



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BENABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
FES



***PROJET DE FIN D'ETUDES***

***Licence en Science et Techniques:***

***Biologie & Santé***

**ETUDE COMPARATIVE DU DOSAGE DE LA CRP PAR  
DEUX METHODES DIFFERENTES**

Présenté par : ARJI NISRINE

Encadré par :

- Dr. BAROUDI AMINA : Médecin Biologiste, Chef de laboratoire d'analyses médicales, Hôpital Ibn Al Khatib, FES.
- Pr. J. EL YAMANI : Professeur, FST- FES.

Soutenu le : vendredi 15/06/2012

Devant le jury composé de :

- Pr. JAMAL EL YAMANI : Président.
- Dr. BAROUDI AMINA : Encadrant.
- Pr. RACHIQ SAAD : Examineur.

# Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à toute personne universitaire, professionnelle ou autre, ayant contribué à la réussite de cet humble projet de fin d'études.

Mes premiers mots de remerciements seront à l'égard de Madame BAROUDI AMINA, Dr Médecin Biologiste Chef du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Ibn Al Khatib de m'avoir donné l'occasion de faire un stage au sein de son service, et pour son énorme soutien durant cette période.

Je tiens également à exprimer mon grand respect à mon encadrant Mr EL YAMANI JAMAL, professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès pour sa disponibilité, ses conseils et son aide si précieux, et pour ses critiques judicieuses tout en tenant à participer activement à l'élaboration et à l'amélioration de ce travail.

Je voudrais aussi remercier vivement Mr HASSAN MENAJA et Mr DRISS EL AWAN qui m'ont procuré l'aide nécessaire à l'élaboration de ce projet.

Je tiens à remercier Mr RACHIQ SAAD d'avoir accepté de juger ce travail.

*Merci*

# Abréviations

## ❖ Liste des abréviations :

CRP	C-protéine réactive
HIK	Hôpital Ibn Al Khatib
CHR	Centre Hospitalier Régional
CQ	Contrôle de Qualité
CQI	Contrôle de Qualité Interne
SEGMA	Service de l'Etat Gérée de Manière Autonome
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
ECBU	Examen Cyto-Bactériologique des Urines

# Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre-I : Présentation du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Ibn al Khatib.....	2
I- Présentation de l'Hôpital Ibn Al Khatib.....	2
A- Caractéristiques.....	2
B- Organisation.....	3
II- Présentation du laboratoire du CHR Ibn Al Khatib.....	4
A- Les locaux.....	4
B- Le personnel.....	4
1- L'effectif.....	4
2- Les interlocuteurs.....	5
C- Le matériel et l'équipement.....	5
D- Les horaires de travail.....	5
E- Le rendement.....	6
Chapitre- II : Définitions.....	7
Chapitre- III : Matériels et méthodes.....	12
I- Dosage de la CRP.....	12
A- Principe .....	12
B- Le prélèvement.....	12
C- Méthode du dosage.....	13

1- Technique manuelle.....	13
a- Appareils et accessoires.....	13
b- Réactifs utilisés.....	13
c- Technique.....	14
2- Technique automatisée.....	16
a- Appareils.....	16
b- Réactifs utilisés.....	17
c- Technique.....	17
D- Expression des résultats.....	20
1- Valeurs normales.....	20
2- Variations pathologiques.....	20
II- Contrôle de qualité interne.....	20
A- Objectif.....	20
B- Les critères de fiabilité d'une méthode.....	21
C- Réactifs.....	21
1- Etalon.....	21
2- Contrôle de référence.....	21
Chapitre V : Expression des critères de fiabilité.....	23
I- la précision analytique.....	23
A- L'imprécision.....	23
B- La précision.....	25
II- L'exactitude analytique.....	26
A-L'inexactitude.....	26
B- L'exactitude.....	26

