sup>ème</sup> génération reconnaissent également de larges fragments comprenant une partie de la région N-terminale (appelés « non-(1-84) PTH fragments »), notamment PTH 7-84 qui représentent 45-50% des formes de PTH circulantes chez les patients dialysés (74, 80) ce qui a été mis en évidence en 1998 par HPLC avec un fragment synthétique de (7-84) (81).

Ces fragments non-(1-84) PTH débutent en position 4, 7, 10 ou 15 avec une majorité de fragments débutant en position 7 (82).

Les valeurs recommandées par le « National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative » (NKF KDOQI) ont été élaborées avec cette méthode (31) et plus précisément, avec la trousse Allegro de chez Nichols Institute.

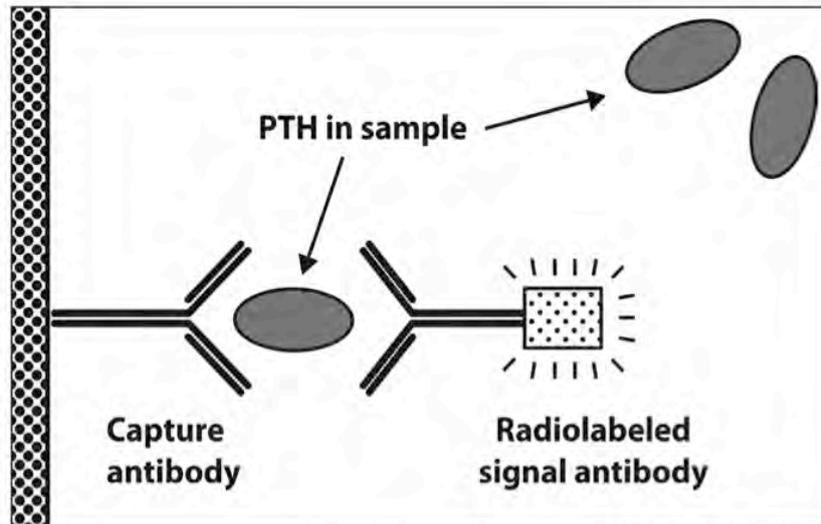


Figure n°28 : Principe de la méthode de dosage de la PTH de « 2ème génération » (76)

La PTH à doser dans l'échantillon est prise en « sandwich » entre 1 Ac fixe et un Ac de révélation couplé à 1 radiomarqueur (figure n°29), ces 2 Ac reconnaissent des épitopes différents (amélioration de la spécificité vis à vis de la forme active de la PTH) (76).

Ces dosages de 2<sup>ème</sup> génération sont toujours les techniques les plus utilisées actuellement (76).

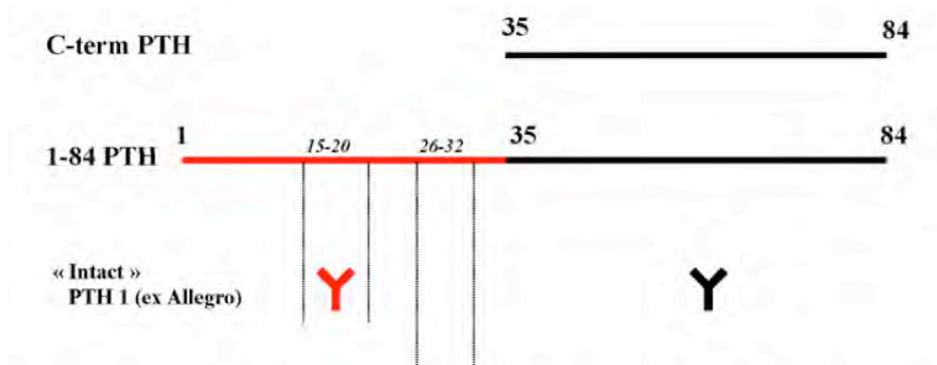


Figure n°29 : Sites de capture et de révélation pour les dosages de 2ème génération, exemple de la méthode « Allegro » (société Nichols) (60)

### ***Kits disponibles***

Ils sont indiqués dans le tableau n°8 qui présente les trousse commercialisées en France en 2012.

Technique	Génération	Épitope de capture	Épitope de révélation	Marqueur
<b>Architect Intact PTH (ABBOTT Diagnostics)</b>	2 <sup>ème</sup>	Ac polyclonal	Ac polyclonal	Ester d'acridinium
<b>Intact PTH (Beckman Coulter)</b>	2 <sup>ème</sup>	Ac polyclonal	Ac monoclonal	Phosphatase alcaline
<b>ELSA-PTH (Cis Bio)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal 39-84	1 Ac polyclonal 1-34	I <sup>125</sup>
<b>1-84 PTH (DiaSorin)</b>	3 <sup>ème</sup>	Ac polyclonal C-terminal	Ac monoclonal N-terminal	Isoluminol
<b>N-tact PTH (DiaSorin)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac anti PTH 39-84	1 Ac anti PTH 1-34	Isoluminol
<b>hPTH-EASIA (Diasource)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal 44-68	1 Ac polyclonal 1-34	Péroxydase
<b>hPTH-120 min-IRMA (Diasource)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal 44-68	1 Ac polyclonal 1-34	I <sup>125</sup>
<b>Total Intact PTH (tubes) (Laboratoire Scantibodies)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac anti PTH 39-84	1 Ac anti PTH 1-34	Isoluminol
<b>Total Intact PTH (billes) (Laboratoire Scantibodies)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac anti PTH 39-84	1 Ac anti PTH 1-34	I <sup>125</sup>
<b>Whole PTH (1-84) (Laboratoire Scantibodies)</b>	3 <sup>ème</sup>	Ac polyclonal C-terminal	Ac polyclonal N-terminal	I <sup>125</sup>
<b>Duo PTH Kit (Laboratoire Scantibodies)</b>	2 <sup>ème</sup> / 3 <sup>ème</sup>	1 Ac polyclonal 39-84 commun	1 Ac polyclonal 1-34 pour la technique de 2 <sup>ème</sup> génération 1 Ac polyclonal N-terminal pour celle de 3 <sup>ème</sup> génération	I <sup>125</sup>
<b>PTH intacte Immulite (Siemens)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal anti-44-84 PTH	1 Ac polyclonal anti-1-34 PTH	Phosphatase alcaline
<b>PTH Intact Advia Centaur/ XP (Siemens)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac polyclonal anti-39-84 PTH	1 Ac polyclonal anti-1-34 PTH	Ester d'acridinium
<b>PTH Intacte (Roche)</b>	2 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal 38-84	1 Ac monoclonal 1-37	Ruthénium
<b>PTH (1-84) (Roche)</b>	3 <sup>ème</sup>	1 Ac monoclonal anti PTH	1 Ac monoclonal anti PTH	Ruthénium
<b>ST AIA-PACK Intact PTH (Tosoh)</b>	2 <sup>ème</sup>	Ac polyclonal	Ac polyclonal	Phosphatase alcaline

Tableau n°8 : Principales caractéristiques des trousse de parathormone disponibles en France en 2012

### **1.3.5 Dosages de 3<sup>ème</sup> génération**

#### ***Généralités***

Autres dénominations : dosage de PTH totale, de PTH Biointacte, de « whole » PTH, de PTH complète ou encore de CAP (cyclase activating PTH).

Suite à la découverte de ces réactions croisées entre les dosages de 2<sup>ème</sup> génération et ces fragments non-(1-84) de la PTH, le laboratoire Scantibodies développe en 1999 un nouveau type de dosage appelé d'abord « Whole PTH assay » (pour se différencier des dosages de PTH « intacte ») puis CAP (pour « Cyclase activating PTH ») (67, 83).

Ce nouveau dosage utilise toujours 2 anticorps, le 1<sup>er</sup> de capture est le même que pour les dosages de 2<sup>nd</sup>e génération et l'anticorps de révélation reconnaît spécifiquement la région (1-4) de la PTH (figure n°30) (74).

Ainsi, ce kit reconnaît la PTH 1-84 mais ne croise plus avec les formes non-(1-84) de la PTH, ce qui a été démontré par John (83) et Gao (67).

A partir de cette date, la fabrication de coffrets de dosages de PTH dits de 3<sup>ème</sup> génération est lancée, d'autres fabricants proposent donc rapidement des coffrets de réactifs : Nichols, Roche et DiaSorin notamment.

#### **Avantage des méthodes de 3<sup>ème</sup> génération :**

- meilleure spécificité pour la PTH 1-84 entière que les dosages de 2<sup>ème</sup> génération (74) et donc aucune reconnaissance des fragments C-terminaux mais évaluation concomitante de la N-PTH
- réduction de la variabilité inter-méthodes
- normalisation possible entre les kits de dosage.

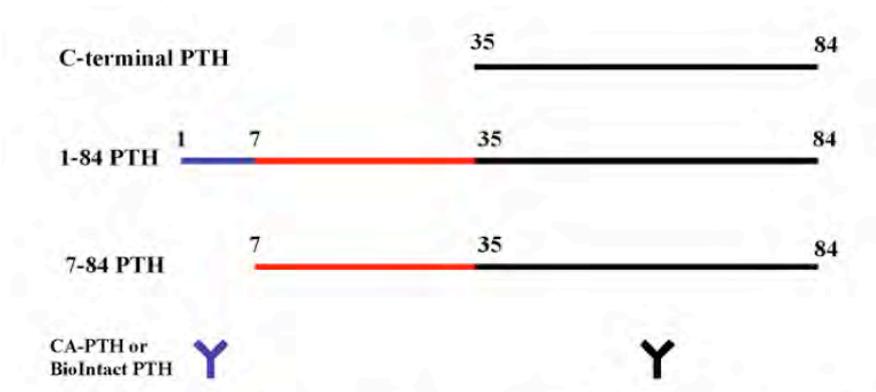


Figure n°30 : Principe des dosages de la PTH dits de 3<sup>ème</sup> génération (60)

### ***Kits disponibles***

Ils sont indiqués dans le tableau n°8.

### **1.3.6 Polémique 2<sup>ème</sup>/3<sup>ème</sup> génération**

L'apparente supériorité des dosages de 3<sup>ème</sup> génération en raison de sa spécificité vis à vis de la PTH 1-84 « entière » est toujours aujourd'hui débattue et il existe actuellement une polémique importante entre les partisans des dosages de 2<sup>ème</sup> génération et ceux de 3<sup>ème</sup> génération.

Plusieurs études retrouvent une bonne corrélation des résultats entre les dosages avec 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération et une meilleure spécificité des techniques de 3<sup>ème</sup> génération (68, 84).

La méthode considérée comme la référence actuelle reste toujours le dosage de la PTH intacte (2<sup>ème</sup> génération).

Taniguchi (85) a réalisé une étude comparative entre dosages de PTH intacte et 1-84 pour 738 patients hémodialysés (58% d'hommes, moyenne d'âge 59 ans, sans préciser le nom des fabricants). Il observe une bonne corrélation entre les taux pour différents niveaux de valeurs (< 60 pg/mL, 61-180 et > 180) et préconise l'utilisation

d'une méthode de 3<sup>ème</sup> génération pour un dosage plus précis de la PTH active biologiquement.

Melamed (86), à partir d'échantillons sanguins de 515 patients dialysés, montre une bonne corrélation entre les méthodes de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération. L'intérêt de la méthode de 3<sup>ème</sup> génération réside dans l'association entre des taux élevés de PTH 1-84 et une augmentation de la mortalité (ce qui n'est pas retrouvé avec la PTH intacte).

Inaba (68), en 2004, compare la technique de 3<sup>ème</sup> génération de Nichols Institute (Bio-PTH) avec celle de 2<sup>ème</sup> génération (Allegro I-PTH IRMA). Il met en évidence une bonne corrélation entre les 2 méthodes mais préconise l'utilisation du dosage de 3<sup>ème</sup> génération qui selon lui donne un meilleur reflet de la fonction parathyroïdienne.

Rodgers (76) en 2011 souligne l'utilité des techniques de 3<sup>ème</sup> génération pour les patients ayant une insuffisance rénale chronique, en effet la détermination de la fraction active biologiquement est selon lui préférable. En revanche, il précise qu'elles ne permettent pas d'améliorer le diagnostic d'ostéodystrophie ou d'autres séquelles de l'hyperparathyroïdie secondaire chez ces patients. Il n'y aurait pas non plus de différence pour le diagnostic d'hyperparathyroïdie primaire pour les patients ayant une fonction rénale normale.

Il n'existe pas à ce jour de recommandation officielle pour l'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes de dosage, mais en fonction des pathologies diagnostiquées ou suivies, les équipes peuvent avoir un intérêt à privilégier une technique.

### **1.3.7 Interférences de dosage de la PTH**

Différents paramètres peuvent interférer sur les méthodes de dosage de la PTH.

### ***Insuffisance rénale***

Les taux de PTH augmentent (2 mécanismes : diminution de la clairance et augmentation de la production) en présence d'une insuffisance rénale.

Lorsque le DFG (débit de filtration glomérulaire) est inférieur à 30, le taux de PTH est multiplié par 2.

Ces valeurs peuvent atteindre pour les patients en hémodialyse des taux représentant 3 fois la limite supérieure à la normale ou plus.

Parallèlement à cette augmentation de la PTH intacte, la non-(1-84) PTH, dosée par les techniques de 2<sup>ème</sup> génération, augmente aussi pour passer de 20% de la PTH mesurable chez le sujet sain à plus de 50% chez le sujet atteint d'insuffisance rénale (87).

### ***Anticorps hétérophiles***

Les Ac présents dans les trousse de dosages sont obtenus à partir de sérums animaux (comme la souris, le cochon d'Inde ou la chèvre). Or les auto-anticorps produits par certains patients (comme les facteurs rhumatoïdes) peuvent interagir avec ces dosages et produire des résultats faussement bas ou élevés (figure n°31).

Certains traitements (OKT3 (88), immunosuppresseur, par exemple) peuvent également entraîner le développement d'Ac, dits HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies), se liant aux Ac anti-PTH et donner des résultats faussement élevés.

Lorsqu'ils sont mis en évidence, on peut réduire cette interférence par l'adjonction d'agent bloquant anti-Ac hétérophiles ou utiliser une trousse de dosage avec des Ac provenant d'une autre espèce.

Cela rappelle donc l'importance d'un dialogue clinico-biologique devant tout résultat qui paraît aberrant soit par rapport aux antécédents du patient ou par rapport à la situation clinique décrite par le clinicien. (76)

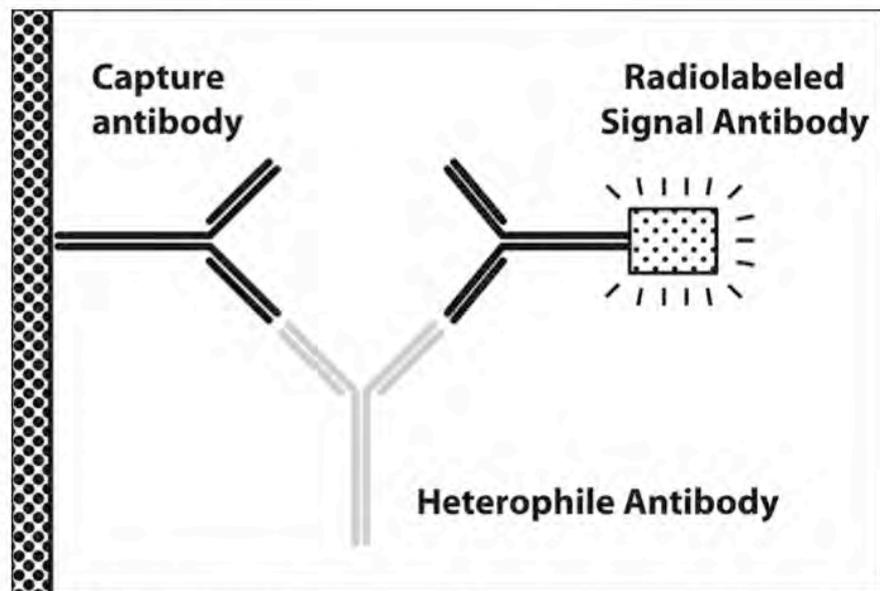


Figure n°31 : Illustration d'Ac hétérophile interférant avec la méthode de dosage de la PTH et conduisant à un résultat faussement élevé (76)

### ***PTHrP***

Aucune interférence des méthodes de dosage par la PTHrP n'est décrite dans la littérature. Un dosage spécifique est d'ailleurs proposé par certains fabricants.

Certaines notices d'utilisation précisent l'absence de réaction croisée entre la PTHrP et leur méthode de dosage après avoir recherché une modification des concentrations de la PTH lors de l'adjonction de différentes quantités de PTHrP.

### ***Selon la nature de l'échantillon***

À partir des prélèvements réalisés dans des tubes secs ou contenant de l'EDTA, les taux de PTH peuvent être différents comme nous l'avons vu au paragraphe concernant le choix du tube.

### **Selon LIH (lipémie, ictère, hémolyse)**

Quelle que soit la technique utilisée, le fabricant précise la présence ou non d'interférences générées par l'hémoglobine, des lipides et de la bilirubine. Ces recommandations sont donc nombreuses. Dans tous les cas, ils indiquent de ne pas doser les échantillons fortement hémolysés, ictériques ou lipémiques.

L'Afssaps précise, dans son rapport sur les dosages de la PTH de 2009 (71), que les fabricants doivent, en plus des paramètres cités ci dessus, mentionner les interférences potentielles avec « le facteur rhumatoïde, les produits de contraste et les anticorps hétérophiles ».

### **Schémas récapitulatifs des dosages de PTH (figures n°32 et 33)**

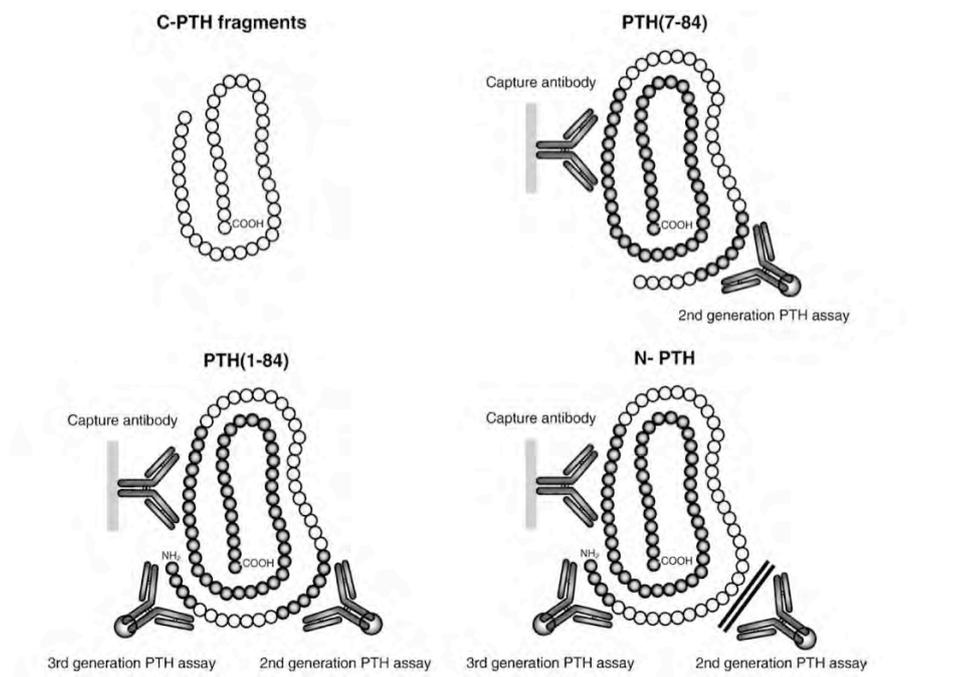


Figure n°32 : Méthodes de dosage reconnaissant les 4 formes moléculaires de la PTH les plus fréquentes (74)

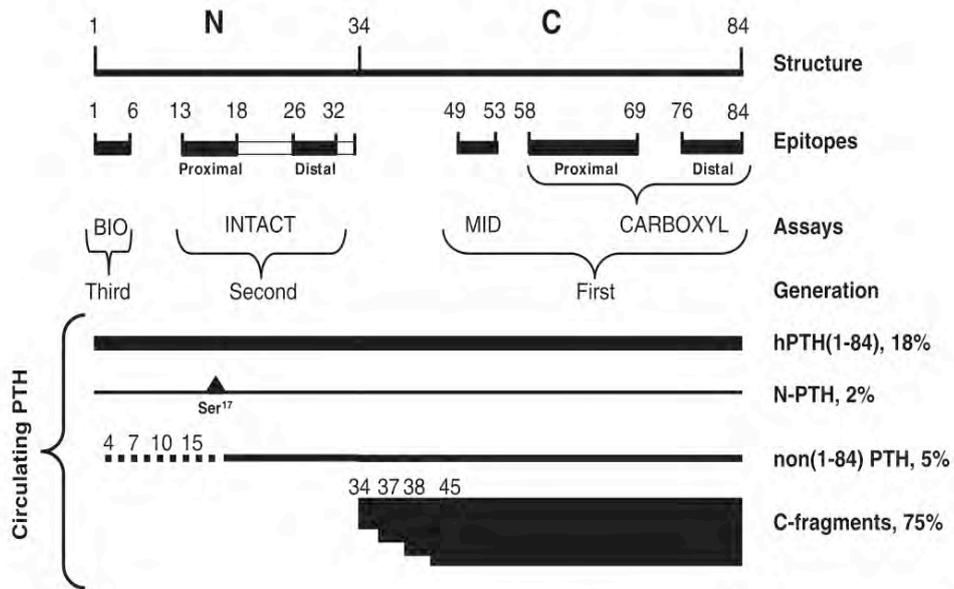


Figure n°33 : Type de PTH reconnu en fonction de la technique de dosage utilisée (42)

## **DEUXIÈME PARTIE**

### **Installation de la PTH 1-84 sur automate Liaison XL**

## **2.1 Objectif : Accréditation**

### **2.1.1 Contexte**

La réforme de la biologie médicale voulue par l'ordonnance de janvier 2010 impose aux laboratoires de biologie médicale de mettre en place une démarche d'assurance qualité avec comme preuve de sa mise en place correcte l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. C'est une contrainte lourde pour les laboratoires de biologie médicale, à envisager comme un outil d'amélioration de la qualité de notre activité, confortant notre crédibilité et notre rôle d'expert auprès du corps médical.

L'organisme accréditeur est le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). C'est un organisme privé créé en 1994 sous le régime de la loi du 1<sup>er</sup> juillet 1901. Le décret du 19 décembre 2008 l'a désigné comme unique instance nationale d'accréditation, reconnaissant ainsi l'accréditation comme une activité de puissance publique. Il comprend 4 sections dont celle qui nous intéresse particulièrement, la section 4 : Section Santé Humaine.

Le but de ce système d'assurance qualité est avant tout de satisfaire aux besoins du client (le client correspondant ici, en langage qualité, aux patients mais aussi aux prescripteurs et à toute personne ou organisme ayant recours aux services d'un laboratoire de biologie médicale). Pour ce faire, le personnel des laboratoires de biologie médicale doit se conformer aux exigences de la norme.

Ce dispositif couvre toute l'étendue du laboratoire : du pré- au post-analytique.

Les enjeux sont les mêmes pour les laboratoires des secteurs privés et publics mais les moyens et les contraintes pour y parvenir sont différents dans bien des situations, obligeant les biologistes médicaux à s'organiser pour passer ce cap décisif.

Un point important est à noter pour les laboratoires des centres hospitaliers publics : l'acte de prélèvement. En effet, la grande majorité des prélèvements sont réalisés dans les services cliniques par du personnel ne faisant pas partis du laboratoire mais sous la responsabilité des biologistes. Une mission essentielle du

laboratoire est donc de maîtriser au mieux cette phase pré-analytique en diffusant le manuel de prélèvement, en assurant des formations et en mettant en place des indicateurs de contrôle pour pouvoir rapidement détecter toute dérive.

L'ordonnance de janvier 2010 fixe également deux échéances : le 31 octobre 2013, date à laquelle les laboratoires de biologie médicale devront avoir fait la preuve de leur entrée dans la démarche d'accréditation et le 31 octobre 2016, délai maximal donné par l'administration pour que les laboratoires de biologie médicale privés comme publics soient accrédités sur la totalité de leur activité.

Cette réforme de la biologie médicale rappelle qu'un « examen de biologie médicale est un acte médical » et précise également que l'accréditation est une compétence à part entière du biologiste médical.

### **2.1.2 Portées A/B**

Deux portées d'accréditation sont possibles, laissées au libre choix du laboratoire :

- La portée flexible standard de « type A ». Elle laisse la possibilité au laboratoire, entre 2 visites du COFRAC, d'utiliser sous accréditation des méthodes normalisées ou consensuelles reposant sur des compétences qu'il a précédemment démontrées (des méthodes équivalentes).
- La portée flexible étendue de « type B ». Elle permet de mettre en œuvre sous accréditation, sans évaluation spécifique préalable du COFRAC, de nouvelles méthodes que le laboratoire a adaptées, développées ou modifiées selon des principes analytiques dont la compétence est déjà démontrée (même principe de méthode).

Le choix entre la portée flexible de type A ou B dépendra du type d'utilisation de la technique par le laboratoire. L'adoption d'une méthode fournisseur correspondra à une portée A alors que la modification ou l'adaptation d'une méthode interne obligera à passer en portée B.

### **2.1.3 Le dossier de validation de méthode**

Le dossier de « validation » de méthode constitue le pré-requis à l'accréditation dans la mesure où son analyse par le COFRAC est l'étape initiale du processus d'accréditation.

Le document SH GTA 04 précise que « la validation ne constitue pas un doublon avec les études approfondies effectuées par les fournisseurs » et « qu'il est important de démontrer que la méthode (le couple analyseur/réactif) fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et qu'elle donne des résultats sûrs pour les patients ».

Ce dossier de validation est soit une validation de mise en application de la méthode soit une vérification de ces performances sur site.

Préalablement à la vérification expérimentale de la méthode, certaines étapes doivent être réalisées par le laboratoire :

- l'établissement d'une procédure de vérification/validation de méthodes (exigence § 5.5.2 de la norme ISO 15189)
- effectuer une étude bibliographique de la méthode
- choisir les critères de performance à vérifier
- choisir les limites d'acceptabilité de la méthode (elles devront respecter l'état de l'art et la pertinence clinique)

Il conclut sur l'avis d'aptitude de la méthode, fait indispensable pour pouvoir l'appliquer dans la pratique courante.

Au laboratoire, le couple analyseur/réactif choisi est le kit Liaison PTH 1-84 avec l'analyseur Liaison XL DiaSorin. Nous sommes donc dans la configuration d'une analyse quantitative vraie à accréditer selon la portée flexible standard de type A. Les paramètres nécessaires au dossier d'accréditation sont résumés dans le tableau du SH GTA 04 ci dessous (tableau n°9).

Tableau n°9 : Éléments de vérification à fournir selon la portée choisie (SH GTA 04)

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<b>Spécificité analytique</b>	Oui	Non	Oui
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui	Oui
<b>Justesse</b> (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible	Oui
<b>Intervalle de mesure</b> (Limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	A vérifier si nécessaire <sup>4</sup>	Oui
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Oui	Oui	Oui
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles	Oui
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Oui	Non	Oui
<b>Robustesse</b>	Non	Non	si besoin
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	à vérifier si nécessaire <sup>5</sup>	Oui
<b>Intervalle de référence</b> « ex-valeurs normales »	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié	Oui à établir
<b>Comparaison avec une méthode de référence</b>	Oui (si existe)	Non	Oui (si possible)
<b>Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD)<sup>6</sup></b>	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui
<b>Analyse des discordances<sup>7</sup></b>	Oui	Oui	Oui
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>8</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>			

<sup>4</sup> Pour des techniques avec une zone étendue de valeurs possibles.

<sup>5</sup> Pour confirmer ou en cas d'interférences non décrites.

<sup>6</sup> Appareils en miroir : privilégier les appareils utilisant des techniques de principes analytiques identiques sinon il est possible d'utiliser des codes examens différents pour le même paramètre ou d'utiliser un facteur de corrections (pour les techniques linéaires) **de manière transitoire**. Le laboratoire doit avoir une stratégie d'uniformisation des techniques pour un même paramètre.

<sup>7</sup> Pour les examens fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (absorbance par exemple), avec un effet de seuil (étude des faux positifs et des faux négatifs par exemple).

<sup>8</sup> En cas de dépassement des spécifications choisies a priori par le laboratoire, celui-ci justifie l'acceptation des écarts pour pouvoir conclure à l'aptitude de la méthode et l'enregistre.

## **2.2. Matériels et méthodes**

Les essais nécessaires à la vérification de toute méthode de dosage de portée A impliquent d'effectuer de nombreuses séries de tests à partir, selon les caractéristiques à vérifier, soit de sérums de patients, soit de contrôles de qualité interne soit des contrôles de qualité externe (échantillons d'évaluation externe de la qualité – EEQ).

Nous avons évalué les performances analytiques de la méthode :

- en déterminant la répétabilité et la reproductibilité
- en étudiant la contamination inter-échantillons et la stabilité des échantillons dans le temps et à des températures différentes
- et enfin en comparant notre méthode avec la technique utilisée précédemment par le laboratoire.

### **2.2.1 Choix des tubes**

Selon les indications de la fiche technique du fabricant de réactifs, les tubes destinés aux prélèvements pour dosage de PTH 1-84 sont soit des tubes secs (avec ou sans gel) soit des tubes avec de l'EDTA.

Le laboratoire préconise selon la fiche de procédure de prélèvement du référentiel du pôle laboratoire pour le dosage de la PTH de recueillir l'échantillon dans des tubes secs avec gel de 5 mL ou 7 mL (Tubes BD Vacutainer® SST™ II *Advance* avec bouchon sécurité BD Hemogard™ référence 367957 (5 mL) et 367955 (7 mL), Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Ceci s'explique par le fait que lors de la demande de dosage de PTH, l'évaluation du calcium total est systématiquement réalisée et celle du calcium ionisé est également faite si possible. Dans de très nombreux cas, il existe une prescription pour évaluation conjointe de la vitamine D (calcidiol et/ou calcitriol). Tous ces paramètres peuvent être déterminés uniquement à partir d'un échantillon de sérum.

Pour les dosages de ces différents paramètres, les volumes nécessaires sont de :

- 450 µL pour le dosage avec l'automate Liaison XL :
  - 350 µL pour le dosage de la PTH (200 µL de volume mort et 150 µL pour l'analyse)
  - 100 µL supplémentaires pour doser la 25 OH vitamine D
- 450 µL pour le dosage par l'automate Nova du calcium ionisé et l'évaluation du pH et par l'automate Au 620 du calcium total
- 550 µL pour le dosage de la 1-25 OH<sub>2</sub> vitamine D en radio immunoanalyse (RIA)

donc, avec un volume 1450 µL de sérum, ce bilan complet peut être réalisé.

### **2.2.2 Phase pré-analytique**

Les échantillons de sérum sont prélevés dans les services cliniques de l'Hôpital de Brabois ou de l'Hôpital Central. Les prélèvements sont ramassés toutes les heures dans les salles de soin et sont apportés au laboratoire par le service de coursiers dans la glace de manière à maintenir une température entre + 2°C et + 8°C. Le délai moyen entre le prélèvement de l'échantillon et son arrivée au laboratoire est d'environ 3h mais toujours inférieur à 4h (ce qui est conforme aux recommandations du fournisseur dans les conditions de température décrites).

Dès leur arrivée, la première étape est de vérifier la conformité :

- de la demande (fiche de demande, température de transport, type de tube) pour pouvoir décider ou non de la prise en charge du prélèvement
- de l'identité du patient : similitude complète des informations concernant le patient sur étiquette de fiche de prescription et étiquette collée sur le tube contenant l'échantillon.

Si besoin, une fiche de non conformité doit être remplie par le personnel et la décision de poursuivre ou non l'analyse sera prise par le biologiste (cf « Gestion des non conformités pré-analytiques au LBM » du pôle laboratoire).

La demande est ensuite saisie informatiquement et des étiquettes code-barres sont éditées.

Les tubes sont centrifugés (15 min à 2400g à + 4°C) puis le sérum est réparti en aliquotes dans des tubes « cristal » de 5 mL identifiés par des étiquettes codes-barres :

- 1 aliquote pour les dosages par automate : l'évaluation de la PTH, de la calcémie (totale et ionisée), du pH et de la 25 OH vitamine D est effectuée immédiatement
- 1 aliquote pour le dosage en RIA de la 1-25 OH<sub>2</sub> vitamine D : le dosage radioimmunologique n'est réalisé qu'en série et l'aliquote destinée à ce dosage est donc congelée immédiatement à - 20°C et conservée à cette température en attendant la prochaine série de dosage.

### **2.2.3 Méthodes de dosage**

#### *Dosage PTH 1-84 avec l'automate Liaison XL DiaSorin (Saluggia, Italie)*

Principes du dosage :

C'est un dosage de type sandwich qui utilise deux anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement d'une part les premiers acides aminés de l'extrémité N-terminal et d'autre part la région C-terminale de la molécule de PTH afin de ne détecter que la PTH 1-84 entière. Les particules ainsi complexées sont quantifiées après lavage par la mesure du signal lumineux produit par la réaction de chimiluminescence.

Cette technique est une méthode de dosage de 3<sup>ème</sup> génération ne reconnaissant que la molécule de PTH entière.

Les réactifs :

La concentration de PTH dans les échantillons a été déterminée à l'aide du coffret de réactifs Integral Liaison 1-84 PTH (référence 310630).

Les calibrants :

La courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide des calibrants fournis dans le coffret Liaison Integral Liaison 1-84 PTH. La calibration est réalisée selon 2 niveaux de calibrateurs. Ce n'est pas une calibration comprenant plusieurs points mais une vérification des valeurs en unités de lumière relative (RLU) pour 2 concentrations connues avec ajustement d'une courbe d'étalonnage prédéfinie.

Les contrôles internes de la qualité :

L'exactitude et la précision du dosage Liaison 1-84 PTH ont été vérifiées à l'aide des contrôles de qualité Liaison Control 1-84 PTH (référence 310631).

#### Dosage de la PTH avec l'automate DXI 800 Beckman Coulter (Marseille, France)

Principes du dosage :

Le test Access Intact PTH utilise le même principe de dosage que le Liaison 1-84 PTH, par contre, les anticorps ne sont pas dirigés contre les mêmes épitopes. Mais Beckman Coulter ne communique pas les sites de reconnaissance des anticorps de capture (polyclonaux) et de révélation (monoclonaux).

C'est un dosage de 2<sup>ème</sup> génération, présentant donc une réactivité croisée potentielle avec différents fragments de PTH dans la circulation sanguine. Les fragments suivants ont été testés à des concentrations élevées (> 4000 pg/mL) : PTH 7-84, PTH 44-68, PTH 53-84, PTH 39-84 et PTHrP 1-34 ; seul le fragment de PTH 7-84 interagit avec la méthode de dosage et présente une réactivité croisée de 72%.

Les réactifs :

Le kit de dosage Access Intact PTH est utilisé sur l'automate DXI (référence A16972).

Les calibrants :

La courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide des 6 calibrants Access Intact PTH Calibrators (référence A16953).

Les contrôles internes de la qualité :

L'exactitude et la précision du dosage Intact PTH ont été vérifiées à l'aide des contrôles de qualité Liquichek Speciality de chez Biorad (référence 359, 364-366).

Les recommandations des fabricants ont été rigoureusement respectées lors de toute la procédure pour pouvoir prétendre à une accréditation de la méthode selon la portée standard A.

Les principales caractéristiques de chaque technique sont résumées dans le tableau n°10.

Nom du test	Fabricant	Traceur	Limite de détection (pg/mL)	Valeur la plus haute mesurable (pg/mL)	Épitope de capture	Épitope de révélation	Intervalle de référence du fabricant (pg/mL)	Répétabilité CV (%)	Reproductibilité CV (%)	Volume nécessaire : volume mort et analyse (µL)	Réactivité croisée avec le fragment 7-84 PTH (%)
<b>Liaison 1-84 PTH</b>	DiaSorin	Isoluminol	1,7	1800	Ac polyclonal C-terminal	Ac polyclonal N-terminal	6,5-36,8 (n=125)	< 4,9	< 7,2	350	0
<b>Intact PTH</b>	Beckman Coulter	Phosphatase alcaline	1	3500	Ac polyclonal	Ac monoclonal	12-88 (n=289)	< 2,6	< 5,8	290	72

Ac : anticorps ; CV : coefficient de variation

Tableau n°10 : Caractéristiques principales des dosages de PTH utilisés au laboratoire

#### **2.2.4 Conservation des échantillons après dosages**

Dès que les dosages de PTH et éventuellement 25(OH) vitamine D ont été réalisés puis les résultats validés techniquement et biologiquement, les aliquotes correspondantes sont immédiatement congelées à - 20°C et conservées à cette température pour une durée de 2 mois selon la procédure en vigueur dans le laboratoire pour la conservation des échantillons.

Ceci permet :

- d'effectuer une vérification si besoin
- de réaliser une autre analyse non demandée initialement

Au delà de 2 mois, les échantillons sont détruits selon la procédure d'élimination des déchets biologiques en vigueur dans le laboratoire.

#### **2.2.5 Étude de la répétabilité**

Pour déterminer les caractéristiques de la répétabilité, 3 pools ont été constitués à partir d'échantillons de sérums de patients. Après dosage dans le cadre de la prescription, puis validation technique et biologique, un volume de 300 µL a été prélevé avant congélation et conservation de l'échantillon patient. Toutes les aliquotes de 300 µL ont été rassemblées dans un seul tube pour constituer un pool.

Le choix des échantillons a été fait à partir des concentrations obtenues pour correspondre à la valeur cible de chacun des pools :

- un pool « faible » de concentration dans l'intervalle de référence, correspondant à une valeur physiologique (< 36,8 pg/mL)
- un pool « moyen » de concentration se situant dans l'intervalle de recommandations du KDIGO (entre 2 et 9 fois la limite supérieure de l'intervalle de référence pour la technique utilisée)

- un pool « fort » de concentration correspondant à des valeurs pathologiques franches souvent observées pour les patients des services de néphrologie et dialyse.

Après homogénéisation, chacun des pools ainsi constitué a été évalué le même jour que les dosages réalisés pour les patients par 20 dosages successifs.

Les conditions d'analyse ont été les suivantes : même opérateur, même lot de réactif et même étalonnage, CIQ du jour. Les tests ont été réalisés l'un à la suite de l'autre.

L'analyse statistique des résultats comprend le calcul de la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

Le CV ainsi calculé permet d'évaluer la répétabilité de notre méthode en le comparant au CV limite admissible préalablement choisi : CV obtenu avec les recommandations du fournisseur et également avec ceux de la littérature.

### **2.2.6 Étude de la reproductibilité**

L'essai de fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intra-laboratoire) a été réalisé à partir des valeurs des contrôles internes de qualité quotidiens (CIQ).

Ces CIQ sont fournis sous forme lyophilisée par le fabricant DiaSorin (contrôles Liaison 1-84 PTH, référence 310631). Ils comprennent deux niveaux de concentration (24,3 pg/mL et 264 pg/mL).

Les recommandations du fournisseur quant à leur utilisation sont les suivantes :

- conservation avant reconstitution entre + 2 et + 8°C
- reconstitution par 2 mL d'eau déionisée
- après reconstitution les CIQ sont stables pendant 1h à température ambiante (+ 18-22°C)
- répartir en aliquotes de 400 µL dans des tubes en polypropylène

- les aliquotes non utilisées sont à conserver congelées à - 20°C

Les contrôles font l'objet d'un dosage quotidien :

- niveau 1 de valeur cible 24,3 pg/mL [17,1-31,5]
- niveau 2 de valeur cible 264 pg/mL [201-327]

Les valeurs de CIQ utilisées pour calculer la reproductibilité sont celles obtenues quotidiennement au cours d'une période de 2 mois (38 valeurs par niveau testé, correspondant à toutes les valeurs de CIQ passés les jours ouvrés).

L'analyse statistique est identique à celle de la répétabilité avec calcul : de la moyenne (m), de l'écart-type (s) et du coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

Le CV calculé est également comparé aux CV limites admissibles choisis : CV du fournisseur et comparaison aux CV de la littérature.

### **2.2.7 Étude de la contamination inter-échantillons**

Lors de l'utilisation d'un système analytique, deux types de contamination peuvent s'observer : la contamination inter-échantillons (entre des échantillons de valeurs hautes et de valeurs basses) et la contamination inter-réactifs (lorsque le système de distribution des réactifs est commun à tous les réactifs).

Seule la contamination inter-échantillons conformément aux recommandations COFRAC a été évaluée.

Les échantillons utilisés dans ce but sont 2 pools de sérums de patients réalisés dans des conditions similaires à celles décrites pour l'évaluation de la répétabilité :

- un pool « faible » de concentration proche de 10 pg/mL
- un pool « fort » de concentration proche de 500 pg/mL.

Le principe consiste à passer alternativement les échantillons de faible concentration puis ceux avec une forte concentration.

Selon le protocole du SH GTA 04 pour les analyses de type quantitatif, après le rinçage de l'appareil, il convient de faire 3 dosages consécutifs d'un échantillon de valeur élevée (H1, H2, H3) puis 3 fois celui d'un échantillon de valeur basse (B1, B2, B3). Cette séquence est répétée 4 fois.

Un test t de Student est réalisé entre les valeurs susceptibles d'être contaminées (les valeurs des 1<sup>ers</sup> passages du pool « faible ») et celles qui ne le sont pas (les valeurs des 3<sup>èmes</sup> passages du pool « fort»). Si le test retrouve une différence significative, la contamination est quantifiée par le calcul de la contamination (formule ci dessous).

Après avoir calculé la moyenne des valeurs hautes (mH) et la moyenne de valeurs de B1 (mB1) ainsi que celle de B3 (mB3), le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (en \%)} = [(mB1 - mB3) / (mH - mB3)] \times 100$$

Le niveau de la contamination doit être le plus proche possible du zéro.

### **2.2.8 Étude de la stabilité des échantillons avant analyse**

Pour évaluer la stabilité de la PTH avant analyse, nous avons utilisé des échantillons de sang transportés entre le service clinique et le laboratoire dans différentes conditions de température.

Pour cela, nous avons utilisé les échantillons de sérums de patients qui avaient le même jour une prescription de PTH et de 25 OH vitamine D et pour lesquels les services cliniques avaient adressé au laboratoire deux tubes secs avec gel de 5 mL :

- un tube sec conservé dans la glace, destiné à la mesure de la concentration de PTH

- un tube sec conservé à température ambiante, pour la vitamine D.

Ceci afin de comparer les valeurs de la concentration de PTH entre des échantillons dont la seule variable pré-analytique était la température de conservation avant analyse (même type de tube, même patient, même préleveur, même heure de prélèvement, même contexte clinique, mêmes conditions de transport, même délai de prise en charge des échantillons au laboratoire).

62 sérums de patients ont été analysés :

- 31 échantillons conservés à température ambiante
- 31 échantillons conservés dans la glace (température entre + 2 et + 8°C).

Les dosages (même lot de réactifs, mêmes contrôles internes de qualité) ont été réalisés dès la réception des échantillons après traitement pré-analytique :

- tube conservé à température ambiante : centrifugation 15 minutes à température ambiante à 2400g
- tube conservé dans la glace : centrifugation 15 minutes à + 4°C à 2400g.

Les données appariées ont été comparées à l'aide du test de Student, une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative. La relation entre les valeurs a été évaluée par une droite de corrélation ainsi que par la méthode graphique de Bland-Altman.

### **2.2.9 Étude de la stabilité des échantillons après conservation pendant 2 mois à - 20°C**

L'étude de la stabilité des échantillons après conservation à - 20°C a été réalisée à l'aide des valeurs obtenues à J0 et à J+2 mois (délai de conservation dans ces conditions de tous les échantillons selon la procédure en vigueur dans le laboratoire).

Le but est :

- de déterminer l'impact de la conservation pendant 2 mois à - 20°C : délai maximal de conservation des échantillons destinés au dosage de la PTH au laboratoire
- et de vérifier si la procédure de conservation des échantillons en vigueur au laboratoire est adaptée aux échantillons destinés au dosage de la PTH 1-84 par la nouvelle technique utilisée.

Pour une série de 79 échantillons de sérums de patients les dosages ont été effectués à J0 et 2 mois après.

Les échantillons provenaient de différents services (Néphrologie, Endocrinologie, Dialyse, ALTIR, Rhumatologie, Chirurgie Thoracique). Tous étaient prélevés sur tube sec de 5 ou 7 mL avec ou sans gel séparateur. Ils étaient transportés au laboratoire selon la procédure habituelle décrite au paragraphe ci dessus. A l'arrivée au laboratoire, les échantillons étaient centrifugés (15 minutes à 2400g à + 4°C) et les aliquotes préparées rapidement. Après dosage de PTH avec l'automate Liaison XL et validation (technique et biologique), les aliquotes ont été congelées immédiatement à - 20°C et conservées à cette température.