III- La comparaison entre deux méthodes.....	27
<b>Chapitre- VI : Application.....</b>	<b>28</b>
I- Collecte des donnés.....	28
A- Etalonnage.....	28
B- Choix du sérum de contrôle.....	28
C- Traitement des échantillons de contrôle.....	29
II- Traitement des donnés.....	29
A- Représentation des tableaux.....	29
B- Représentation des graphiques.....	31
III- Interprétation des donnés.....	33
A- Validation des résultats.....	33
B- Evaluation de la précision et de l'exactitude.....	33
1- Evaluation de la précision.....	33
2- Evaluation de l'exactitude.....	33
IV-Conclusion.....	33
Bibliographie.....	34
Webographie.....	36
Annexes.....	37

## Introduction :

Avec les avancées scientifiques et les progrès technologiques en matière d'analyses médicales, les techniques manuelles sont largement devancées par l'automatisation qui permet un meilleur rendement par le traitement de grandes séries d'analyses pendant un court temps, et surtout des résultats plus fiables visant à apporter des informations utiles au diagnostic, à la prévention ou au traitement des maladies ou à l'évaluation de l'état de santé.

Dans ce sens, des outils tels que le contrôle de qualité intra-laboratoire sont destinés aux biologistes pour évaluer et choisir la qualité d'une technique soumise à leur appréciation quand ils se trouvent devant plus d'une technique pour la détermination quantitative d'un paramètre donné.

Le laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Ibn Al Khatib se trouve confronté à une telle situation.

Il a alors saisi l'occasion pour adopter le CQI comme projet de fin d'études permettant de comparer deux techniques d'analyse immunologique d'une série d'échantillons de la CRP manuelle et automatisée, afin de choisir la plus fiable en matière de précision et d'exactitude.

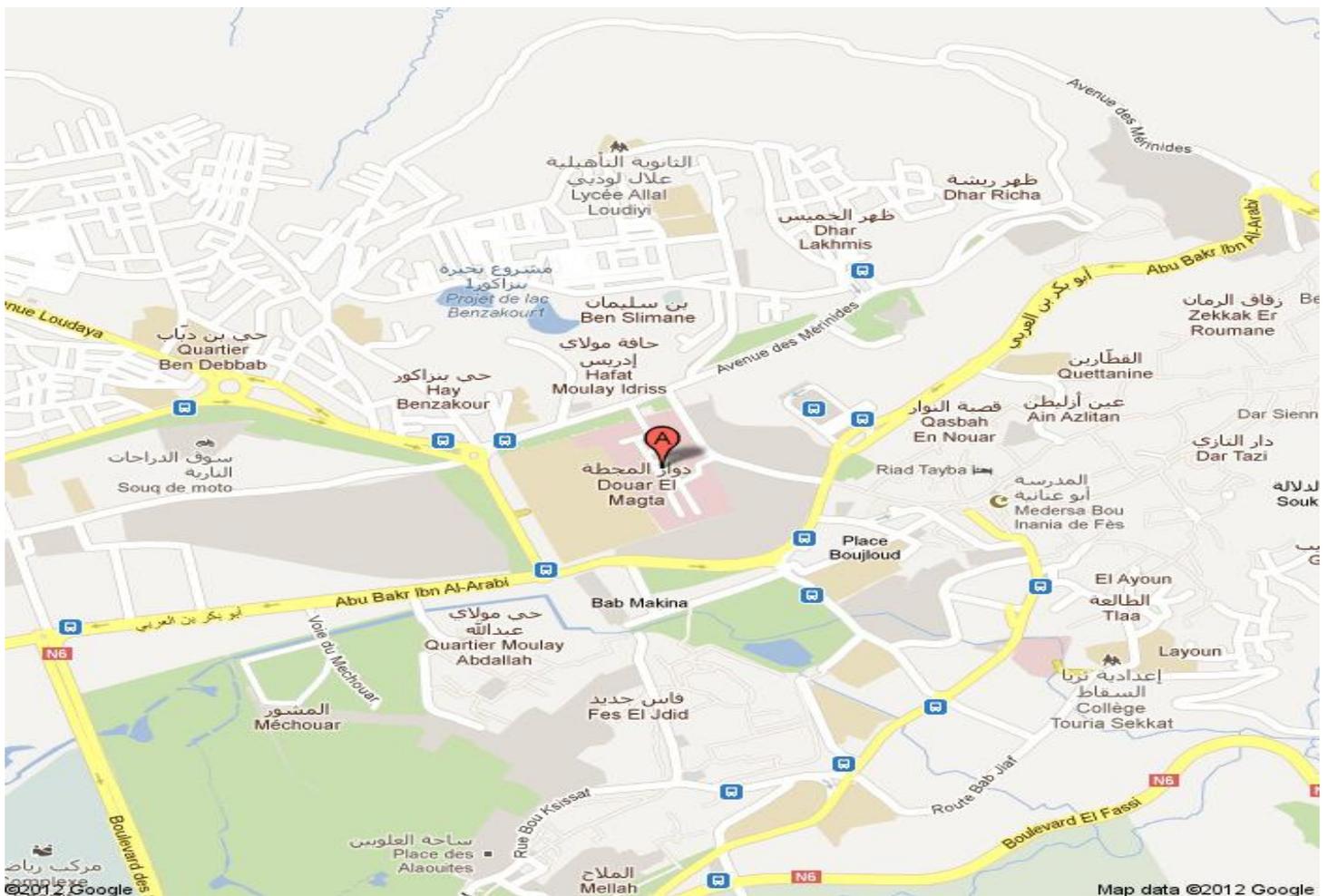
# Chapitre I : présentation du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Ibn Al Khatib :