Après un délai de conservation de 2 mois civils, les aliquotes ont été décongelées (30 minutes à température ambiante), les tubes étaient vortexés puis centrifugés (même protocole de centrifugation que pour les échantillons primaires) avant que le dosage de PTH ne soit à nouveau réalisé avec l'automate Liaison XL.

Pour chaque groupe (J0 et J+2 mois), la moyenne et l'écart-type a été calculé. La représentation graphique de Bland-Altman montre le pourcentage d'écart entre les valeurs à J0 et celle 2 mois après.

Le CV maximal inter-essai escompté pour le dosage de la PTH 1-84 avec l'automate Liaison XL est de 12 %. Nous avons considéré, comme Cavalier et al. (89), que les

échantillons étaient stables s'il n'y avait pas de variation de plus de 20 % entre les 2 dosages d'un échantillon du même patient.

### **2.2.10 Comparaison de deux méthodes de dosage**

Le dosage de la PTH a été effectué à l'aide de 2 techniques :

- la technique Liaison 1-84 PTH avec l'automate Liaison XL (DiaSorin) : dosage de PTH nouvellement installé au laboratoire
- la technique précédemment utilisée, Intact PTH avec l'automate Dxi 800 (Beckman Coulter).

25 échantillons de sérums de patients ont été analysés successivement par chaque automate. Ces échantillons provenaient de services de Néphrologie, de Dialyse, d'Endocrinologie et de Rhumatologie couvrant l'étendue du domaine physiologique ainsi que des valeurs basses et hautes à différents degrés.

2 aliquotes d'échantillons de sérum ont été préparées à partir du tube primaire et les dosages ont été réalisés immédiatement après et de manière concomitante d'une part avec l'automate Liaison XL (DiaSorin) et avec l'automate Dxi 800 (Beckman Coulter).

Les calculs des moyennes et des écarts-types pour chacun des 2 groupes ont été réalisés. La relation entre les valeurs a ensuite été analysée par l'établissement de la droite de corrélation selon la méthode de Passing-Bablok et par la réalisation d'une représentation de Bland-Altman.

### **2.2.11 Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure**

Un examen de biologie médicale doit être interprété. Pour ce faire, les résultats de type quantitatif obtenus sont comparés à des intervalles de référence, des seuils de décision clinique ou des résultats antérieurs du même patient. Or, tout résultat

provenant d'une mesure possède un pourcentage d'erreur pouvant influencer l'interprétation. C'est pourquoi, l'incertitude de mesure correspondant à la valeur du résultat doit être établie pour pouvoir proposer une interprétation optimale de celle-ci.

En pratique, il est impossible d'obtenir la valeur « vraie » d'une grandeur mesurée, c'est pourquoi il est important de communiquer l'incertitude de mesure qui permet de définir l'intervalle dans lequel se situe, avec une probabilité donnée (95 % pour une distribution normale), la valeur supposée vraie du résultat transmis.

C'est donc une donnée importante pour l'interprétation du résultat et elle doit être calculée dès que cela est possible par le laboratoire. Elle permet ainsi une meilleure interprétation des valeurs proches du seuil de décision (impact clinique et thérapeutique important) et permet un meilleur suivi d'un paramètre chez un même patient.

Elle est déterminée par l'exploitation statistique des valeurs des contrôles internes de qualité et des évaluations externes de la qualité et ne constitue qu'une estimation de l'incertitude. Cette estimation ne porte que sur certains niveaux de valeurs (les niveaux de valeurs des contrôles qualité utilisés pour son calcul). La formule utilisée est la suivante :  $u_c = \sqrt{(u_1^2 + u_2^2)}$

avec  $u_c$  : incertitude combinée,  $u_1$  : incertitude due à la fidélité (écart-type de la reproductibilité intra-laboratoire) et  $u_2$  : incertitude due à la justesse ( $u_2 = \text{biais} \sqrt{3}$ ).

L'incertitude élargie (U) est alors calculée et permettra d'indiquer que la valeur « vraie » sera comprise dans l'intervalle +/- U à 95 % et dans le cadre d'une distribution gaussienne :  $U = 2 \cdot u_c$ .

Le résultat de la mesure de la concentration mesurée s'exprimera ainsi : PTH 1-84 = x pg/mL +/- U

Comme il est rappelé par le groupe de travail sur les incertitudes de mesure de la SFBC : « un résultat quantitatif d'analyse n'est véritablement complet que s'il est accompagné de l'évaluation quantitative de son incertitude » (90).

La norme NF EN ISO 15189 apporte tout de même une nuance : « le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans les cas où cela est pertinent et possible » (paragraphe 5.6.2).

Le calcul n'est qu'une partie de l'estimation de l'incertitude. Il faudra tout d'abord définir le mesurande et lister les paramètres de l'incertitude. Les niveaux de concentration auxquels il est pertinent de l'obtenir devront être définis. Une analyse des facteurs influençant la méthode devra être réalisée (à l'aide par exemple de la méthode des 5M).

Une fois définie, l'incertitude sera comparée aux critères disponibles dans la littérature (SFBC, RICOS, publications,...) pour s'assurer qu'elle est acceptable par rapport à l'interprétation des résultats.

### **2.3. Résultats**

Avant tout dosage, 2 étapes sont à considérer :

- La calibration qui doit être réalisée :

- lorsqu'un nouveau lot de réactifs Intégral est utilisé
- tous les 28 jours en cas de conservation des réactifs entre + 2 et + 8°C
- tous les 7 jours en cas de conservation des réactifs à bord de l'analyseur Liaison XL
- quand elle s'avère nécessaire (par exemple si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites attendues)
- après chaque entretien ou maintenance de l'analyseur Liaison XL si les valeurs des contrôles de qualité ne sont pas dans les plages acceptables.

Pour l'automate Liaison XL, la calibration est faite à l'aide de 2 calibrants fournis par le fabricant et un exemple de la courbe de calibration est présenté dans l'annexe n°1 et pour l'automate Dxi 800, elle est présentée dans l'annexe n°2.

D'après le fabricant, le test est linéaire jusqu'à 1800 pg/mL et la limite de détection (sensibilité analytique) est  $\leq 1,7$  pg/mL (données indiquées dans la notice fournisseur).

- Les contrôles internes de qualité (CIQ) :

Les contrôles internes de qualité de niveau 1 et 2 sont fournis par DiaSorin sous forme lyophilisée.

Chaque niveau de contrôle est dosé quotidiennement.

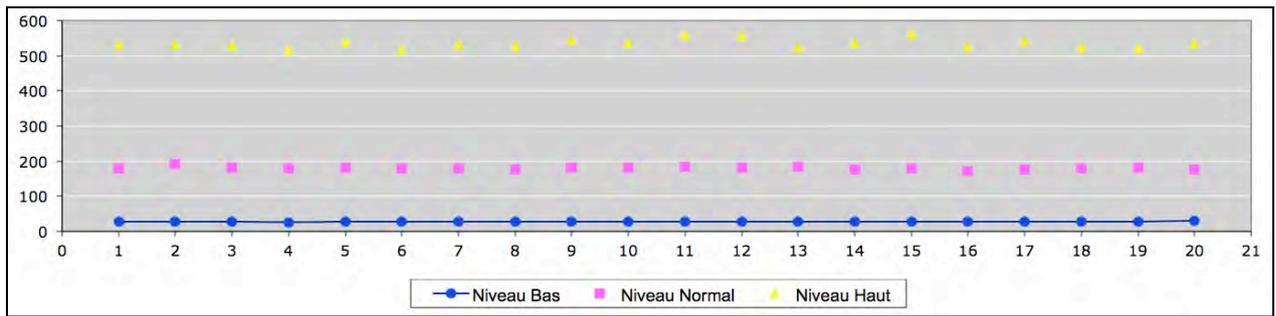
Les valeurs des CIQ obtenues seront comparées aux valeurs cibles indiquées par le fournisseur. Le dosage sera rejeté si les valeurs obtenues ne répondent pas aux règles de validation des CIQ.

## Répétabilité

Les valeurs sériques obtenues de PTH 1-84 pour 3 pools de sérum lors de l'évaluation de la répétabilité de la méthode sont présentées dans le tableau n°11 et la figure n°34.

<b>Concentrations de</b>			
<b>PTH 1-84</b>	<b>pg/mL</b>	<b>pg/mL</b>	<b>pg/mL</b>
<b>Essais</b>	<b>niveau 1</b>	<b>niveau 2</b>	<b>niveau 3</b>
1	26,5	179	533
2	27,1	191	532
3	26,9	182	529
4	26,2	179	517
5	26,7	181	539
6	27,6	179	518
7	27,6	180	531
8	26,9	177	527
9	26,7	181	544
10	27,4	182	537
11	26,7	183	559
12	26,9	181	558
13	28,1	183	525
14	27,7	177	538
15	26,8	179	563
16	27,4	172	526
17	26,8	177	542
18	27,7	178	524
19	27,9	181	522
20	29,1	176	535
<b>n</b>	20	20	20
<b>Moyenne (pg/mL)</b>	27,24	179,90	534,95
<b>Écart-type</b>	0,67	3,74	13,10
<b>CV (%)</b>	2,47	2,08	2,45

Tableau n°11 : Valeurs de PTH 1-84 obtenues (pg/mL) pour les 3 pools de sérum lors de l'étude de la répétabilité



axe des abscisses : essais ; axe des ordonnées : valeurs obtenues en pg/mL

Figure n°34 : Représentation graphique de la dispersion des valeurs obtenues lors de l'évaluation de la répétabilité

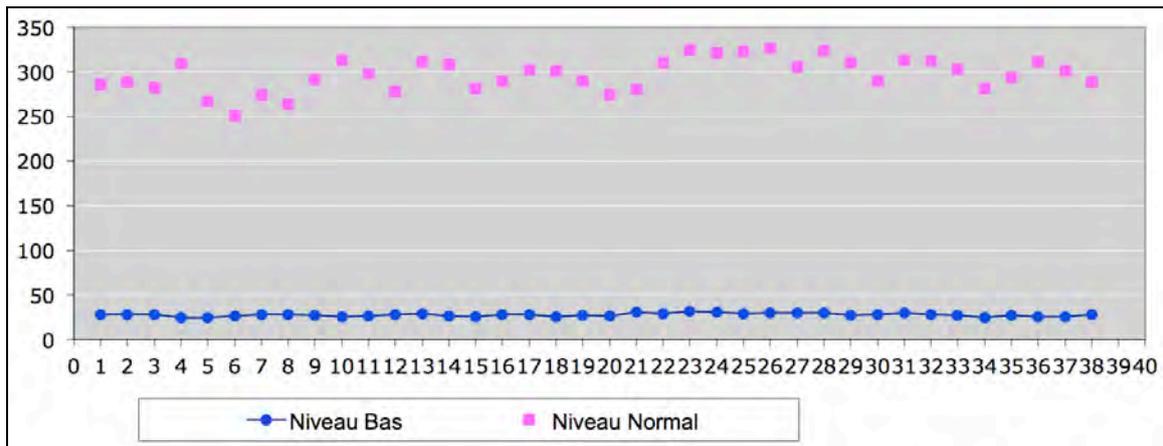
À partir des pools de sérum constitués dans le cadre de cet essai, la répétabilité est, pour des concentrations moyennes obtenues comprises entre 27,24 et 534,95 pg/mL, caractérisée par des CV < 2,5 %.

## Reproductibilité

L'étude de la reproductibilité a été faite à partir des valeurs obtenues lors des différents passages des 2 niveaux de contrôles internes de qualité CIQ (tableau n°12, figure n°35).

<b>Concentrations de</b>		
<b>PTH 1-84</b>	<b>pg/mL</b>	<b>pg/mL</b>
<b>Essais</b>	<b>niveau 1</b>	<b>niveau 2</b>
1	28,1	286
2	27,9	288
3	28,4	282
4	24,3	309
5	24,7	267
6	26	251
7	28	274
8	28	263
9	27,5	291
10	25,7	313
11	26	297
12	28,2	278
13	28,6	311
14	26,4	308
15	25,6	281
16	28,3	289
17	27,8	302
18	25	301
19	26,8	289
20	26,1	274
21	30,7	280
22	29,2	310
23	31,5	324
24	30,8	321
25	28,7	322
26	30,1	326
27	29,5	305
28	30	323
29	27,3	310
30	28,4	289
31	29,5	313
32	27,7	312
33	27,2	303
34	24,8	281
35	27,1	294
36	25,7	311
37	25,3	301
38	28,4	288
<b>n</b>	38	38
<b>Moyenne (pg/mL)</b>	27,61	296,50
<b>Écart-type</b>	1,82	18,35
<b>CV (%)</b>	6,6	6,19

Tableau n°12 : Valeurs obtenues (pg/mL) pour les 2 CIQ lors de l'étude de la reproductibilité



axe des abscisses : essais ; axe des ordonnées : valeurs obtenues en pg/mL

Figure n°35 : Représentation graphique de la dispersion des valeurs obtenues lors de l'évaluation de la reproductibilité des CIQ

Pour évaluer la reproductibilité de la méthode, 38 déterminations de chaque niveau de contrôle de qualité ont été prises en compte.

Les valeurs obtenues sont pour :

- CIQ niveau 1 : moyenne = 27,61 pg/mL ; écart-type = 1,82 ; CV = 6,6 %
- CIQ niveau 2 : moyenne = 296,50 pg/mL ; écart-type = 18,35 ; CV = 6,2 %.

### Contamination inter-échantillons

Les valeurs obtenues pour la détermination d'une éventuelle contamination inter-échantillons en respectant le protocole décrit dans le SH GTA 04 sont présentées dans le tableau n°13.

		Concentrations de PTH (pg/mL)							
Séries		H <sub>a</sub>	B <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	B <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	B <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>	B <sub>d</sub>
Passages	1	555	10,1	505	9,93	552	10,3	520	9,93
	2	504	10,1	513	10,1	574	10,4	540	10
	3	531	10,1	551	10,5	577	10,1	524	10,2

H<sub>i</sub> : série du pool de valeur élevée ; B<sub>i</sub> : série du pool de valeur basse

Tableau n°13 : Valeurs obtenues pour le calcul de la contamination inter-échantillons

L'analyse statistique à l'aide du test t de Student pour séries appariées ne met donc pas en évidence de différence significative ( $p = 0,41$ ) entre les valeurs susceptibles d'être contaminées (les valeurs des 1<sup>ers</sup> passages du pool « faible ») et celles qui ne le sont pas (les valeurs des 3<sup>èmes</sup> passages du pool « fort »).

Le calcul de la contamination selon la formule ci-dessous n'est donc pas nécessaire (et retrouverait une valeur de contamination  $< 0$  %).

$$\text{Contamination (en \%)} = [(mB1 - mB3) / (mH - mB3)] \times 100$$

Les résultats obtenus permettent de conclure à l'absence de contamination inter-échantillons.

***Stabilité des échantillons avant analyse : transport entre + 2 et + 8°C et à température ambiante***

La stabilité des échantillons avant dosage de PTH 1-84 a été analysée avec des échantillons récoltés lors d'une même ponction sanguine dans 2 tubes différents et qui sont parvenus en même temps au laboratoire dans des conditions de transport différentes : un tube dans de la glace et l'autre tube à température ambiante.

Les concentrations obtenues sont présentées dans le tableau n°14.

Tube	Services Cliniques	Concentrations en PTH 1-84 (pg/mL)	Concentrations en PTH 1-84 (pg/mL)	Différences relatives (%)
		Tubes à + 4°C (conditions de référence)	Tubes à température ambiante	
1	Néphrologie	20,8	18,6	-11
2	Néphrologie	13,8	12,3	-11
3	Néphrologie	63,2	59	-7
4	Néphrologie	21,2	18,9	-11
5	Endocrinologie	29	24,7	-15
6	Néphrologie	55,3	44,8	-19
7	Néphrologie	37,3	34,9	-6
8	Néphrologie	33	25,2	-24
9	Néphrologie	40,2	35,7	-11
10	Endocrinologie	33	32,5	-2
11	Néphrologie	13,1	13,4	+2
12	Endocrinologie	17,4	14,4	-17
13	Néphrologie	42,8	40,2	-6
14	Néphrologie	175	164	-6
15	Néphrologie	36	36,5	+1
16	Néphrologie	47,6	47,6	0
17	Néphrologie	46,4	44,2	-5
18	Endocrinologie	16,9	16,9	0
19	Endocrinologie	32	31,3	-2
20	Néphrologie	49,1	45,4	-8
21	Néphrologie	62,9	58	-8
22	Endocrinologie	35,7	31,2	-13
23	Endocrinologie	15,8	16	+1
24	Néphrologie	165	169	+2
25	Endocrinologie	18,9	17,8	-6
26	Endocrinologie	63,9	56,4	-12
27	Endocrinologie	15,4	14,9	-3
28	Endocrinologie	18,3	17,1	-7
29	Néphrologie	63,7	66,3	+4
30	Endocrinologie	20,8	20,8	0
31	Endocrinologie	25,3	20,8	-18
<b>n</b>		31	31	
<b>moyenne</b>		42,9	40,3	
<b>intervalle de mesure</b>		13,1-175	12,3-169	
<b>moyenne des différences relatives (%)</b>				-6,9

Tableau n°14 : Valeurs obtenues pour l'étude de la stabilité des échantillons à différentes températures

Pour le groupe des échantillons de sérums conservés à + 4°C, la concentration moyenne est de 42,9 pg/mL avec des valeurs extrêmes de 13,1 et 175 pg/mL.

Pour le groupe des échantillons de sérums conservés à température ambiante, la concentration moyenne est de 40,3 pg/mL avec des valeurs extrêmes de 12,3 et 169 pg/mL.

La moyenne des différences est de - 2,6 pg/mL avec une moyenne des différences relatives de - 6,9 %.

L'étude des conditions de température de transport des échantillons montre que la concentration en PTH des échantillons de sérums transportés à température ambiante est plus faible pour 26/31 échantillons (84 %) tandis qu'elle est plus élevée de 1 à 4 % pour 5 échantillons.

Le test t de Student met en évidence une différence significative entre les résultats des concentrations des échantillons de sérums de patients suivant les conditions de température de transport ( $p = 0,0002$ ).

La droite de corrélation entre les deux méthodes (figure n°36) est :  $y = 0,98x - 1,71$  ( $R^2 = 0,99$ ) avec  $y =$  transport à température ambiante et  $x =$  température à + 4°C. Elle montre une liaison linéaire entre les deux méthodes et le coefficient de corrélation indique une intensité élevée de cette relation.

La représentation graphique des différences en fonction de la moyenne des concentrations évaluées à partir des échantillons transportés entre + 2 et + 8°C est présentée selon le modèle de Bland et Altman dans la figure n°37.

La méthode de Bland et Altman permet d'évaluer la concordance entre 2 mesures d'une même grandeur. Le graphique permet de déterminer si la moyenne des différences est égale ou non à zéro et si cette différence varie en fonction du niveau de la mesure.

Le test de Bland-Altman montre ici une différence moyenne de - 2,58 pg/mL. La répartition autour de la moyenne est homogène pour les valeurs jusque 30 pg/mL, au delà, les valeurs ont une dispersion plus importante.

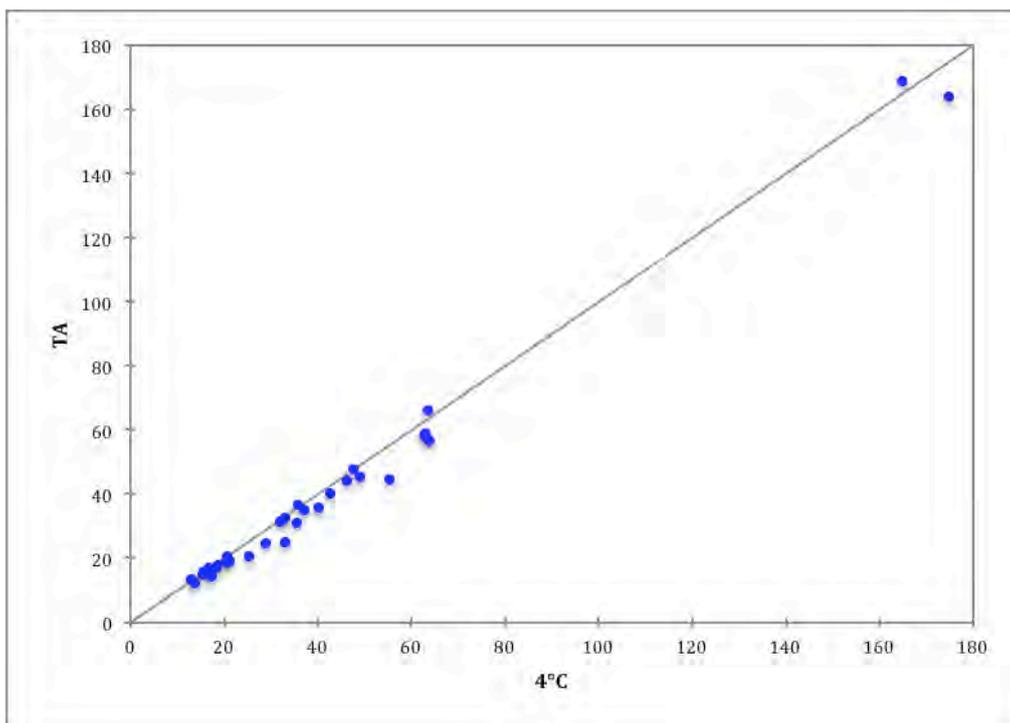


Figure n°36 : Corrélation entre les 2 méthodes, tubes à température ambiante (TA) pour le transport (y) par rapport aux tubes à + 4°C (x)

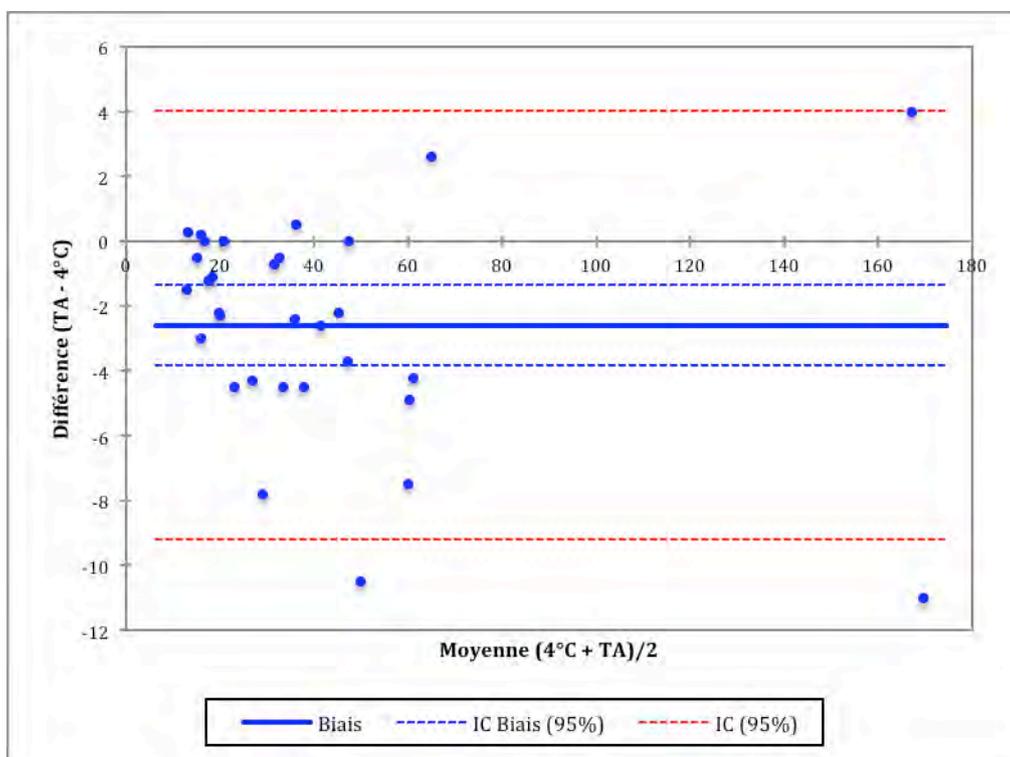
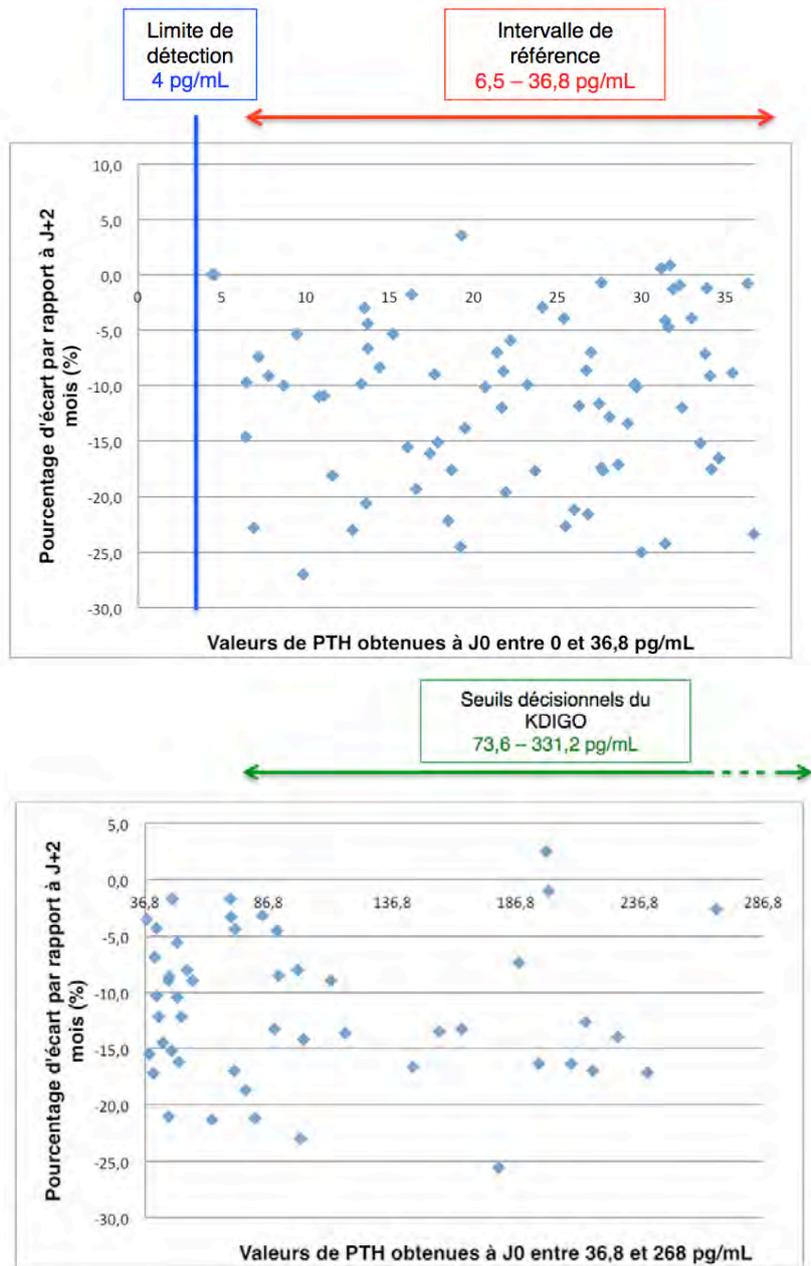


Figure n°37 : Diagramme des différences (TA - 4°C) en fonction de la moyenne des valeurs selon la représentation de Bland-Altman

### Stabilité des échantillons après conservation à - 20°C pendant 2 mois

Les valeurs obtenues avant et après conservation des échantillons 2 mois à - 20°C (2 mois étant la durée maximale de conservation des échantillons destinés au dosage de la PTH au laboratoire) sont présentées dans les figures 38 et 39.



Figures n°38 et 39 : Représentations graphiques des pourcentages d'écart entre les valeurs obtenues à J0 et à J+2 mois lors de la congélation des aliquotes à - 20°C

Les représentations graphiques du pourcentage d'écart entre les valeurs montrent, que chez 17 patients sur 125, la baisse de la concentration dépasse 20 % mais ne va jamais au delà de 30 %. Selon le fournisseur, pour la reproductibilité inter-essai des CV < 12 % sont escomptés. Nous avons fixé un seuil de 20 %, au delà, la différence de concentration sera jugée significative (comme Cavalier, 89).

Au delà des valeurs de l'intervalle de référence, seulement 5 patients présentent une variation de leur concentration supérieure à 20 %.

Les résultats de l'analyse statistique réalisée sont présentés dans le tableau n°15.

	n	valeur minimum	valeur maximum	moyenne	écart-type
<b>J0</b>	125	4,42	268	54,07	58,29
<b>+2 mois</b>	125	4,00	261	47,86	51,87

Tableau n°15: Valeurs obtenues pour l'étude de la stabilité des échantillons conservés à - 20°C

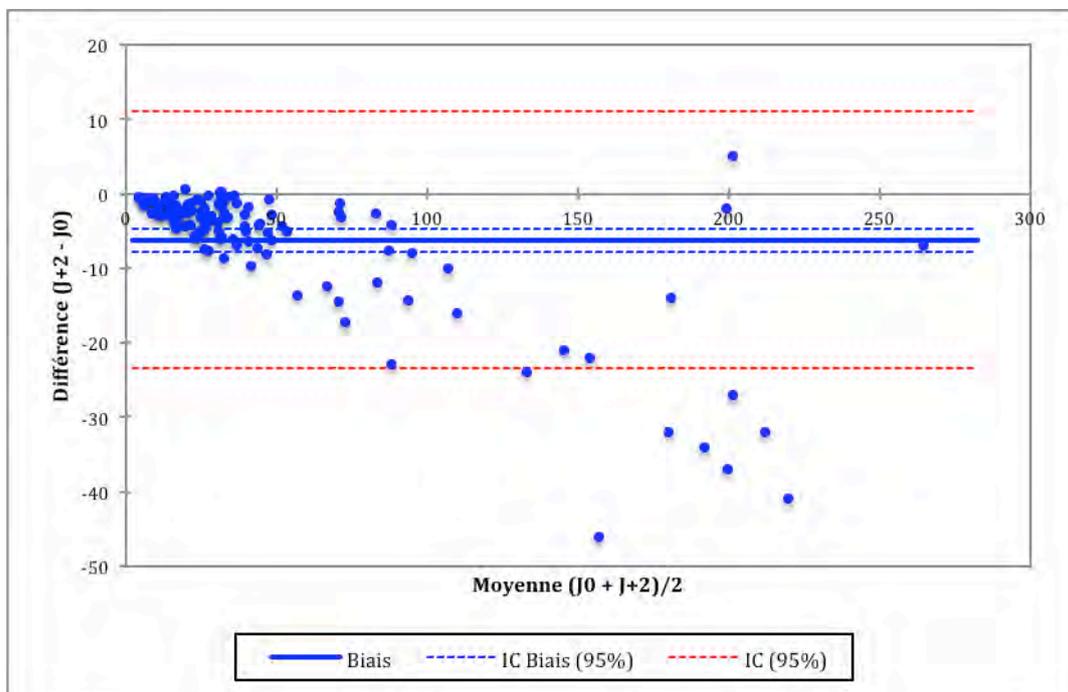


Figure n°40 : Diagramme des différences (J2 - J0) en fonction de la moyenne des valeurs selon la représentation de Bland-Altman

Le diagramme des différences selon Bland et Altman montre une différence moyenne de - 6,21 pg/mL avec des valeurs regroupées autour de la moyenne pour les valeurs faibles et comprises dans l'intervalle de référence, mais plus les concentrations augmentent et plus l'écart augmente.

La figure n°41 représente le classement des patients par rapport aux différentes valeurs cibles :

- valeurs inférieures à l'intervalle de référence
- valeurs comprises dans les valeurs physiologiques (intervalle de référence communiqué par le fabricant)
- valeurs supérieures aux limites de référence mais inférieures aux valeurs cibles proposées par le KIDGO
- valeurs dans la cible proposée par le KIDGO pour les patients insuffisants rénaux (entre 2 et 9 fois la valeur de la limite supérieure de l'intervalle de référence de la technique).

Pour 4 patients, les valeurs qui étaient supérieures à la limite de l'intervalle de référence se « normalisent » (< 36,8 pg/mL).

Pour les autres, la répartition des patients selon les recommandations du KIDGO est semblable pour les dosages (J0 et J+2 mois).

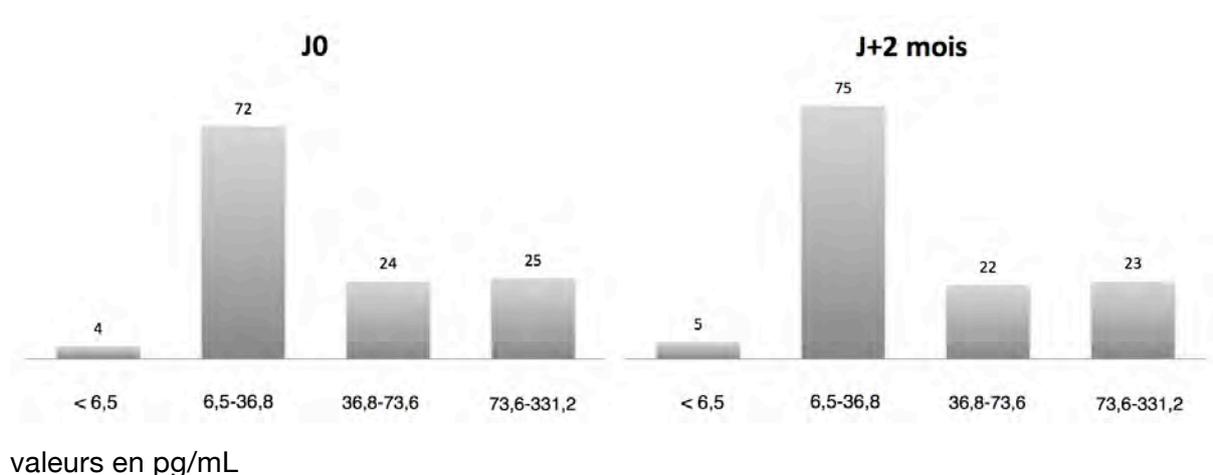


Figure n°41 : Classement des patients par rapport aux différentes valeurs cibles

**Comparaison de 2 méthodes de dosage de la PTH :  
Dxi 800 (Beckman Coulter)/Liaison XL (DiaSorin)**

Les concentrations de PTH déterminées par le Liaison XL et le Dxi 800 (tableau n°16) sont très différentes.

Les valeurs avec les réactifs Liaison 1-84 PTH sont inférieures à celles obtenues avec les réactifs Beckman Coulter.

Les résultats de 25 échantillons ont été comparés avec ceux obtenus avec l'ancien analyseur Dxi 800 de Beckman Coulter.

	<b>Liaison 1-84 PTH (pg/mL)</b>	<b>PTH Intact (pg/mL)</b>
<b>1</b>	4,1	2,8
<b>2</b>	5,6	4,9
<b>3</b>	10,4	14,7
<b>4</b>	13	15,4
<b>5</b>	9,9	20,7
<b>6</b>	15,7	25,1
<b>7</b>	16,1	27,9
<b>8</b>	29,1	33,3
<b>9</b>	20,8	33,3
<b>10</b>	19,9	34,9
<b>11</b>	20,2	36,2
<b>12</b>	29,7	42,9
<b>13</b>	21,5	43,9
<b>14</b>	25,1	44
<b>15</b>	30,4	45,7
<b>16</b>	33,1	48,1
<b>17</b>	20,4	51,8
<b>18</b>	31	65,5
<b>19</b>	49,4	91,3
<b>20</b>	52,7	100,4
<b>21</b>	68,7	104,2
<b>22</b>	100	205
<b>23</b>	124	206
<b>24</b>	232	413
<b>25</b>	236	476
<b>moyenne (pg/mL)</b>	48,8	87,5
<b>valeur minimum (pg/mL)</b>	4,1	2,8
<b>valeur maximum (pg/mL)</b>	236	476
<b>écart-type</b>	62,5	119,6

Tableau n°16 : Valeurs obtenues lors de la comparaison de la méthode de dosage PTH Intact (Dxi 800, Beckman Coulter) et le dosage PTH 1-84 (Liaison XL, DiaSorin)

Pour la trousse DiaSorin, la moyenne arithmétique obtenue est de 48,8 pg/mL pour des valeurs comprises entre 4,1 et 236 pg/mL.

Et pour la trousse Beckman, la moyenne arithmétique obtenue est de 87,5 pg/mL pour des valeurs comprises entre 2,8 et 476 pg/mL.

En régression linéaire (figure n°42), l'équation de la droite entre la méthode Beckman (x) et la méthode DiaSorin (y) est :  $y = 0,52 x + 3,3$  ( $R^2 = 0,99$ ).

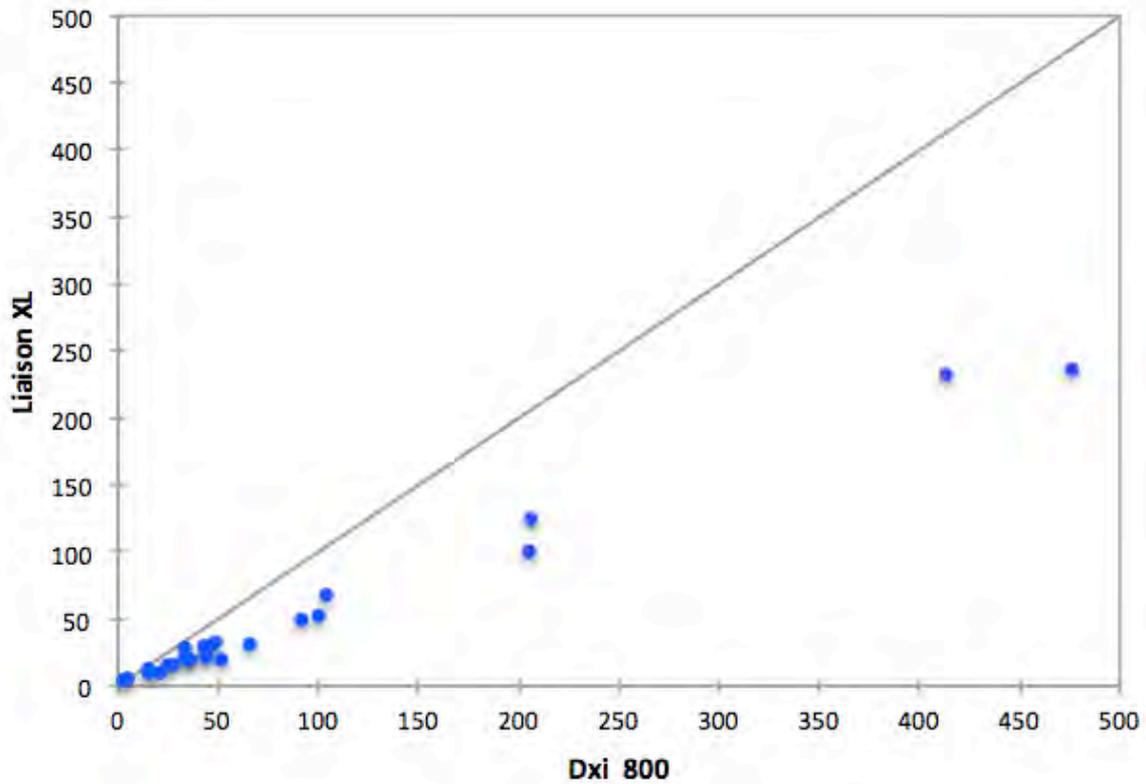


Figure n°42 : Représentation graphique de la droite de régression linéaire entre la technique de référence (X : Dxi 800) et la nouvelle technique (Y : Liaison XL)

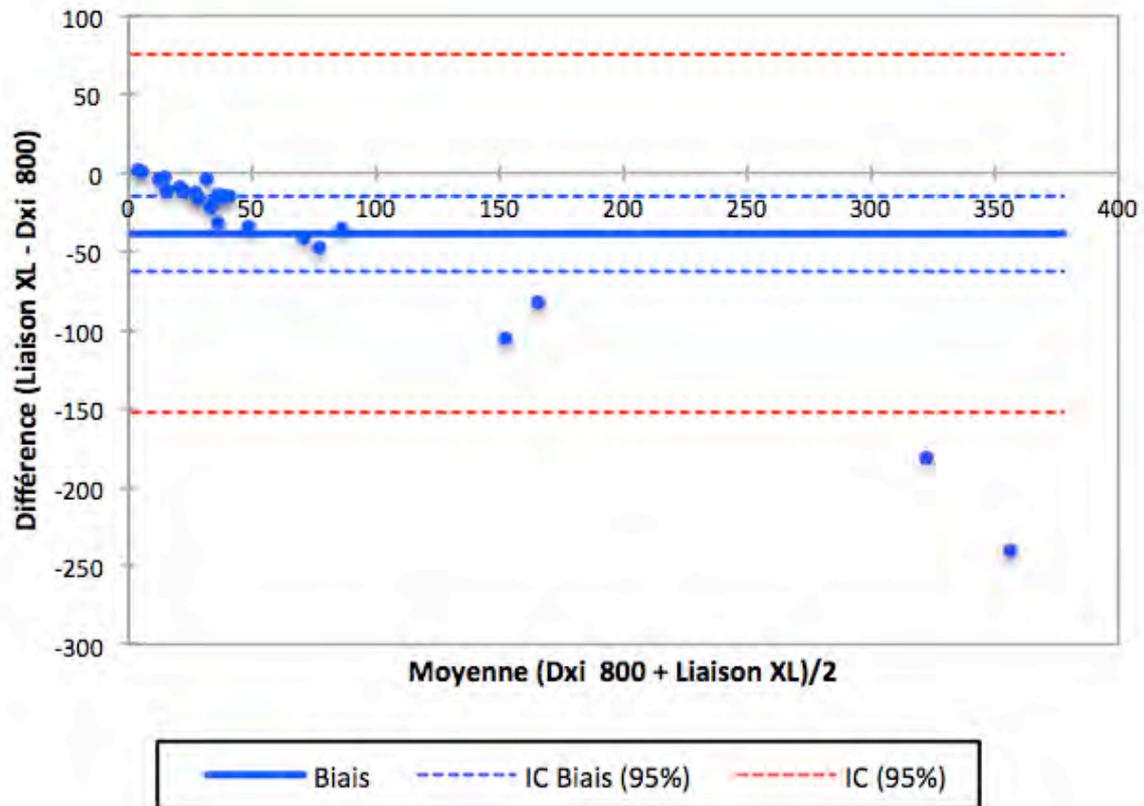


Figure n°43 : Représentation graphique selon la méthode de Bland et Altman des différences entre les méthodes en fonction de la moyenne des valeurs

La représentation graphique, selon la méthode de Bland et Altman, des différences entre les méthodes en fonction de la moyenne des valeurs est présenté figure n°43. Le biais moyen entre les valeurs obtenues avec les 2 méthodes est de - 38,73 pg/mL et plus la concentration de PTH mesurée augmente plus la différence est importante.

Nous constatons donc que les valeurs obtenues en PTH de 3<sup>ème</sup> génération sont plus basses que celles obtenues par la méthode de 2<sup>ème</sup> génération.

Mais si nous considérons la pathologie des patients ainsi que les intervalles de références ou les valeurs cibles des recommandations des sociétés savantes, nous n’observons aucune signification clinique à cette baisse de la concentration de PTH.

En effet, les patients n’ayant aucune pathologie rénale (n=10) qui avaient des valeurs

dans les limites de référence avec la technique de 2<sup>ème</sup> génération ont également des valeurs dans les limites de référence avec la méthode de 3<sup>ème</sup> génération (tableau n°17).

	PTH de 2 <sup>ème</sup> génération			PTH de 3 <sup>ème</sup> génération		
valeurs en pg/mL	< 12	12-88	> 88	< 6,5	6,5-36,8	> 36,8
nombre de patients	2	9	0	2	9	0

Tableau n°17 : Répartition des valeurs en fonction de la méthode de dosage et de l'intervalle de référence fourni par le fabricant

Et les patients ayant une IRC (n=14), les valeurs sont supérieures aux limites de référence et leur répartition selon les valeurs du KDIGO est semblable quelle que soit la technique utilisée (tableau n°18).