## I-Présentation de l'Hôpital Ibn Al Khatib :

### A- Caractéristiques :

L'Hôpital Ibn Al Khatib de Fès est un hôpital général faisant partie des trois hôpitaux du CHR Fès Boulomane. Il en constitue son chef lieu.

C'est un établissement qui dessert la population de toute la région de Fès-Boulmane, qui est de 1.704.000 en 2010, et également, celle des régions limitrophes (Taza, Taounate ...).



C'est un hôpital pavillonnaire composé de 10 bâtiments abritant différentes disciplines. L'hôpital est géré en SEGMA depuis 1998.

## B- Organisation :

La capacité totale fonctionnelle de l'hôpital compte 334 lits répartis en 38 lits pour la pédiatrie, 34 lits pour la chirurgie, 197 lits pour la médecine, 10 lits pour la réanimation, et 55 lits pour la gynéco obstétrique. Les services et les activités des soins sont assurées par 47 médecins dont 34 spécialistes, 187 infirmiers, et 75 administratifs/agents de soutien et se répartissent dans des départements et des services :

### - Départements:

- Le département mère-enfant :
  - le service de la Maternité.
  - le service de la Pédiatrie.
- Le département de médecine :
  - le service d'hémodialyse.
  - le service de cardiologie.
  - le service de pneumophysiologie.
  - le service médecine Interne.
  - le service médecine générale.
  - le service d'endocrinologie.
  - le service des urgences.
- Le département de chirurgie:
  - le service de chirurgie.
  - le service de réanimation chirurgicale.
  - le bloc opératoire.
- Le département médico-technique :
  - l'imagerie médicale.
  - la biologie médicale.

## - Services :

- Le service d'accueil et d'admission.
- Le service de la pharmacie hospitalière.

## II-Présentation du laboratoire du CHR Ibn Al Khatib:

Le laboratoire d'analyses médicales fait partie des services d'appui de l'HIK. L'architecture et l'organisation fonctionnelle avec leurs caractéristiques seront détaillées dans ce chapitre.