	PTH de 2 <sup>ème</sup> génération			PTH de 3 <sup>ème</sup> génération		
valeurs en pg/mL	< 176	176-792	> 792	< 73,6	73,6-331,2	> 331,2
nombre de patients	10	4	0	10	4	0

Tableau n°18 : Répartition des valeurs en fonction de la méthode de dosage et des valeurs cibles recommandées par le KDIGO

### ***Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure***

L'approche de l'incertitude de mesure n'a pas pu être réalisée car nous ne disposons pas de résultats d'évaluation externe de la qualité en nombre suffisant pour pouvoir estimer la justesse (nécessaire à ce calcul).

## **2.4. Discussion**

La PTH a fait l'objet de nombreux travaux au cours de ces dernières années apportant des informations nouvelles sur la biologie de cette hormone dont l'évaluation est de plus en plus fréquemment demandée.

Depuis peu, une méthode de dosage de la PTH 1-84, à l'aide des réactifs et de l'automate Liaison XL, dite de 3<sup>ème</sup> génération est disponible. Pour sa mise en place et utilisation au quotidien, cette technique entre dans la configuration d'une analyse quantitative vraie à accréditer selon la portée flexible de type A. Le pré-requis de l'accréditation est la constitution du dossier de validation de la méthode par le laboratoire.

Ce dossier comprend divers documents dont la présentation a été uniformisée par le Pôle Laboratoire dans lequel est intégrée, en accord avec la loi HPST, l'unité fonctionnelle d'Hormono-Onco-Neurobiologie du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Central où est réalisé ce dosage de la PTH.

Préalablement à la vérification expérimentale de la méthode, les étapes qui ont été réalisées comprennent :

- l'étude bibliographique
- la rédaction du mode opératoire du dosage en respectant les items de la procédure institutionnelle
- le choix des critères de performance à vérifier, en tenant compte des différents paramètres nécessaires au dossier d'accréditation indiqués dans le tableau du SH GTA 04.

Pour réaliser les évaluations, nous avons respecté dans la présentation de notre travail l'ordre des items du tableau du SH GTA 04.

Cependant, dans ce chapitre « Discussion », il nous a semblé plus pertinent de tenir compte de l'ordre chronologique des différentes étapes suivies par les échantillons

en abordant successivement les items des étapes pré-analytique, analytique et post-analytique.

### **2.4.1 Étape pré-analytique**

L'évaluation de certaines performances analytiques de la méthode est faite à partir d'échantillons sanguins. Au CHU de Nancy, les prélèvements sanguins sont effectués dans les services cliniques des Hôpitaux de Brabois ou de l'Hôpital Central par le personnel infirmier. Ils sont ensuite collectés toutes les heures dans les salles de soins et apportés au laboratoire par le service de coursiers via un service de navettes entre les deux sites. Le délai moyen entre le prélèvement de l'échantillon et son arrivée au laboratoire est d'environ 3h.

Dans le cadre de l'accréditation, cette configuration ne permet au biologiste de n'intervenir directement que pour deux paramètres de cette étape :

- le choix du tube primaire pour le prélèvement
- les conditions de transport des échantillons.

C'est pourquoi un « Manuel de Prélèvements », commun à tous les laboratoires du Pôle, a été rédigé, ceci dans le but de définir les règles de bonnes pratiques de réalisation et de transmission d'un prélèvement sanguin afin d'obtenir des échantillons sanguins conformes aux recommandations et permettant ensuite leur analyse.

#### ***Choix du tube primaire***

Le premier critère de cette étape réside dans le choix des tubes destinés à recueillir les échantillons.

Selon les indications de la fiche technique du fabricant de réactifs, les tubes destinés aux prélèvements pour dosage de PTH 1-84 peuvent être soit des tubes secs (avec ou sans gel) soit des tubes avec de l'EDTA.

Les tubes avec EDTA présentent l'avantage d'être traités (centrifugation, décantation) plus rapidement que les tubes secs mais l'utilisation de tels tubes a deux inconvénients :

- elle complique la tâche du préleveur car ils ne peuvent pas servir au recueil d'échantillons sanguins en vue de dosages conjoints (exemple : calcium)
- elle offre également un moindre confort aux patients dans la mesure où, si besoin, un recueil supplémentaire doit être fait avec un autre type de tube, ce qui peut poser un problème chez les enfants ou les patients « difficiles à piquer ».

En outre, pour certaines techniques de dosage de PTH de 2<sup>ème</sup> génération, il a été démontré que le remplissage des tubes EDTA (en volume) devait être > 50 %.

Les tubes secs sans anticoagulant adsorbé imposent un délai minimum d'environ 30 à 60 minutes afin d'assurer la coagulation.

Cependant le laboratoire préconise, dans la fiche de procédure de prélèvement du référentiel du pôle laboratoire, pour le dosage de la PTH de recueillir l'échantillon dans des tubes sec avec gel de 5 mL ou 7 mL.

Ceci permet lors d'une demande de dosage de PTH, l'évaluation du calcium total qui est systématiquement réalisée et celle du calcium ionisé qui n'est possible qu'à la condition que le tube primaire soit maintenu bouché et non décanté. En outre, dans de très nombreux cas, il existe une prescription pour l'évaluation conjointe de la vitamine D (calcidiol et/ou calcitriol). Tous ces paramètres peuvent être déterminés uniquement à partir d'un seul échantillon de sérum.

Le fait de pouvoir réaliser avec un volume de 1450 µL de sérum ce bilan complet présente de nombreux avantages :

- confort du patient : un seul tube et donc le plus faible volume de sang nécessaire est prélevé
- simplicité du prélèvement pour le personnel infirmier
- facilité de prise en charge au laboratoire : un seul dossier informatique.

### ***Stabilité lors du transport des échantillons jusqu'au laboratoire***

Pour être en conformité avec la norme NF EN ISO 15189, tout laboratoire doit adopter des dispositions concernant l'acheminement, la conservation et le délai avant analyse des échantillons.

D'après le paragraphe 5.4.3-4 du document SH REF 02 révision 01, il convient de tenir compte des recommandations du fournisseur et des sociétés savantes ainsi que des données de la littérature. Cependant, pour un examen donné il n'existe pas à ce jour de réponses consensuelles et pour des examens soumis à une étape de transport il incombe au laboratoire de prouver la stabilité des échantillons.

Tous les prélèvements adressés au laboratoire, effectués dans les services cliniques, sont acheminés par un service logistique de transport assuré par le CHU. Il était donc nécessaire dans le cadre de notre étude de déterminer si les conditions pré-analytiques dans la configuration des transferts entre les différents services du CHU de Nancy en particulier ceux intégrés sur le site des Hôpitaux de Brabois et le Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, implanté sur le site de l'Hôpital Central, étaient acceptables. Et ceci d'autant plus que des résultats contradictoires sur la stabilité de la PTH dans les échantillons ont été mis en exergue dans plusieurs études.

Selon la notice d'utilisation, la durée maximale de conservation des échantillons de sérum est de 7h à température ambiante (sans autre précision) et de 24h entre + 2 et + 8°C.

Nous avons choisi de tester l'influence de la température de conservation des échantillons sanguins recueillis dans des tubes secs pour une durée allant du prélèvement à la réception des échantillons au laboratoire c'est-à-dire un délai moyen de 3h mais toujours < 4h. Cette étape pré-analytique est identique quels que soient le jour et l'heure d'arrivée au laboratoire des tubes qui sont alors traités comme suit :

- arrivée au laboratoire les jours ouvrables avant 18h : après fractionnement en aliquotes, l'échantillon de sérum est placé dans l'automate pour un dosage immédiat
- arrivée au laboratoire après 18h ou les WE ou jours fériés : aliquotes immédiatement congelées et conservées à - 20°C pour un dosage différé.

Cette évaluation a été faite à partir de 2 échantillons de sang prélevés le même jour à la même heure pour chaque patient, recueillis dans 2 tubes secs identiques et apportés au laboratoire dans des conditions différentes :

- 1 échantillon transporté entre + 2 et + 8°C (avec de la glace) pour le dosage de la PTH
- 1 échantillon transporté à température ambiante entre + 18 et + 25°C pour le dosage d'autres paramètres.

Pour le groupe des échantillons de sérums :

- conservés entre + 4 et + 8°C : la moyenne est de 42,9 pg/mL avec des valeurs extrêmes de 13,1 et 175 pg/mL
- conservés à température ambiante, la moyenne est de 40,3 pg/mL avec des valeurs extrêmes de 12,3 et 169 pg/mL.

La moyenne des différences est de - 2,6 pg/mL avec une moyenne des différences relatives de - 6,9 %.

La droite de corrélation entre les valeurs obtenues pour les deux modalités de transport est  $y = 0,98 x - 1,71$  avec  $y =$  transport à température ambiante et  $x =$  température à + 4°C.

Dans la plupart des cas (84 %), la concentration de PTH des échantillons de sérums de patients conservés à température ambiante est inférieure à celle déterminée dans les échantillons conservés entre + 2 et + 8°C. La moyenne des différences est faible (- 6,9 %) mais statistiquement significative ( $p < 0,01$ ).

En revanche cette différence statistique doit être confrontée à la pertinence clinique. Les différences observées pour chacune des valeurs n'ont aucune conséquence sur l'interprétation clinique du résultat. En effet, dans seulement 2 cas sur 31 les concentrations de PTH 1-84 sont supérieures aux limites de référence (36,8 pg/mL) lorsque les échantillons ont été transportés à + 4°C et dans les limites de référence après acheminement à température ambiante. Mais la faible différence n'a pas de signification clinique évidente.

En outre, cela ne modifie pas la classification des valeurs obtenues pour les patients des services de Néphrologie et de Dialyse en se basant sur les valeurs seuils recommandées par le KDIGO. Pour la technique Liaison 1-84 PTH utilisée au laboratoire, les seuils de concentration de PTH pour la pathologie rénale qui correspondent à 2 et 9 fois la valeur supérieure de l'intervalle de référence, sont les suivants : 73,6 - 331,2 pg/mL.

Des variations plus ou moins importantes de la température de transport dite à « température ambiante » peuvent exister au cours de l'année. De ce fait, nous avons décidé de préciser dans la fiche du dosage de la PTH du référentiel des laboratoires du CHU que la conservation et le transport des échantillons jusqu'au laboratoire doivent être faits à une température entre + 2 et + 8°C (annexe n°3).

Dans la littérature, la plupart des travaux publiés sur la stabilité des échantillons pour le dosage de la PTH concernent des méthodes de dosage de 2<sup>ème</sup> génération. Or, les fragments reconnus par ces techniques n'ont pas la même stabilité que la molécule de PTH 1-84 intacte. Donc les résultats obtenus avec des kits de dosage de 2<sup>ème</sup> génération sont utiles mais ne peuvent pas être extrapolés aux techniques de 3<sup>ème</sup> génération.

De Talancé (58), en 2002, a montré une baisse de la concentration de PTH de 38% si le tube sec est laissé 24h sur la paillasse avant d'être centrifugé puis analysé. Cette altération du dosage de la PTH est selon cet auteur complètement maîtrisée par la conservation des échantillons à + 4°C. A la suite de ce travail, fait par une équipe de Nancy, les modalités de conditions de transport des échantillons avaient

été modifiées pour intégrer, dans les procédures GBEA du laboratoire, cette préconisation de température de conservation des échantillons.

Parent (en 2008, avec une technique de 2<sup>ème</sup> génération) a étudié la conservation des échantillons (tubes secs avec et sans gel, conservés à température ambiante ou à + 4°C) à 4h et retrouve une baisse significative de la concentration de PTH pour les échantillons prélevés sur tube sec sans gel séparateur et conservés à température ambiante. Dans tous les autres cas, aucune différence significative n'est mise en évidence (91).

Dans une étude plus récente publiée en 2009 (60), il met en évidence une altération (augmentation ou diminution) de la concentration de PTH si les échantillons sont conservés 18h à température ambiante. Ceci quel que soit le tube utilisé pour le prélèvement : tube sec avec ou sans gel ou tube avec EDTA et quels que soient la technique et l'automate : Elecsys 2010 (Roche Diagnostics), Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics) ou Liaison Intact PTH (DiaSorin). Par contre, si les échantillons sont conservés à + 4°C, aucune modification significative de la concentration de PTH n'apparaît.

Joly (59), en 2008, obtient des résultats similaires avec une diminution de la concentration de la PTH lorsque les échantillons sont conservés 18h à température ambiante.

Migliardi (92) et Souberbielle (65), en 2006, toujours avec des méthodes de 2<sup>ème</sup> génération, précisent qu'il est possible de conserver les échantillons de sérums jusqu'à 6h à température ambiante.

Parmi les rares études utilisant des techniques de 3<sup>ème</sup> génération, celle d'Inaba (68) faite en 2004 avec le dosage Bio-Intact PTH (1-84) de Nichols Institute montre une diminution significative de la concentration de PTH à partir d'un échantillon de sérum conservé 24h à température ambiante alors que cette concentration reste stable si la conservation a lieu à + 4°C. Par contre, ces réactifs de dosage de 3<sup>ème</sup> génération ne sont plus disponibles sur le marché depuis plusieurs années.

Nos résultats sont comparables à ceux de l'étude faite avec les réactifs PTH 1-84 DiaSorin Liaison par Cavalier et al. (89). À partir d'échantillons de 14 patients hémodialysés, recueillis dans des tubes secs et des tubes contenant de l'EDTA, avec des délais plus ou moins longs de conservation, ils en arrivent aux conclusions suivantes : (figures n°44 et 45)

- à température ambiante : la PTH dans le plasma EDTA est relativement stable (perte d'activité moyenne de 4,1 %) alors que sa dégradation dans le sang coagulé est importante : - 8,4 %  $\pm$  4,8 après 8 heures et - 20,5 %  $\pm$  10,1 après 24 heures ( $p < 0,001$ ).
- après une journée de conservation à - 20°C : aucune dégradation de la PTH que ce soit pour les échantillons sériques ou les échantillons de plasma EDTA (- 6,2 et - 6,6 %, respectivement) n'est observée.
- après 5 jours de conservation à - 20°C, la dégradation de la PTH est plus importante pour les échantillons prélevés sur EDTA que pour les échantillons sériques (- 10,8 %  $\pm$  2,4 contre - 7,2 %  $\pm$  2,2).

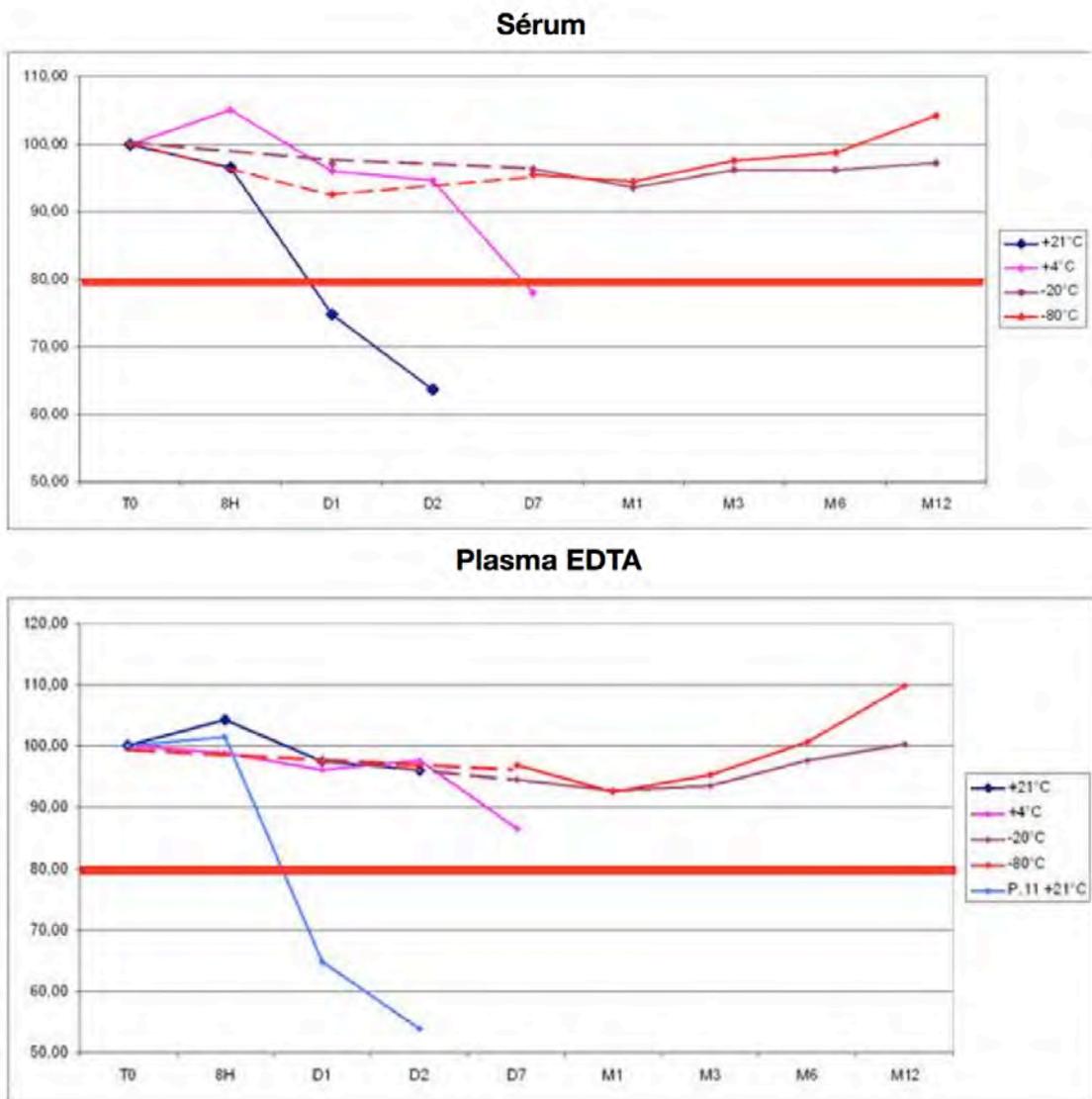


Figure n°44 et 45 : Stabilité de la PTH évaluée avec les réactifs PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison (DiaSorin) en fonction des modalités de recueil et de conservation des échantillons sanguins (89)

Selon Cavalier et al., le type de tube à utiliser pour le prélèvement sanguin en vue du dosage de la PTH pourrait tenir compte de la façon de travailler du laboratoire : s'il s'agit d'un laboratoire multi-sites avec le dosage en flow continu, il serait plus intéressant d'utiliser des tubes avec EDTA, tandis que dans le cas de dosages en séries avec une conservation des échantillons congelés avant de les doser, le sérum serait plus adapté.

La stabilité de la PTH 1-84 et des fragments dans les échantillons sanguins ne fait pas l'objet d'un consensus : d'après Cavalier il est possible que la PTH 1-84 ait une stabilité supérieure aux fragments.

### **2.4.2 Étape analytique**

La fidélité fait partie des performances analytiques de la méthode à déterminer. Elle exprime, selon le BIPM, « l'étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées » (93).

Elle inclut l'étude de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) et de la reproductibilité (inter-laboratoires). Elle est le reflet de l'erreur aléatoire et ne fournit d'indications que sur les erreurs dues au hasard.

#### ***Répétabilité***

Les caractéristiques de la répétabilité ont été évaluées par 20 dosages lors de la même série journalière. En raison du volume de sérum par échantillon nécessaire à la réalisation de ces 20 dosages et compte tenu également du volume mort, 3 pools de sérum ont été constitués à partir d'échantillons de sérums de patients.

Le fabricant présente, dans la notice d'utilisation de la méthode de dosage, des résultats obtenus pour différentes séries qu'il a testées et qui comprennent 160 déterminations (tableau n°19). Les CV obtenus selon le niveau de la concentration étudiée sont compris entre 3,1 % et 4,9 %.

Échantillon	CIQ1	CIQ2	1	2	3	4	5	6	7
<b>Nombre de détermination</b>	160	160	160	160	160	160	160	160	160
<b>Moyenne (pg/mL)</b>	28,5	288,5	10,6	16,6	33,5	171,3	377,7	876,6	1662
<b>Écart-type</b>	1,4	13,8	0,46	0,60	1,0	6,5	12,4	32,4	51,6
<b>CV (%)</b>	4,9	4,8	4,3	3,6	3,1	3,8	3,3	3,7	3,1

Tableau n°19 : Valeurs de répétabilité présentées par le fabricant dans la notice d'utilisation (référence 310630)

Le CV limite de la répétabilité acceptable décrit dans la notice d'utilisation du fournisseur pour des concentrations comprises entre 20 et 1800 pg/mL (tableau n°20) est de 6 % pour des séries d'échantillons de moins de 160 valeurs (répétabilité escomptée fournisseur).

Concentration de PTH 1-84	Répétabilité escomptée
4-20 pg/mL	≤ 10 %
20-1800 pg/mL	≤ 6 %

Tableau n°20 : Répétabilité escomptée selon le niveau de dosage fournie par le fabricant

Les résultats obtenus au Laboratoire pour la répétabilité sont comparables aux valeurs communiquées par le fabricant. En effet, les concentrations des pools préparés pour étudier cette caractéristique sont dans la gamme des valeurs mesurées par le fabricant. La concentration moyenne testée la plus haute (534,95 pg/mL) n'est toutefois pas aussi élevée que celle du fabricant (valeur moyenne : 1662 pg/mL).

Les essais réalisés par le fabricant ont été faits avec des échantillons de sérums ayant des concentrations comprises entre 10,6 et 1662 pg/mL c'est-à-dire dans la plage de mesure réalisable sans dilution entre 4 et 1800 pg/mL. Les CV obtenus sont compris entre 4,3 % pour la concentration la plus faible (10,6 pg/mL) et 3,1 % pour la concentration la plus élevée.

Les CV que nous obtenons sont tous inférieurs tant aux CV escomptés (nombre d'échantillons  $n < 160$ ) qu'aux CV obtenus lors des séries de tests du fournisseur. Ils sont donc acceptables et également en accord avec ceux présentés récemment par Cavalier c'est-à-dire  $< 8\%$  pour cette méthode (94).

Echantillons	Nombre (n)	Moyenne (pg/mL)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%)	
						littérature (données personnelles Cavalier)	Répétabilité escomptée fournisseur (%)
pool niveau 1	20	27,24	0,67	2,47	4,9	5,4	$\leq 6$
pool niveau 2	20	179,90	3,74	2,08	3,8	3,4	$\leq 6$
pool niveau 3	20	534,95	13,10	2,45	3,3	3,1	$\leq 6$

Tableau n°21 : Synthèse des valeurs obtenues au laboratoire lors de l'évaluation de la répétabilité ainsi que des recommandations (fournisseur et littérature)

### ***Reproductibilité***

L'étude de la fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire a été réalisée à partir des valeurs des 2 contrôles internes de qualité quotidiens.

À partir de 38 déterminations de chaque niveau de CIQ, faites au cours d'une période de 8 semaines, les valeurs obtenues sont les suivantes :

- CIQ niveau 1 : moyenne = 27,61 pg/mL, écart-type = 1,82 et CV = 6,6 %
- CIQ niveau 2 : moyenne = 296,50 pg/mL, écart-type = 18,35 et CV = 6,19 %.

Les valeurs indiquées par le fabricant dans la notice d'utilisation (tableau n°22) sont caractérisées par des CV compris entre 4,0 et 7,2 %.

Échantillon	CIQ1	CIQ2	1	2	3	4	5	6	7
<b>Nombre de détermination</b>	160	160	160	160	160	160	160	160	160
<b>Moyenne (pg/mL)</b>	28,5	288,5	10,6	16,6	33,5	171,3	377,7	876,6	1662
<b>Écart-type</b>	2,0	16,2	0,59	0,79	1,4	8,6	15,3	38,9	78,0
<b>CV (%)</b>	7,2	5,6	5,5	4,7	4,1	5,0	4,0	4,4	4,7

Tableau n°22 : Valeurs de reproductibilité présentées par le fabricant dans la notice d'utilisation (référence 310630)

Le fabricant préconise (tableau n°23) de respecter des CV  $\leq 12\%$  pour des concentrations de PTH entre 4 et 20 pg/mL et  $\leq 9\%$  pour des taux  $> 20$  pg/mL, jusqu'à la limite de linéarité de 1800 pg/mL si le nombre de tests est inférieur à 160.

Concentrations de PTH 1-84	Reproductibilité escomptée
4-20 pg/mL	$\leq 12\%$
20-1800 pg/mL	$\leq 9\%$

Tableau n°23 : Reproductibilité escomptée selon le niveau de dosage fournie par le fabricant

Les résultats de nos essais sont comparables à ceux du fournisseur. En effet, les échantillons que nous avons utilisés pour l'étude de la reproductibilité sont les 2 niveaux de contrôles internes de qualité (Liaison Control 1-84 PTH, DiaSorin, référence 310631), également évalués par le fabricant.

Le CV obtenu pour le CIQ de niveau 1 (concentration dans les limites de référence) est inférieur à celui présenté par le fournisseur (6,6 % versus 7,2 %). Par contre, le CV correspondant au CIQ de niveau 2 (concentration élevée) est légèrement supérieur à celui du fabricant (6,19 % versus 4 %). Mais ces valeurs sont toutes deux inférieures aux CV préconisés par le fournisseur de réactifs pour des séries  $< 160$  valeurs et celles publiées par Cavalier c'est-à-dire  $< 8\%$  (94) : elles sont donc satisfaisantes.

Echantillons	Nombre (n)	Moyenne (pg/mL)	Ecart- type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%)	
						littérature (données personnelles Cavalier)	Répétabilité escomptée fournisseur (%)
CIQ niveau 1	38	27,61	1,82	6,6	7,2	5,4	≤ 9
CIQ niveau 2	38	296,50	18,35	6,19	4,0	4,1	≤ 9

Tableau n°24 : Synthèse des valeurs obtenues au laboratoire lors de l'évaluation de la reproductibilité ainsi que des recommandations (fournisseur et littérature)

### **Contamination**

La contamination lors de l'utilisation d'un système analytique, peut être de deux types : la contamination inter-échantillons (entre des échantillons de valeurs hautes et de valeurs basses) et la contamination inter-réactifs (lorsque le système de distribution des réactifs est commun à tous les réactifs).

Seule la contamination inter-échantillons a été envisagée dans notre travail conformément aux recommandations du COFRAC. Il s'agit d'un phénomène résultant du transfert d'une quantité suffisante d'un échantillon pour en modifier de façon évaluable et quantifiable un autre. L'étude de cette contamination est importante car si cet « effet mémoire » est présent, il peut altérer l'exactitude des mesures.

Elle a été évaluée à l'aide de 2 pools de sérums de patients constitués de manière à ce qu'ils contiennent des concentrations différentes de PTH respectivement proches de 10 pg/mL et proches de 500 pg/mL.

Dans notre étude, l'analyse comparative à l'aide du test t de Student ne met pas en évidence de différence significative ( $p = 0,41$ ) entre les valeurs susceptibles d'être contaminées. Les résultats obtenus permettent de conclure à l'absence de contamination inter-échantillons. Cette donnée est très importante compte tenu de l'étendue des valeurs de PTH observées au laboratoire. En effet, chaque jour parviennent au laboratoire des échantillons de sérums de patients venant de différents

services cliniques et présentant des taux de PTH de valeurs très disparates. Les concentrations peuvent être dans les valeurs basses chez les patients présentant une ostéoporose ou chez les patients ayant une hyperparathyroïdie secondaire à une insuffisance rénale chronique et ayant nécessité une parathyroïdectomie.

Dans d'autres cas, les valeurs peuvent être élevées > 400 pg/mL. Pour le dosage, les échantillons ne sont pas triés en fonction des services prescripteurs et ceux qui présentent des valeurs bien supérieures à la normale pourraient donc modifier le résultat des échantillons suivants, en surestimant leur valeur.

Nos résultats montrent donc que ce n'est pas le cas lors du dosage de la PTH 1-84 par l'automate Liaison XL.

### ***Approche de l'estimation de l'incertitude de mesure***

Les résultats quantitatifs des analyses de biologie médicale sont interprétés par rapport à des intervalles de référence, des seuils de décision clinique ou des résultats antérieurs du même patient, d'où la nécessité d'exprimer l'incertitude de mesure portant sur la valeur du résultat pour une interprétation optimale de celui-ci.

Comme il est rappelé par le groupe de travail sur les incertitudes de mesure de la SFBC : « un résultat quantitatif d'analyse n'est véritablement complet que s'il est accompagné de l'évaluation quantitative de son incertitude » (113).

La méthode de calcul de l'incertitude de mesure recommandée par le COFRAC nécessite l'utilisation des valeurs obtenus lors d'EEQ (valeurs du laboratoire, valeurs cibles et valeurs des pairs), or l'automate Liaison XL est en place seulement depuis le mois de juin 2012, donc seule une évaluation externe de la qualité a été réalisée depuis, ce qui ne permet pas le calcul de cette incertitude.

Il faudra donc attendre l'obtention de nouvelles valeurs pour l'évaluer.

Cette incertitude a été évaluée par Cavalier lors de la validation de méthode qu'il a réalisée pour la PTH 1-84 (données personnelles communiquées par Etienne Cavalier). Il a utilisé le logiciel « e-noval » pour la déterminer et obtient des incertitudes étendues relatives allant de 27 % pour les concentrations les plus faibles (1,5 à 3,2 pg/mL) à 9 % pour les concentrations plus élevées (valeurs testées de 8 à 440 pg/mL).

Il faudra donc actualiser ces données dès la réception des prochains résultats d'EEQ par le laboratoire, pour pouvoir compléter les connaissances sur la technique et proposer une interprétation la plus juste possible au prescripteur.

### ***Comparaison de 2 méthodes de dosage de la PTH :***

#### ***Dxi 800 (Beckman Coulter)/Liaison XL (DiaSorin)***

Dans l'intérêt des patients, tout changement de technique nécessite de comparer les valeurs obtenues avec la technique utilisée et celle qui va être mise en place bien que selon les recommandations du SH GTA 04 cette approche ne soit pas obligatoire.

Cependant, lors du changement de la technique du dosage de la PTH, nous avons dû prendre en considération :

- la reconnaissance variable des diverses formes moléculaires de la PTH par les anticorps fournis par le fabricant
- et les recommandations du KDIGO pour l'interprétation des valeurs en cas d'IRC.

Notre travail comprend la détermination des concentrations de PTH d'une part avec les réactifs Liaison 1-84 PTH à l'aide de l'automate Liaison XL et d'autre part avec les réactifs Intact PTH de Beckman Coulter à l'aide de l'automate Dxi 800 dans les échantillons sanguins. Les dosages ont été faits le jour même de la réception des échantillons sanguins immédiatement après décantation et fractionnement en aliquotes, simultanément avec les deux automates.

Avec les réactifs PTH 1-84 (DiaSorin), la moyenne est de 48,8 pg/mL, l'écart-type est de 62,5 pour des valeurs comprises entre 4,1 et 236 pg/mL. Et pour les réactifs Intact PTH, la moyenne est de 87,5 pg/mL, l'écart-type est de 119,6 pour des valeurs comprises entre 2,8 et 476 pg/mL.

Avec les réactifs Liaison 1-84 PTH, les valeurs sont toujours inférieures à celles obtenues avec les réactifs Beckman Coulter. À l'exception de deux valeurs proches de la sensibilité fonctionnelle, c'est à dire 4 pg/mL (valeur identique pour les 2 techniques utilisées), les concentration de PTH 1-84 évaluées sur le Liaison XL sont inférieures de

30 à 60 % par rapport à celle de la PTH déterminée avec le Dxi.

Cette diminution des concentrations correspond à ce qui est décrit dans la littérature compte tenu des caractéristiques des méthodes de dosages utilisées. Le dosage de PTH Intact avec les réactifs Beckman appartient à la catégorie des dosages de 2<sup>ème</sup> génération et présente des interférences avec divers fragments de la PTH. Par contre, le dosage de PTH 1-84 avec les réactifs DiaSorin fait partie de la catégorie des dosage de 3<sup>ème</sup> génération (méthode de dosage sans aucune réactivité croisée avec les différents fragments non-1-84 de la PTH).

En régression linéaire, l'équation de la droite entre la méthode Beckman (x) et la méthode DiaSorin (y) est :  $y = 0,52 x + 3,3$  ( $R^2 = 0,99$ ).

Sur le marché il existe également une méthode de dosage de la PTH dite de 2<sup>ème</sup> génération de la société DiaSorin pour l'automate Liaison. L'étude comparative des concentrations évaluées avec les réactifs de 2<sup>ème</sup> génération (« Intact PTH ») et ceux de 3<sup>ème</sup> génération (« PTH 1-84 ») de ce fabricant a été faite par Cavalier et al. à partir de 312 échantillons (95).

À partir des prélèvements faits chez 240 sujets témoins (120 Hommes, 120 femmes) en bonne santé (« healthy subjects »), ayant un taux de vitamine D > 32 ng/mL les limites de référence observées sont pour

- le dosage de « PTH intact » : 12 - 58 pg/mL
- le dosage de « PTH 1-84 » : 5 - 26 pg/mL.

Entre les concentrations mesurées dans 72 échantillons de patients ayant une IRC traitée par hémodialyse par ces deux techniques, la droite de régression linéaire est :  $y$  (« PTH intact ») =  $1,57 x$  (« PTH 1-84 ») + 117 ( $r = 0,953$ ) (figure n°46).

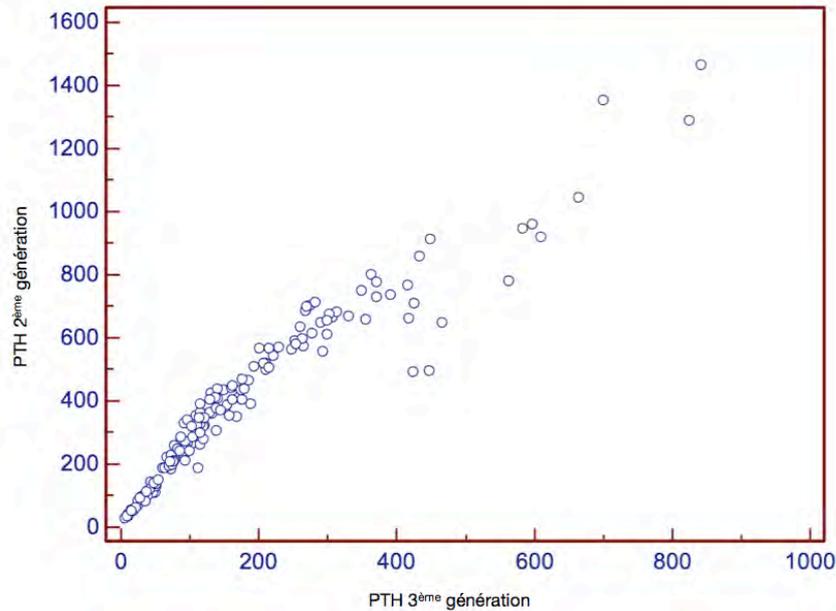


Figure n°46 : Régression linéaire entre des concentrations de PTH, évaluées chez des patients ayant une IRC traitée par hémodialyse, avec les réactifs DiaSorin PTH Intact et PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison (95)

En fonction de la classification de ces patients selon l'intervalle de référence proposé par les recommandations du KDIGO, aucune différence significative n'est observée (figure n°47).

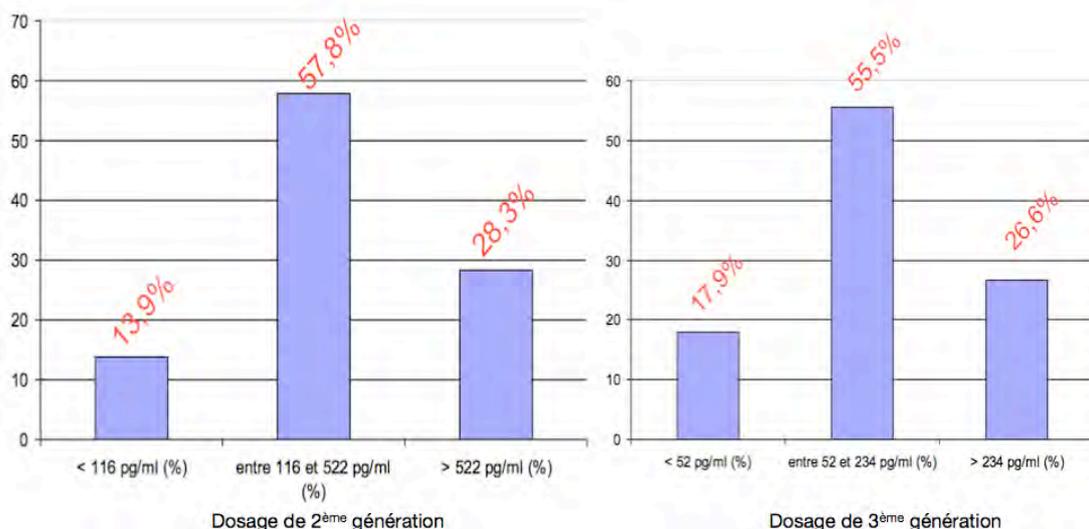


Figure n°47 : Classification KDIGO des patients ayant une IRC traitée par hémodialyse à partir des concentrations de PTH évaluées avec les réactifs DiaSorin PTH Intact et PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison (95)

Delanaye et al. (96) ont suivi l'évolution de la PTH chez un même patient par dosages répétés à 6 semaines d'intervalle (n=79 patients) et à un an d'intervalle (n=48 patients) avec les deux méthodes DiaSorin. Que ce soit à court ou à long terme, il observe une bonne corrélation entre les différences de PTH mesurées par les deux techniques. Dans la majorité des cas la PTH varie de la même manière et dans des proportions identiques que ce soit avec les techniques de 2<sup>ème</sup> génération ou avec celle de 3<sup>ème</sup> génération. Néanmoins, il existe des discordances dans les pourcentages respectifs des variations dans environ 15 % des cas.

L'évaluation du dosage de la PTH 1-84 par automate Liaison DiaSorin a été également comparée au dosage de la PTH intacte par automate Modular Roche. Nizou et al. (97) observent dans une population de dialysés des valeurs plus basses avec la méthode de 3<sup>ème</sup> génération et une corrélation entre les deux techniques caractérisée par une droite de régression  $y \text{ (PTH 1-84)} = 0,51 \times \text{(PTH Intact)} - 0,76$ . Il constate que la corrélation est moins bonne pour les valeurs hautes supérieures à 450 pg/mL, mesurées avec la technique Roche, laissant supposer l'accumulation de fragments non-(1-84) de PTH chez les patients dialysés.

En l'absence prouvée d'interférences avec des fragments de la PTH dépourvus d'activité qui s'accumulent lors de insuffisance rénale, l'évaluation de cette hormone par une méthode de 3<sup>ème</sup> génération devrait être le meilleur reflet de l'activité de la PTH.

Néanmoins, beaucoup d'études confirment et soulignent l'importante relation existant entre les concentrations de PTH mesurées par les deux générations de dosage (42, 97, 98, 99).

Il n'est donc pas certain qu'on puisse obtenir des informations cliniques différentes avec ces deux types de techniques. Pour répondre à cette question, il a été proposé de calculer le ratio entre les valeurs obtenues avec des méthodes de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération.

En 2010, Herberth et al. (100) ont présenté une étude effectuée chez des patients avec une IRC au stade 5D ayant eu une biopsie osseuse et des dosages de PTH avec des réactifs immunoradiométriques (kit Scantibodies Laboratory, Santee, Californie) qui

permettent de réaliser deux dosages différents. Le premier test, Intact PTH (iPTH), de 2<sup>ème</sup> génération reconnaît la PTH 1-84 et les fragments non 1-84 (fragments amino-PTH exclus) quant au second test de 3<sup>ème</sup> génération, PTH 1-84, il évalue la PTH 1-84 et les fragments amino-PTH.

À partir des concentrations obtenues avec ces deux méthodes, Herberth et al. calculent :

- la concentration des larges fragments C-terminaux : « C-PTH » = iPTH - PTH 1-84
- le ratio : PTH 1-84 / C-PTH

Ils ont déterminé l'aide apportée par le calcul de ce ratio pour étudier le turn-over osseux chez ces patients. Chez les patients noirs, le ratio aide à la détection d'un turn-over osseux bas et élevé. En revanche, chez les patients blancs, seul le diagnostic d'un turn-over osseux bas est facilité par l'utilisation du ratio.

Actuellement, il est difficile de définir le pourcentage respectif des techniques de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération utilisées dans les laboratoires. D'après le dernier compte-rendu du contrôle de qualité externe Probioqual qui compte près de 500 adhérents, il semble exister une prépondérance de techniques de 2<sup>ème</sup> génération : en revanche aucun chiffre précis ne peut être avancé car certaines valeurs ont été obtenues avec des réactifs de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération non différenciés (manque de rigueur dans l'enregistrement des techniques par les laboratoires sur la feuille de rendu de résultat).

D'autres études comparatives supplémentaires entre les concentrations des deux générations de PTH et les données histomorphométriques obtenues sur des biopsies osseuses de patients insuffisants rénaux, en particulier en tenant compte des traitements freinateurs de la PTH (calcium-vitamine D ou calcimimétiques) actuels ou antérieurs sont nécessaires à l'établissement de la validation consensuelle d'une méthode standardisée.

## ***Autres paramètres***

Dans ce travail nous avons effectué divers essais permettant de vérifier certaines caractéristiques du dosage indiquées par le fabricant et envisagées dans le SH GTA 04. Mais d'autres paramètres peuvent être étudiés au laboratoire. Cependant, en l'absence d'évaluation au sein du laboratoire, le fabricant de réactif et la littérature nous permettent d'obtenir les données nécessaires à l'utilisation de la technique. Ces paramètres sont détaillés ci-dessous.

### **Les valeurs de référence**

L'établissement des valeurs de référence est un problème récurrent pour tous les laboratoires quel que soit le paramètre considéré. En effet, les fournisseurs de réactifs précisent bien dans les notices d'utilisation que ces valeurs sont fournies à titre indicatif et que chaque laboratoire doit vérifier la validité de ces valeurs et établir ses propres domaines de référence selon la population étudiée. Or, la détermination par un laboratoire de valeurs de référence de PTH avec une méthode donnée présente deux difficultés.

Il convient tout d'abord de pouvoir disposer d'échantillons d'une population de sujets témoins des deux sexes, d'âges différents, sans antécédents médicaux ou chirurgicaux, exempts de toute pathologie ou traitement médicamenteux susceptibles de perturber directement ou indirectement le métabolisme phosphocalcique ou osseux.

Quant à la seconde difficulté, elle réside dans le fait que les valeurs sanguines de PTH sont influencées par les concentrations de 25 OH vitamine D qui dépendent elles-mêmes de l'exposition solaire (les saisons, la localisation géographique, les coutumes vestimentaires, le degré de la pigmentation cutanée) et de l'alimentation.

Dans ce contexte, les conditions de définition des valeurs « normales » ont une importance majeure. Or, dans la plupart des cas, quelle que soit la méthode de dosage de PTH, elles sont établies à partir d'une population simplement dite « en bonne santé » sans prise en compte du statut vitaminique D des sujets « sains ».

Certains auteurs ne constatent pas d'influence (101) ou n'observent qu'une faible influence des taux de 25 OH vitamine D sur les valeurs de référence (102). Par contre, d'autres études mettent en exergue depuis plusieurs d'années (103, 104) l'importance de tenir compte chez ces sujets témoins de critères clinicobiologiques, dont l'absence d'insuffisance rénale et du taux de 25 OH vitamine D qui ne font pas l'objet d'un consensus et dont les valeurs considérées sont selon les auteurs : > 30 ng/mL ou > 32 ng/mL ou > 50 ng /mL. La concentration sérique en 25 OH vitamine D est le paramètre biologique permettant d'évaluer le statut vitaminique D. Cela suppose donc que la 25OHD soit mesurée dans la population de référence, et que les sujets ayant une valeur basse de 25OHD soient éliminés, mais les différentes valeurs seuils utilisées soulignent les difficultés de définition du statut en vitamine D.

La majorité des experts définissent le déficit par une valeur < 30 ng/mL et une insuffisance par une valeur entre 20 et 30 ng/mL (105). Mais le rapport publié en 2011 par les experts de l'institut de médecine américain (IOM) suggère que ce seuil soit surestimé et doit être ramené à 20 ng/mL (106).

Pour la méthode de dosage de la PTH 1-84 avec les réactifs et l'automate Liaison XL (DiaSorin), les valeurs de référence sont :

- 5-35,3 pg/mL chez des sujets volontaires en bonne santé selon Lepoutre (107)
- 4,6-26,8 pg/mL pour des sujets qui ont des taux de 25 OH vitamine D > 30 ng /mL selon Cavalier (94)
- celles données à titre indicatif dans la procédure du fournisseur (tableau n°25).