### A- Les locaux:

Le laboratoire dispose de différents postes de travail qui sont répartis dans les locaux suivants :

- Salle d'hématologie et d'immuno-hormonologie.
- Salle de biochimie, de sérologie et d'hémostase.
- Salle de bactériologie et de parasitologie.
- Salle de bacilloscopie.
- Locaux destinés à la salle de prélèvement des patients « externes ».
- Sites d'accueil, d'orientation et de remise des résultats.
- Lieu de stockage des réactifs, fongibles et matériels.
- Laverie.

### B- Le personnel :

Les différentes activités sont assurées par une équipe du laboratoire composée de 19 personnels en plus de deux personnels d'appui, une femme de ménage, et d'un agent de sécurité. Sur le tableau ci-dessous figure la liste du personnel:

#### 1- L'effectif :

- |  |    |
|--|----|
| ➤ Médecin biologiste (M. chef):        | 01 |
| ➤ Technicien de laboratoire (I. Chef): | 01 |
| ➤ Assistante médicale:                 | 02 |
| ➤ Ingénieur:                           | 02 |
| ➤ Technicien de laboratoire:           | 07 |
| ➤ Infirmier:                           | 06 |
| ➤ Personnel d'appui:                   | 02 |

## 2- Les interlocuteurs :

Sont représentés par :

- Le Chef de service (M. biologiste).
- L'Infirmier Chef (Tech. de laboratoire).
- Le personnel d'accueil (Infirmière).

## C- Le matériel et l'équipement :

Le laboratoire dispose d'un certain nombre d'automates et d'appareils permettant de faciliter la tâche du technicien, de diversifier la gamme des analyses et d'en assurer plus d'exactitude et de précision. Nous citons :

➤ Automate d'immuno-hormonologie :	01
➤ Automate d'hématologie :	02
➤ Appareil d'hématologie :	01
➤ Automate de Biochimie :	02
➤ Appareil à hémoglobine glyquée :	01
➤ Appareil d'analyse d'électrolytes	01
➤ Spectrophotomètre :	02
➤ Coagulomètre :	02
➤ Autoclave :	01
➤ Centrifugeuse :	03
➤ Micro-centrifugeuse	01
➤ Etuve bactériologique :	03
➤ Microscope :	04

## D- Les horaires de travail :

Le laboratoire de biologie médicale est ouvert au public et aux services hospitaliers du lundi au vendredi, de 8 h. 30 min. à 16 h. 30 min. Les résultats sont rendus aux patients externes et aux services de soins après 15 heures de chaque jour hormis l'ECBU et le médullogramme qui demandent plus de temps.

## E-Le rendement :

Le laboratoire traite les prélèvements émanant :

- des services des soins multidisciplinaires avec des spécialités médicales chirurgicales, (le service de la chirurgie n'assure que les actes programmés), pédiatriques (avec la néonatalogie et la réanimation pédiatrique), gynéco-obstétriques, et de néphrologie (Hémodialyse),
- du service des urgences, du centre des consultations externes, et du service d'anesthésie – réanimation chirurgicale.

Le laboratoire a une vocation régionale puisqu'il reçoit également les patients « externes » de la région de Fès-Boulmane et des régions limitrophes.

Le tableau (1) ci-dessous montre le rendement en nombre de tests réalisés en 2011 selon les disciplines :

	Nombre de test annuel (NA)	% (NA/T)
BIOCHIMIE	98537	48%
HEMATOLOGIE	93665	46%
AUTRES : sero-immuno-parasito- bactériologie	11246	6%
TOTAL (T)	203448	100

Le nombre total d'examens effectués est d'environ 203448/11mois dont 93665 tests relatifs à la biochimie, soit 48 %. Le volume des analyses de la CRP est de l'ordre de 1698, ce qui représente 2,45 % du total de la biochimie.

C'est un faible pourcentage mais le dosage de la CRP tire son importance du fait de son utilité dans le diagnostic de l'inflammation aigue, surtout que le service de la pédiatrie est le plus demandeur pour asseoir le diagnostic d'une infection néo-natale. Les médecins pédiatres ont donc besoin de résultats fiables pour conduire le diagnostic étiologique et par là un traitement adéquat.