	Sérum	Plasma EDTA
<b><u>Sujets (n=125)</u></b>		
<b>Concentrations (pg/mL)</b>		
<b>Médiane</b>	15,3	16,1
<b>(extrêmes)</b>	4,6 - 58,1	4,0 - 57,1
<b>Concentrations (pg/mL)</b>	6,5 - 36,8	6,7 - 38,8
<b>Intervalle observé à 95%</b>		
<b><u>Sujets avec taux de 25 OH Vitamine D &lt; 30 ng/mL</u></b>		
	<b>(n=82)</b>	
<b>Concentrations (pg/mL)</b>	4,6 - 38,4	4,0 - 39,4
<b><u>Sujets avec taux de 25 OH Vitamine D &lt; 30 ng/mL et calcium total entre 8,5 et 10,0 mg/dL</u></b>		
	<b>(n=74)</b>	
<b>Concentrations (pg/mL)</b>	5,5 - 38,4	4,6 - 39,4

Tableau n°25 : Valeurs limites fournies à titre indicatif (DiaSorin : dosage Liaison 1-84 PTH, référence 310630)

### **La spécificité**

La notice du fabricant précise que la réactivité croisée avec les fragments de PTH humaine à des concentrations de 200 000 pg/mL pour chaque fragment a été testée.

Cette réactivité est de 0 % pour les fragments suivants :

- hPTH 7-84
- hPTH 1-34
- hPTH 13-34
- hPTH 39-68
- hPTH 44-68
- hPTH 39-84
- hPTH 53-84.

Aucune mention n'est faite pour la N-PTH, forme modifiée par phosphorylation de la sérine en 17. Or d'après Komaba et al. (74), cette forme est détectée par les essais

de 3<sup>ème</sup> génération et pourrait avoir une activité biologique sur le turn-over osseux, mais ces données restent à préciser.

### **Les interférences**

À partir des directives CLSI-EP7-A2, le fabricant a analysé les interférences provenant de substances diverses.

Les plus fréquemment observées avec les échantillons de sang sont celles résultant de l'hémolyse, de l'aspect ictérique ou d'une hyperlipémie. Aucune interférence n'est décrite dans la notice pour les concentrations suivantes :

- Hémoglobine 200 mg/dL
- Bilirubine 20 mg/dL
- Triglycérides 3000 mg/dL
- Cholestérol 500 mg/dL

Néanmoins la notice stipule que les échantillons contenant des particules ou présentant une contamination microbienne évidente comme ceux qui sont fortement hémolysés ou ictériques ou lipémiques ne doivent pas être testés. Ces derniers critères ne précisent pas exactement le degré d'hémolyse, d'ictère ou d'hyperlipémie concerné, évalué par la plupart des automates de biochimie de manière qualitative et exprimé par un chiffre compris entre 0 et 5.

Plusieurs substances médicamenteuses ont été également envisagées, tels que des anti-inflammatoires, de la vitamine D, ...

Quant au facteur rhumatoïde, il a été démontré dans de nombreux travaux concernant les dosages par immuno-essais qu'il était susceptible d'entraîner une surestimation ou une sous-estimation des valeurs mesurées. À la concentration de 1080 UI/mL, aucune interférence n'a cependant été mise en évidence par le fabricant.

Avec certaines méthodes de dosage de la PTH utilisant des anticorps monoclonaux murins, des interférences peuvent résulter de la présence d'anticorps humains IgM anti-souris. Cavalier et al. (88) a ainsi observé une concentration de PTH réduite d'un facteur 5 après élimination des anticorps humains anti-souris chez un patient

traité par OKT3 pour rejet aigu après transplantation rénale ayant nécessité une reprise de la dialyse. Ce type d'interférences n'a pas été constaté avec les réactifs DiaSorin de 2<sup>ème</sup> génération qui contiennent des anticorps polyclonaux et pour cette raison ne devrait pas non plus se produire avec les réactifs DiaSorin de 3<sup>ème</sup> génération.

### **2.4.3 Étape post-analytique**

En ce qui concerne la stabilité des échantillons pour le dosage de la PTH, un autre facteur mérite d'être considéré, à savoir les conditions de stockage post-analytique des aliquotes utilisées pour le dosage.

Selon la procédure en vigueur dans le laboratoire intégrée jusqu'à présent dans le GBEA, le jour même du dosage les aliquotes de sérum sont congelées à - 20°C dès que le résultat a été validé biologiquement. Elles sont alors conservées pour une durée de 2 mois civils à - 20°C (à l'exception des prélèvements pour dosages de marqueurs tumoraux pour lesquels il existe un cadre réglementaire précis).

Ce délai a été fixé afin de pouvoir répondre à une demande ultérieure des cliniciens :

- vérification des concentrations de PTH
- ajout d'une analyse supplémentaire pour compléter un bilan à un instant précis.

Il était donc important de déterminer l'impact de ces modalités de conservation des échantillons en réalisant les dosages le jour de la réception des tubes primaires (J0) et 2 mois après congélation et conservation à - 20°C (J + 2 mois).

D'après la notice du fabricant les échantillons restent stables jusqu'à 6 mois à - 20°C.

Les résultats obtenus après 2 mois de conservation à - 20°C de 125 échantillons ne sont pas différents de ceux de Cavalier et al. qui avaient pris comme limite une variation de 20 %. On observe dans 87 % des cas une variation inférieure à 20 %. En ce qui concerne les échantillons pour lesquels une variation entre 20 et 30 % est

notée, il s'agit dans la majorité des cas d'échantillons avec des concentrations faibles (< 36,8 pg/mL).

Les données de la littérature ne fournissent pas d'information consensuelle sur la stabilité relative de la PTH 1-84 dans le sérum à - 20°C par rapport aux fragments. Certains auteurs estiment que la PTH 1-84 serait plus stable que ces fragments (Cavalier, 89) ce qui constituerait selon eux un avantage en faveur de l'utilisation des dosages de 3<sup>ème</sup> génération. Cependant, le nombre d'études réalisées sur la conservation des échantillons congelés à - 20 et à - 80°C mérite d'être conforté avec des travaux complémentaires à l'aide de sérums ayant un taux de PTH 1-84 élevé (supérieur aux valeurs cibles du KDIGO).

## **2.5 Conclusion**

La réforme de la biologie médicale voulue par l'ordonnance de janvier 2010 impose aux laboratoires de biologie médicale une démarche d'assurance qualité avec comme preuve de sa mise en place l'accréditation selon la norme ISO 15189.

Deux portées d'accréditation sont possibles : la portée flexible standard de type A et la portée flexible étendue de type B. L'adoption d'une méthode fournisseur correspond à une portée de type A. Or, l'étape initiale du processus d'accréditation est représentée par l'analyse par le COFRAC du dossier de validation de chaque méthode utilisée dans un laboratoire.

L'objectif de ce travail a concerné la mise en place dans l'unité fonctionnelle d'Hormono-Onco-Neurobiologie du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Central du CHU de Nancy du dosage de la PTH 1-84 avec les réactifs et l'automate Liaison XL (DiaSorin) dans le cadre de cette accréditation.

Préalablement à la vérification expérimentale de la méthode, certaines étapes doivent être réalisées par le laboratoire, en particulier une étude bibliographique qui constitue la première partie de ce travail. Celle-ci comprend les données

essentielles sur le métabolisme phosphocalcique et les principaux mécanismes de sa régulation faisant intervenir la PTH, la vitamine D, le système OPG-RANK-RANKL et le FGF 23 avec la protéine Klotho. Elle souligne également l'intérêt du dosage sanguin de la PTH dans l'établissement du diagnostic étiologique et le suivi thérapeutique des anomalies du métabolisme phosphocalcique (hypocalcémie ou hypercalcémie). On peut ainsi considérer que ce dosage est prescrit essentiellement dans trois situations :

- en Néphrologie : pour la prévention et le traitement des différents types d'ostéodystrophie rénale chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique.
- en Endocrinologie : pour le diagnostic des hyperparathyroïdies primaires.
- et dans le bilan de seconde intention d'une ostéoporose.

Ensuite, les différentes méthodes de dosage de la PTH ont été abordées. En effet, la présence dans le sang circulant de nombreux fragments différents de la PTH 1-84, dont la fréquence relative dépend notamment de la fonction rénale, a contribué à proposer des techniques de dosage spécifiques des formes de PTH ayant une signification clinique. C'est ainsi que les méthodes de dosage par technique radioimmunologique de 1<sup>ère</sup> génération, dosant toutes les formes de PTH circulantes ont disparu au profit de méthodes dites de 2<sup>ème</sup> génération, ne reconnaissant plus les larges fragments C-terminaux non actifs biologiquement. Tout récemment, des techniques dites de 3<sup>ème</sup> génération, spécifiques de la PTH 1-84, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les quatre premiers acides aminés de cette hormone, ont été proposées par les fabricants de réactifs et commercialisées en France. Actuellement, il existe sur le marché plusieurs méthodes d'évaluation de la PTH, de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération et différents travaux ont souligné les problèmes concernant le dosage de la PTH et leurs conséquences pour les patients :

- la variabilité des dosages de PTH et leur intitulé (PTH intacte, PTH biointacte, PTH entière, « whole » PTH, PTH 1-84) selon les réactifs utilisés induisent en erreur biologistes et cliniciens

- les conditions pré-analytiques influent sur les résultats de manière significative si elles ne sont pas adaptées à la technique et respectées scrupuleusement
- les intervalles de référence et les valeurs cibles thérapeutiques sont source de débats permanents alors même qu'ils conditionnent la prescription de molécules freinant la sécrétion de PTH.

Puis, des essais ont été effectués avec la méthode de dosage quantitative de la PTH dite de 3<sup>ème</sup> génération ne reconnaissant que la forme entière de la PTH 1-84 nouvellement utilisée au laboratoire. L'objectif était de déterminer les caractéristiques de la méthode nécessaires pour satisfaire aux exigences analytiques selon les critères définis dans le SH GTA 04.

Comme il est rappelé dans la norme NF EN ISO 15189, la maîtrise des conditions de prélèvement incombe au laboratoire. Cette exigence regroupe plusieurs paramètres à maîtriser :

- le choix des tubes à utiliser : tubes secs sans anticoagulant, ceci permet, lors d'une demande de dosage de PTH, l'évaluation conjointe à partir d'un seul échantillon de 7 mL de sang du calcium total, du calcium ionisé possible exclusivement si le tube primaire a été maintenu fermé et non décanté et de la vitamine D (calcidiol et/ou calcitriol).
- l'acheminement, la conservation et le délai avant analyse des échantillons sanguins : après avoir étudié l'influence de la température et de la durée de conservation, nous recommandons donc un transport dans un délai de 4h maximum à une température entre + 4 et + 8°C.

Ensuite, l'évaluation des performances de la méthode a été réalisée afin de démontrer le fonctionnement correct du couple analyseur/réactif dans les conditions opératoires du laboratoire et de prouver l'obtention de résultats sûrs pour les patients :

- lors de l'étude de la répétabilité, des CV < 3 % ont été observés pour des concentrations sériques comprises entre 27 et 535 pg/mL

- la reproductibilité est caractérisée par des CV < 7 %, pour des concentrations sériques comprises entre 27 et 297 pg/mL.

Toutes ces caractéristiques sont en conformité avec celles décrites par le fabricant et la littérature pour la méthode utilisée.

Aucune contamination inter-échantillons n'a été mise en évidence : critère important compte tenu des valeurs élevées observées chez des patients dialysés.

Le dosage de la PTH 1-84 avec la méthode de 3<sup>ème</sup> génération (Liaison XL, DiaSorin) donne, toutes pathologies confondues, des concentrations inférieures de 30 à 50 % par rapport à celles évaluées avec un dosage de la « PTH intacte » de 2<sup>ème</sup> génération (Dxi, Beckman). Ces différences sont similaires à celles décrites dans la littérature. Elles s'expliquent par une surestimation de cette hormone avec les dosages de 2<sup>ème</sup> génération due à la reconnaissance de divers fragments circulants. Néanmoins, beaucoup d'études confirment et soulignent l'importante relation existante entre les concentrations de PTH mesurées par les deux générations de dosage. Lors de la comparaison entre les deux techniques, la droite de corrélation observée entre les valeurs est  $y = 0,52 x + 3,3$  ( $R^2 = 0,99$ ).

Les modalités de conservation des échantillons après dosage de la PTH selon la procédure actuellement en vigueur dans le laboratoire sont : congélation à - 20°C dès que le résultat a été validé biologiquement et conservation des aliquotes de sérum à - 20°C pendant une période de 2 mois.

Les données du fournisseur, de la littérature et les résultats obtenus en suivant les recommandations du guide technique d'accréditation relatif à la vérification de méthode en biologie médicale (référence SH GTA 04 du COFRAC) permettent de donner un avis favorable sur l'aptitude de la méthode de dosage de la PTH 1-84 avec les réactifs et l'automate Liaison XL (DiaSorin).

Cette étude faite pour une analyse quantitative de portée A montre que la réalisation des essais a un coût élevé en réactifs et qu'elle est chronophage (préparation des

échantillons, constitution de pools, rédaction des documents). Cette étape indispensable en vue de l'accréditation doit être réalisée pour chaque méthode d'analyse utilisée par un laboratoire de biologie médicale en vue de la constitution de dossiers de validation. Elle fait partie des exigences techniques auxquelles s'ajoutent des exigences de management. La démarche de mise à niveau pour prétendre à une accréditation COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 dont le titre est « exigences particulières concernant la qualité et la compétence » est un travail important, mais nécessaire.

Pour le dosage de la PTH, en complément de ces caractéristiques il est important d'établir la contribution respective de chaque type de technique disponible en terme d'informations cliniques, en particulier pour les patients dialysés. Pour répondre à cette question, il a été proposé de calculer le ratio entre les valeurs obtenues avec des méthodes de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération. Mais à ce jour, il n'existe pas de recommandation officielle d'abandonner les anciennes techniques au profit des nouvelles ou d'utiliser ce ratio.

Le choix d'utiliser une technique de dosage de la PTH de 3<sup>ème</sup> génération par le laboratoire s'explique par l'excellente qualité du kit ainsi que sa capacité à ne détecter que les variations de la PTH 1-84 active biologiquement. Cela présente comme avantage de réduire la variabilité inter-méthodes et permet d'envisager une normalisation des kits de dosage. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les 2 méthodes de dosage en ce qui concerne la classification des patients insuffisants rénaux selon les normes du KDIGO.

Des études comparatives supplémentaires entre les concentrations obtenues avec les deux générations de dosage de la PTH et les données du turn-over osseux de patients insuffisants rénaux sont nécessaires à l'établissement de la validation consensuelle d'une méthode standardisée qui permettrait un meilleur suivi des patients.

## **ANNEXES**

# Annexe n°1

Date :  
Heure :

**LIAISON** X

Page 1 de 1

Numéro de série : 2210000515



Étalonnage  
PTH3

Test PTH3  
Integral N° 106  
ID étalonnage 00137  
Date d'expiration 2012-10-18  
État Valide

## RÉSULTATS

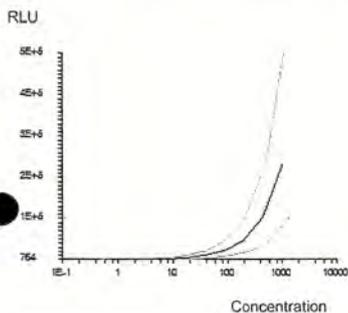
	Étalon 1	Étalon 2
RLU 1	7904	[263463]
RLU 2	7834	280271
RLU 3	8414	277566

RLU	Étalon 1	Étalon 2
moyenne	8050	278918
CV%	3.9	0.7
CV Maximum %	6.0	6.0
Déviation %	-14.52	-10.26
Tolérances %	-65 ... +99	-65 ... +99
Cible	9417	310791
<b>Valeur</b>		
Prévue	29.0	1240
Calculée	29.0	1230
Courbe précédente		
Déviations %	---	---
Tolérances %	- 0 ... + 0	- 0 ... + 0

Vérification géométrique de la courbe

Rapport 32.59

Intervalle 20.00 40.00



## GRAPHIQUE

ID courbe maîtresse 624301

## Plages signal

	Bas	Haut
Maîtresse	...	100000000
Travail	...	90342261

## TRACABILITÉ

Date et Heure d'exécution 2012-09-21 10:45:43

Nom opérateur francine

Integral N° 106

Date d'expiration de l'intégral 2013-04-02

Date d'expiration à bord de l'intégral 2012-10-15

Lot N° 128121

Lot du Starter 1 142351

Lot du Starter 2 144151

N° de lot du réactif ancillaire 0

N° de l'ampoule de l'ancillaire 0

Imprimé par :

Version : 4.0.0.4

## Annexe n°2

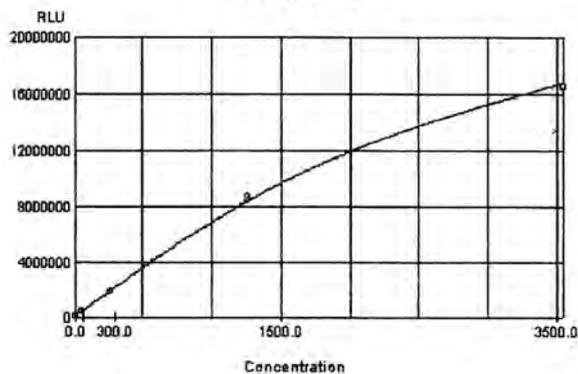
CHU NANCY

Compte rendu des données de calibration  
 UniCel® DxI 800, Access® Immunoassay System  
 S/N 600213

Nom du test:	PTH	Courbe:	Dern. analyse; Actif
Lot réactif:	021007	Etat:	<b>Réussi</b>
Calibré:	14/10/11 09:42	Raison:	
Péréemption:	11/11/11 09:42	Lot cal:	189706
Comment.:			

<u>Concentrat. indiquée pg/mL</u>	<u>RLU</u>	<u>1 écart type</u>	<u>CV (%)</u>	<u>Concentrat. calculée pg/mL</u>	<u>Alarme</u>
S0 0.0	20067			0.1	
S0 0.0	19568			Pas de valeur	
<b>Moyenne</b>	<b>19817.5</b>	<b>352.8</b>	<b>1.8</b>	<b>0.1</b>	
S1 9.6	86068			9.5	
S1 9.6	86117			9.5	
<b>Moyenne</b>	<b>86092.5</b>	<b>34.6</b>	<b>0.0</b>	<b>9.5</b>	
S2 52.0	395015			53.8	
S2 52.0	379829			51.6	
<b>Moyenne</b>	<b>387422.0</b>	<b>10738.1</b>	<b>2.8</b>	<b>52.7</b>	
S3 260.0	1803456			257.0	
S3 260.0	1803806			257.0	
<b>Moyenne</b>	<b>1803631.0</b>	<b>247.5</b>	<b>0.0</b>	<b>257.0</b>	
S4 1252.0	8351914			1269.0	
S4 1252.0	8587738			1311.6	
<b>Moyenne</b>	<b>8469826.0</b>	<b>166752.7</b>	<b>2.0</b>	<b>1290.3</b>	
S5 3539.0	16310771			3395.1	
S5 3539.0	16448161			3445.4	
<b>Moyenne</b>	<b>16379466.0</b>	<b>97149.4</b>	<b>0.6</b>	<b>3420.3</b>	

Courbe(Linéaire)



Technicien \_\_\_\_\_

Page 1 sur 1  
Imprimé le

## Annexe n°3

 <b>CHU</b> NANCY <small>www.chu-nancy.fr</small>	<b>Prélèvement pour dosage de la parathormone (PTH)</b>	Version 1
	Applicable le : 16 juin 2012	
	<b>Approbateur</b> DOUSSET Brigitte	

<b>Synonymes ou analyses associées</b>	PTH intact 1-84 Parathormone : fragment 1-84 (molécule biologiquement active) Pas de dosages des autres fragments de la parathormone
<b>But de l'examen</b>	Evaluer la sécrétion d'hormone parathyroïdienne : hormone intervenant dans la régulation du métabolisme phospho-calcique  Intérêt du dosage : anomalies biologiques du bilan phosphocalcique  Intérêt diagnostic étiologique, suivi thérapeutique et évolution essentiellement dans l'ostéoporose, l'insuffisance rénale chronique
<b>Autres examens réalisables sur ce prélèvement</b>	Evaluation conjointe du pH, du calcium total, du calcium ionisé. Dosage simultané possible de 25 OH vitamine D (calcidiol) et de 1-25 OH <sub>2</sub> vitamine D (calcitriol)
<b>Laboratoire prestataire</b>	Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire (Central) UF 3532
<b>Nature du prélèvement (sérum, plasma, etc.)</b>	Sérum
<b>Support papier de la demande</b>	Feuille verte : examens de chimie biologique <span style="float: right;">▼</span>
<b>Macro méthode :</b>	1 tube sec bien rempli : bouchon jaune (3.5 ml) pour dosage PTH + du pH, du calcium total, du calcium ionisé ± 25 OH vitamine D (calcidiol)  1 tube sec bien rempli bouchon jaune (5 ml) pour dosage PTH + du pH, du calcium total, du calcium ionisé + 25 OH vitamine D (calcidiol) + 1-25 OH <sub>2</sub> vitamine D (calcitriol)
<b>Volume mini nécessaire</b>	850 µl de sérum pour dosage PTH + du pH, du calcium total, du calcium ionisé  1 ml de sérum pour dosage PTH + du pH, du calcium total, du calcium ionisé + 25 OH vitamine D (calcidiol)  1.5 ml de sérum pour tous les dosages y compris 1-25 OH <sub>2</sub> vitamine D (calcitriol)
<b>Micro méthode :</b>	1 tube sec Contacter le laboratoire pour établir le volume total minimum de prélèvement de sang en fonction des paramètres demandés
<b>Conditions particulières (précautions, récipient spécifique, glace, etc.)</b>	
<b>Nécessité de prendre rendez-vous (O/N)</b>	<input type="text" value="NON"/> ▼
<b>Examen réalisé en urgence (O/N)</b>	<input type="text" value="NON"/> ▼
<b>Renseignements cliniques nécessaires (O/N) lesquels ?</b>	Indiquer si traitement par vitamine D  Indiquer si traitement par cinacalcet (Mimpara®)
<b>Conditions de transport (délais, précautions, etc.)</b>	Impératif : Transport et conservation entre +4 et + 8°C jusqu'au laboratoire du prélèvement
<b>Préparation du patient (à préciser si nécessaire)</b>	
<b>Valeurs de références</b>	6.5 – 36.8 pg/ml
<b>Délai de rendu des résultats</b>	Si arrivée au laboratoire avant 17h les jours ouvrables : dans la journée  Si arrivée au laboratoire après 17h du lundi au jeudi : 24h Si arrivée au laboratoire après 17h vendredi, veille de jours fériés ou lors de week- end : dans la journée du premier jour ouvré suivant
<b>Cotation</b>	Code NABM : 0983

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **Références bibliographiques**

1. Courbebaisse M., Souberbielle J.-C. Équilibre phosphocalcique : régulation et explorations. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Néphrologie*, 18-010-B-10, 2010, 22p.
2. Roux S., Orcel P. Équilibre phosphocalcique : régulation et exploration. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Endocrinologie-Nutrition*, 10-358-A-10, 1998, 27p.
3. Schmitt F. Phosphates plasmatiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Biologie médicale*, 90-10-0730, 2003, 6p.
4. Marie P., Halbout P. OPG/RANKL : Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose. *Med Sci*, 2008, 24 : 105-9.
5. Thomas T., Martin A., Lafage-Proust M.-H. Physiologie du tissu osseux. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Podologie*, 2011, 27-025-A-20.
6. Giuliani N., Bataille R., Mancini C., Lazzaretti M., Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, 2001, Dec;15;98(13) : 3527-33.
7. Cavalli L., Mazzotta C., Brandi ML. Phosphatonins : physiological role and pathological changes. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2012, Jan;9(1):9-12.
8. Silve C., Beck L. Is FGF23 the long sought after phosphaturic factor phosphatonin? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 2002, Jun;17(6):958-61.
9. Quarles LD. Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 2003, Sep;112(5):642-6.
10. Larsson T., Marsell R., Schipani E., Ohlsson C., Ljunggren O., Tenenhouse HS., et al. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*, 2004, Jul;145(7):3087-94.
11. Liu S., Guo R., Simpson LG., Xiao ZS., Burnham CE., Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *The Journal of biological chemistry*, 2003, Sep;278(39):37419-26.

12. Riminucci M, Collins MT., Fedarko NS., Cherman N., Corsi A., White KE., et al. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *The Journal of clinical investigation*, 2003, Sep;112(5):683-92.
13. Fukagawa M., Kazama JJ. With or without the kidney: the role of FGF23 in CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 2005, Jul;20(7):1295-8.
14. Saito H., Maeda A., Ohtomo S., Hirata M., Kusano K., Kato S., et al. Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 2005, Jan;280(4):2543-9.
15. Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M., Yamamoto M., Nandi A., Rosenblatt KP., et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *The Journal of biological chemistry*, 2006, Mar;281(10):6120-3.
16. Ferrari SL., Bonjour JP., Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2005, Mar;90(3):1519-24.
17. Stubbs J., Liu S., Quarles LD. Role of fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and pathogenesis of disordered mineral metabolism in chronic kidney disease. *Semin Dial*, 2007, Jul-Aug;20(4):302-8.
18. Quarles LD. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, Jul;285(1):E1-9.
19. Bacchetta J., Cochat P., Salusky IB. [FGF23 and Klotho: the new cornerstones of phosphate/calcium metabolism] FGF23 et Klotho : les nouveaux incontournables du métabolisme phosphocalcique. *Archives de pédiatrie*, 2011, 18(6):686-95.
20. Liu S., Vierthaler L., Tang W., Zhou J., Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, Dec;19(12):2342-50.
21. Razzaque MS., Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *The Journal of endocrinology*, 2007, Jul;194(1):1-10.
22. Inoue Y., Segawa H., Kaneko I., Yamanaka S., Kusano K., Kawakami E., et al. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J*, 2005, 390:325-31.

23. Quarles LD. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res*, 2012, May;318(9):1040-8.
24. Krajsnik T., Bjorklund P., Marsell R., Ljunggren O., Akerstrom G., Jonsson KB., et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *The Journal of endocrinology*, 2007, Oct;195(1):125-31.
25. Urena Torres P., Friedlander G., de Vernejoul MC., Silve C., Prie D. Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients. *Kidney international*, 2008, Jan;73(1):102-7.
26. Bonnichon P., Charbit L., Proye C. [History of surgery of the parathyroid glands]. *Hist Sci Med*, 2006, Apr-Jun;40(2):151-63.
27. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *The Journal of endocrinology*, 2005, 187(3):311-25.
28. Zabel BU., Kronenberg HM., Bell GI., Shows TB. Chromosome mapping of genes on the short arm of human chromosome 11: parathyroid hormone gene is at 11p15 together with the genes for insulin, c-Harvey-ras 1, and beta-hemoglobin. *Cytogenet Cell Genet*, 1985, 39(3):200-5.
29. Keutmann HT., Sauer MM., Hendy GN., O'Riordan LH., Potts JT. Jr. Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry*, 1978;17(26):5723-9.
30. Houillier P. Physiologie des parathyroïdes. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Endocrinologie-Nutrition*, 10-011-C-10, 2008, 13p.
31. Vieira JG. PTH Assays: Understanding What We Have and Forecasting What We Will Have. *Journal of osteoporosis*, 2012, 5p.
32. Habener JF., Amherdt M., Ravazzola M., Orci L. Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. *The Journal of cell biology*, 1979, 80(3):715-31.

33. Potts Jr JT., Harald J. Chapter 3 - Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide in Calcium Homeostasis, Bone Metabolism, and Bone Development: The Proteins, Their Genes, and Receptors. In: Louis VA, Stephen MK, editors. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, San Diego: Academic Press, 1998, p. 51-94.
34. Habener JF., Rosenblatt M., Potts Jr JT. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 1984;64:985–1053.
35. Silver J., Russell J., Sherwood LM. Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:4270–3.
36. Kilav R., Silver J., Naveh-Many T. A conserved cis-acting element in the parathyroid hormone 3'-untranslated region is sufficient for regulation of RNA stability by calcium and phosphate. *J Biol Chem*, 2001, 276:8727–33.
37. Faivre-Defrance F., Marcelli-Tourvieille S., Odou MF., Porchet N., Wemeau JL., Vantghem MC. [Calcium sensing receptor: physiology and pathology]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2006, Mar;67(1):45-53.
38. Riccardi D., Martin D. The Role of the Calcium-Sensing Receptor in the Pathophysiology of Secondary Hyperparathyroidism. *NDT Plus*, 2008, January;1(suppl 1):p7-11.
39. Kumar R., Thompson JR. The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 22(2):216-24.
40. Souberbielle JC., Lawson-Body E., Cormier C. Actualité sur la PTH : nos dosages ne reconnaissent pas que la PTH intacte ! *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2002, 17(1):48-53.
41. Guéris J. Rôle physiologique et quantification de la parathormone humaine dans les liquides biologiques : difficultés méthodologiques et interprétation. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 1993, 8(6):339-47.
42. D'Amour P. Acute and chronic regulation of circulating PTH: Significance in health and in disease. *Clinical biochemistry*, 2012, 6p.
43. Bernard-Poenaru O., Guéris J. Parathormone. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 1996, 11(1):24-7.

44. Rodriguez M., Lorenzo V. Progress in uremic toxin research: Parathyroid Hormone, A Uremic Toxin. *Seminars in Dialysis*, 2009, 22(4):363-8.
45. Massart C., Souberbielle JC. Actualités sur les dosages de parathormone : des difficultés analytiques à l'interprétation des résultats en clinique. *Médecine Nucléaire*, 2009, 33(1):46-52.
46. Goodman WG., Juppner H., Salusky IB., Sherrard DJ. Parathyroid hormone (PTH), PTH-derived peptides, and new PTH assays in renal osteodystrophy. *Kidney international*, 2003, 63(1):1-11.
47. Souberbielle JC. Parathormone (PTH). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Biologie médicale*, 90-10-0695, 2003, 10p.
48. Massart C., Gauchez A-S. Caractéristiques immuno-analytiques de la parathormone (PTH). *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2012, 27(2):79-82.
49. Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international Supplement*, 2009, Aug(113):S1-130.
50. Cavalier E., Souberbielle J-C., Delanaye P. Suivi biologique du métabolisme phosphocalcique chez le patient dialysé : que nous apportent les guidelines du KDIGO en pratique ? *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2012, 3p.
51. Cavalier E., Carlisi A., Bekaert AC., Rousselle O., Chapelle JP., Delanaye P. New insights on the stability of the parathyroid hormone as assayed by an automated 3rd generation PTH assay. *Clinica chimica acta*, 2012, Jan;413(1-2):353-4.
52. Coen G., Bonucci E., Ballanti P., Balducci A., Calabria S., Nicolai G., et al. PTH 1-84 and PTH « 7-84 » in the noninvasive diagnosis of bone disease. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40:348-54.
53. Salusky I., Goodman W., Kuizon B., Lavigne J., Zahranik R., Gales B., et al. Similar predictive value of bone turnover using first- and second-generation immunometric PTH assays in pediatric patients treated with peritoneal dialysis. *Kidney Int*, 2003, 63:1801-8.

54. Lehmann G., Stein G., Huller M., Schemer R., Ramakrishnan K., Goodman WG. Specific measurement of PTH (1-84) in various forms of renal osteodystrophy (ROD) as assessed by bone histomorphometry. *Kidney international*, 2005, 68(3):1206-14.
55. Yamashita H., Gao P., Noguchi S., Cantor T., Uchino S., Watanabe S., et al. Role of cyclase activating parathyroid hormone (1-84 PTH) measurements during parathyroid surgery: potential improvement of intraoperative PTH assay. *Annals of surgery*, 2002, Jul;236(1):105-11.
56. Eastell R., Arnold A., Brandi ML., Brown EM., D'Amour P., Hanley DA., et al. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2009, 94(2):340-50.
57. Cavalier E., Daly AF., Betea D., Pruteanu-Apetrii PN., Delanaye P., Stubbs P., et al. The ratio of parathyroid hormone as measured by third- and second-generation assays as a marker for parathyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2010, 95(8):3745-9.
58. De Talancé N., Claudon A., Pesenti M., Bulet C. Dosage de la parathormone 1-84. Influence des conditions de prélèvement et de stockage. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2002, 17(2):118-20.
59. Joly D., Drueke TB., Alberti C., Houillier P., Lawson-Body E., Martin KJ., et al. Variation in serum and plasma PTH levels in second-generation assays in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *American journal of kidney diseases*, 2008, 51(6):987-95.
60. Parent X., Alenabi F., Brignon P., Souberbielle JC. [Delayed measurement of PTH in patients with CKD: storage of the primary tube in the dialysis unit, which temperature? Which kind of tube?]. *Nephrologie & thérapeutique*, 2009, 5(1):34-40.
61. Holmes DT., Levin A., Forer B., Rosenberg F. Preanalytical influences on DPC IMMULITE 2000 intact PTH assays of plasma and serum from dialysis patients. *Clinical chemistry*, 2005, May;51(5):915-7.

62. Omar H., Chamberlin A., Walker V., Wood PJ. Immulite 2000 parathyroid hormone assay: stability of parathyroid hormone in EDTA blood kept at room temperature for 48 h. *Annals of clinical biochemistry*, 2001, Sep;38(Pt 5):561-3.
63. Glendenning P., Laffer LL., Weber HK., Musk AA., Vasikaran SD. Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. *Clinical chemistry*, 2002, May;48(5):766-7.
64. Twomey PJ., Whitlock T., Pledger DR. Differences between serum and plasma for intact parathyroid hormone measurement in patients with chronic renal failure in routine clinical practice. *J Clin Pathol*, 2005, Sep;58(9):1000-1.
65. Souberbielle J-C., Friedlander G., Cormier C. Aspects pratiques des dosages de PTH. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2006, 21(2):110-8.
66. Ratcliffe WA., Heath DA., Ryan M., Jones SR. Performance and diagnostic application of a two-site immunoradiometric assay for parathyrin in serum. *Clinical chemistry*, 1989, Sep;35(9):1957-61.
67. Gao P., Scheibel S., D'Amour P., John MR., Rao SD., Schmidt-Gayk H., et al. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *Journal of bone and mineral research*, 2001, 16(4):605-14.
68. Inaba M., Nakatsuka K., Imanishi Y., Watanabe M., Mamiya Y., Ishimura E., et al. Technical and clinical characterization of the Bio-PTH (1-84) immunochemiluminometric assay and comparison with a second-generation assay for parathyroid hormone. *Clinical chemistry*, 2004, 50(2):385-90.
69. Souberbielle JC., Cormier C., Kindermans C., Gao P., Cantor T., Forette F., et al. Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2001, 86(7):3086-90.
70. Zanelli JM., Gaines-Das RE. The first international reference preparation of human parathyroid hormone for immunoassay: characterization and calibration by international collaborative study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1983, 57(3):462-9.

71. Afssaps. Rapport du contrôle du marché Afssaps 2007-2008 des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage de la parathormone (PTH). *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2009, 24(4):223-33.
72. Souberbielle JC., Friedlander G., Cormier C. Practical considerations in PTH testing. *Clinica chimica acta*, 2006, 366(1-2):81-9.
73. Berson SA., Yalow RS., Aurbach GD., Potts JT. Immunoassay of Bovine and Human Parathyroid Hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1963, 49(5):613-7.
74. Komaba H., Goto S., Fukagawa M. Critical issues of PTH assays in CKD. *Bone*, 2009, 44(4):666-70.
75. Arnaud CD., Tsao HS., Littledike T. Radioimmunoassay of human parathyroid hormone in serum. *The Journal of clinical investigation*, 1971, 50(1):21-34.
76. Rodgers SE., Lew JI. The parathyroid hormone assay. *Endocrine practice*, 2011, 17 Suppl 1:2-6.
77. Nussbaum SR., Zahradnik RJ., Lavigne JR., Brennan GL., Nozawa-Ung K., Kim LY., et al. Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin, and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clinical chemistry*, 1987, 33(8):1364-7.
78. Quarles LD., Lobaugh B., Murphy G. Intact parathyroid hormone overestimates the presence and severity of parathyroid-mediated osseous abnormalities in uremia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1992, Jul;75(1):145-50.
79. Wang M., Hercz G., Sherrard DJ., Maloney NA., Segre GV., Pei Y. Relationship between intact 1-84 parathyroid hormone and bone histomorphometric parameters in dialysis patients without aluminum toxicity. *American journal of kidney diseases*, 1995, Nov;26(5):836-44.
80. Brossard JH., Cloutier M., Roy L., Lepage R., Gascon-Barre M., D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1996, 81(11):3923-9.

81. Lepage R., Roy L., Brossard JH., Rousseau L., Dorais C., Lazure C., et al. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clinical chemistry*, 1998, Apr;44(4):805-9.
82. D'Amour P., Brossard JH., Rousseau L., Nguyen-Yamamoto L., Nassif E., Lazure C., et al. Structure of non-(1-84) PTH fragments secreted by parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney international*, 2005, 68(3):998-1007.
83. John MR., Goodman WG., Gao P., Cantor TL., Salusky IB., Juppner H. A novel immunoradiometric assay detects full-length human PTH but not amino-terminally truncated fragments: implications for PTH measurements in renal failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1999, 84(11):4287-90.
84. Nakanishi S., Kazama JJ., Shigematsu T., Iwasaki Y., Cantor TL., Kurosawa T., et al. Comparison of intact PTH assay and whole PTH assay in long-term dialysis patients. *American journal of kidney diseases*, 2001, Oct;38(4 Suppl 1):S172-4.
85. Taniguchi M., Tanaka M., Hamano T., Nakanishi S., Fujii H., Kato H., et al. Comparison between whole and intact parathyroid hormone assays. *Ther Apher Dial*, 2011, Jun;15 Suppl 1:42-9.
86. Melamed ML., Eustace JA., Plantinga LC., Jaar BG., Fink NE., Parekh RS., et al. Third-generation parathyroid hormone assays and all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2008, 23(5):1650-8.
87. Brossard JH., Lepage R., Cardinal H., Roy L., Rousseau L., Dorais C., et al. Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays. *Clinical chemistry*, 2000, 46(5):697-703.
88. Cavalier E., Carlisi A., Chapelle JP., Orfanos P., Uzan M., Falque V., et al. Human anti-mouse antibodies interferences in Elecsys PTH assay after OKT3 treatment. *Transplantation*, 2009, Feb;87(3):451-2.
89. Cavalier E., Carlisi A., Bekaert AC., Rousselle O., Chapelle JP., Delanaye P. New insights on the stability of the parathyroid hormone as assayed by an automated 3rd generation PTH assay. *Clinica chimica acta*, 2012, Jan;413(1-2):353-4.

90. Giroud C., Dumontet M., Vassault A., Braconnier F., Ferard G., Groupe de travail SFBC. [Recommendations for expressing uncertainty of measurement of quantitative results in laboratory medicine]. *Annales de biologie clinique*, 2007, Mar-Apr;65(2):185-200.
91. Parent X., Alenabi F., Etienne E., Brignon P., Chantrel F., Meynaud-Kraemer L. [Preanalytical variability of parathyroid hormone measurement in dialysis patients; application to Elecsys 2100 (Roche) automate]. *Annales de biologie clinique*, 2008, Jan-Feb;66(1):53-8.
92. Migliardi M., Marranca D. Mesure de la parathormone : facteurs de variation et problèmes de standardisation. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2006, 21(2):119-26.
93. BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML (2012) The international vocabulary of metrology—basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edn. JCGM 200:2012. [www.bipm.org/vim](http://www.bipm.org/vim)
94. Cavalier E., Rousselle O., Bekaert A.-C. Evaluation of the DiaSorin Liaison 1-84 PTH Assay, a new automated immunoassay for the determination of the 3rd Generation PTH. *Clinical Chemistry*, 2010, 56-S6-A56, POSTER AACC Annual Meeting.
95. Cavalier E., Krzesinski J.-M., Delanaye P. Measurement of PTH in haemodialysis patients with a second or third generation kit: impact for the clinician. 12<sup>ème</sup> Réunion commune SN/SFD Bruxelles, 2010.
96. Delanaye P., Krzesinski J.-M., Cavalier E. Suivi à court terme et à long terme de la concentration de parathormone chez le patient hémodialysé : dosage de seconde et troisième génération. *Néphrologie et Thérapeutique*, 2011, p. 320.
97. Nizou J.-Y., Brunengo D., Ebel A. Evaluation du dosage de la PTH 1-84 de troisième génération sur automate Liaison® Diasorin comparé au dosage de la PTH intacte sur automate Modular® Roche sur une population de dialysés. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2011, 26(2):98-9.
98. Souberbielle J.C., Boudou P., Cormier C. Lessons from second- and third-generation parathyroid hormone assays in primary hyperparathyroidism. *Journal of endocrinological investigation*, 2008, May;31(5):463-9.

99. Marangella M. [PTH measurement: where do we stand?]. *G Ital Nefrol*, 2009, Sep-Oct;26(5):600-7.
100. Herberth J., Branscum AJ., Mawad H., Cantor T., Monier-Faugere MC., Malluche HH. Intact PTH combined with the PTH ratio for diagnosis of bone turnover in dialysis patients: a diagnostic test study. *American journal of kidney diseases*, 2010, May;55(5):897-906.
101. Aloia JF., Feuerman M., Yeh JK. Reference range for serum parathyroid hormone. *Endocrine practice*, 2006, Mar-Apr;12(2):137-44.
102. Rejnmark L., Vestergaard P., Heickendorff L., Mosekilde L. Determinants of plasma PTH and their implication for defining a reference interval. *Clinical endocrinology*, 2011, Jan;74(1):37-43.
103. Souberbielle JC., Boutten A., Carlier MC., Chevenne D., Coumaros G., Lawson-Body E., et al. Inter-method variability in PTH measurement: implication for the care of CKD patients. *Kidney international*, 2006, 70(2):345-50.
104. Fillee C., Keller T., Mourad M., Brinkmann T., Ketelslegers JM. Impact of vitamin D-related serum PTH reference values on the diagnosis of mild primary hyperparathyroidism, using bivariate calcium/PTH reference regions. *Clinical endocrinology*, 2012, Jun;76(6):785-9.
105. Souberbielle J.-C. La vitamine D. JIB 2011, Paris, Poster.
106. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Institute of medicine of the national academies, ed.: The National Academies Press, 2011.
107. Lepoutre T., Nguyen P., Jadoul M. Circulating levels of PTH 1-84 in renal transplant recipients. JIB 2011, Paris, Poster n°30.

VU

**NANCY, le 2 octobre 2012**

Le Président de Thèse

**NANCY, le 2 octobre 2012**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

**Professeur J-L. OLIVIER**

**Professeur H. COUDANE**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE 5046

NANCY, le 5 octobre 2012

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

**Professeur P. MUTZENHARDT**



## RÉSUMÉ

---

En biologie médicale, le management de la qualité implique que le dossier de validation de méthode constitue un pré-requis à l'accréditation dans la mesure où son analyse par le COFRAC est l'étape initiale du processus d'accréditation. Il comprend une vérification de ces performances sur site et préalablement à la partie expérimentale certaines étapes doivent être réalisées par le laboratoire, en particulier une étude bibliographique. Celle-ci constitue la première partie de ce travail, dans lequel ont été abordés d'une part les rappels sur le métabolisme phosphocalcique et ses principaux mécanismes de régulation et d'autre part, les différentes méthodes d'évaluation de la PTH disponibles sur le marché (intitulés et molécules évaluées, détermination des valeurs de référence et des valeurs cibles à atteindre chez les patients dialysés) ainsi que les problèmes d'interprétation en clinique.

La seconde partie décrit les essais effectués avec une méthode de dosage quantitative de type portée A de la PTH dite de troisième génération ne reconnaissant que la forme originelle de la PTH 1-84 à l'aide de l'automate Liaison XL (DiaSorin). Les différentes étapes réalisées pour déterminer l'aptitude de la méthode à satisfaire des exigences analytiques incluent l'étude de la répétabilité, de la reproductibilité, de la contamination inter-échantillons et différentes modalités de transport et de conservation des échantillons sanguins. Une étude comparative a été faite par rapport à une technique de dosage de la « PTH intacte » de seconde génération reconnaissant également divers fragments circulants de cette hormone. En fonction des données du fournisseur et de la littérature, les résultats présentés dans des documents en suivant les recommandations du guide technique d'accréditation relatif à la vérification de méthode en biologie médicale (référence SH GTA 04 du COFRAC) permettent de donner un avis favorable sur l'aptitude de la méthode.

---

### Titre en anglais :

Establishment of PTH 1-84 assay with Liaison XL analyser according to recommendations NF EN ISO 15189.

---

**Thèse :** Médecine spécialisée – Année 2012

---

### Mots-clés :

Parathormone, 3<sup>e</sup> génération, hyperparathyroïdie, insuffisance rénale, PTH 1-84.

---

**Université de Lorraine**

**Faculté de Médecine de Nancy**

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex

---