## Chapitre II : définitions :

### - CRP :

La protéine C-réactive (en anglais *C-reactive protein*, CRP) est une protéine exclusivement synthétisée par le foie. C'est un marqueur biologique de la phase aiguë de l'inflammation.

### - Contrôle de qualité :

C'est l'ensemble des procédures de vérification visant à garantir la fiabilité d'une méthode et la bonne qualité des différentes analyses biologiques.

Il se compose du :

#### ➤ Contrôle de qualité intra-laboratoire :

Il est constitué par l'ensemble des procédures appliquées par le personnel de laboratoire. Le contrôle de qualité n'élimine pas les erreurs mais les minimise.

C'est un contrôle :

- du calibrage
- et de la reproductibilité.

Il permet au laboratoire de valider techniquement une série de mesures ou le choix d'une méthode d'analyse.

### - Matériau d'essai :

Matériau ou substance sur lequel peut être appliqué un mesurage

Exemple : sang, urine, LCR....

### - Analyte :

C'est l'objet de la méthode d'analyse, exemple : CRP, glucose.....

### - Mesurage :

C'est l'ensemble **d'opérations** ayant pour but de **déterminer** une **valeur (= résultat)** d'une **grandeur (= Mesurande)**

## - Mesurande :

C'est une **grandeur** particulière soumise au mesurage. Exemple : *gramme*.

## - Substance de référence (étalon ou contrôle) :

C'est une Substance dont une ou plusieurs propriétés ont été suffisamment définies pour servir :

- l'étalonnage d'un appareil (**étalon**).
- à la vérification d'une méthode de mesure (**contrôle**).

## - Etalon ou standard:

Il sert à établir la **fonction d'étalonnage**.

On distingue :

### les étalons primaires :

Ce sont **des étalons** dont tous les constituants sont connus et entièrement définies. Ils sont élaborés par **des matériaux de référence**.

### Des étalons secondaires :

Ce sont **des sérums** dont les résultats sont obtenus par **comparaison** aux étalons primaires.

## - Contrôle :

Est constitué d'échantillons contenant une quantité **définie** de la ou des substances à doser.

Il doit être stable dans le temps et identique dans sa composition et propriétés aux échantillons naturels à analyser.

Il est analysé par la **même** méthode afin de servir au contrôle de qualité et non à la calibration.

## - Blanc :

C'est l'essai réalisé en **absence** de l'analyte.

## - Techniques :

Ce sont les détails opératoires et les procédés utilisés.

## - Méthode d'analyse :

C'est la manière de procéder pour effectuer l'analyse de l'analyte (Principe et ou réaction, Réactifs, appareillage, modes opératoires, etc...).

Un ensemble de méthodes est dénommé méthodologie.

On distingue 3 types :

### ➤ Méthode d'analyse quantitative :

C'est une méthode qui permet de mesurer la quantité d'analyte présent dans le matériau d'essai (sérum, urine, etc...), elle utilise la *fonction d'étalonnage*.

### ➤ Méthode d'analyse de référence :

C'est une méthode qui donne la valeur de **référence acceptée** de la grandeur de l'analyte.

### ➤ Méthode d'analyse alternative (non classifiée) :

Elle est dite de **routine**. C'est celle qui est utilisée par les **laboratoires** d'analyses.

## - La précision analytique :

La précision donne une idée sur la **qualité de l'accord** entre des mesures :

- Répétées,
- effectuées sur le même échantillon,
- et réalisées dans des conditions déterminées et constantes.

## - Les erreurs :

Plusieurs facteurs sont à contrôler pour éviter de rendre des analyses contenant des erreurs. On distingue des :

### ➤ Erreurs grossières :

Ces erreurs sont parfois **difficiles** à détecter. Elles sont dues à un manquement dans les critères de **praticabilité** dont essentiellement la *rapidité* d'exécution d'une méthode qui ne doit jamais être obtenue au dépend d'autres qualités. Elles proviennent le plus souvent de l'inattention ou de la négligence à cause d'une mauvaise **organisation** du laboratoire (Essentiellement le **secrétariat**).

### ➤ Erreurs de mesure :

C'est le **résultat** d'un mesurage **moins** une valeur **vraie** du mesurande : tout mesurage réalisé à l'aide de la méthode étudiée donne un résultat. Celui-ci est **inévitablement** associé à une erreur de mesure, définie comme la différence entre le résultat obtenu et la valeur vraie du mesurande.

Dans la pratique, la valeur **vraie** du mesurande est **inaccessible**, on est amené à utiliser une valeur **conventionnellement acceptée** comme telle.

L'erreur de mesure comprend **deux composantes** :

- Erreur systématique ou de justesse.
- Erreur fortuite ou aléatoire ou d'imprécision.

### ➤ Erreur systématique ou de justesse :

C'est la **moyenne** qui résulte d'un nombre infini de mesurages du même mesurande effectués dans des conditions de répétabilité **moins** une **valeur vraie** du mesurande.

Elle conduit à des résultats anormalement abaissés ou augmentés affectant **tous** les spécimens. Il s'agit souvent d'une altération de l'**étalon** ou de l'**appareil** lui-même.

### ➤ Erreur aléatoire ou fortuite ou d'imprécision :

C'est le résultat d'un mesurage **moins** la **moyenne** d'un nombre infini de mesurages du même mesurande effectués dans des conditions de **répétabilité**.

## - Exactitude analytique :

L'exactitude analytique d'une méthode représente la qualité de l'accord entre la valeur moyenne trouvée en faisant un certain nombre de mesures et une valeur acceptée comme étant une valeur de référence. A condition que la méthode d'analyse ne soit pas entachée d'erreurs fortuites ce qui signifie qu'elle doit avoir une meilleure précision.

## - la valeur vraie d'une grandeur :

C'est une valeur qu'on obtiendrait par un mesurage **parfait**. Les valeurs des **solutions simples** peuvent être considérées comme vraies, ce qui n'est pas le cas des **milieux biologiques** à cause :

- De la complexité des solutions et
- de l'ignorance de nombreuses interférences.

➤ Valeur Vraie = Résultat de l'analyse + Erreur systématique

▶ + Erreur aléatoire

### - la valeur cible ou de référence acceptée:

C'est la valeur qui sert de référence agréée pour une comparaison et qui permet d'exprimer l'exactitude relative d'une méthode en se référant aux résultats des laboratoires d'experts.

La valeur cible doit être aussi proche que possible de la valeur vraie.

### - Répétabilité :

La répétabilité d'une méthode se rapporte à des essais de la même grandeur, effectués dans des conditions aussi stables que possibles et à courts intervalles.

Elle est évaluée en procédant à des déterminations complètes et distinctes sur des échantillons *identiques* provenant du même lot homogène de produit. Cela permet d'évaluer la précision de la méthode dans les conditions opératoires normales.

### - Reproductibilité :

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes :

- utilisation d'échantillons distincts, appartenant à des sérums de contrôle du même lot.
- déterminations réalisées à des dates différentes.
- résultats obtenus par différents analystes.
- utilisation de matériel différent.

### - Validation technique :

La validation technique comporte la vérification de la conformité des conditions d'exécution des procédures et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

### - Validation biologique :

La validation biologique est le contrôle de la vraie semblance et de la cohérence de l'ensemble des résultats des analyses d'un même dossier, et leur confrontation avec les résultats antérieurs. Elle peut nécessiter la connaissance de l'état clinique du patient et les traitements mis en œuvre. Elle est assurée par un biologiste.

## Chapitre III : Matériels et méthodes :

### I- Dosage de la CRP :

#### A- Principe :

Le dosage de la CRP est basé sur une mesure quantitative immunoturbidimétrique dans le sérum humain ou plasma.

Le réactif est une suspension de particules de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-protéine C-réactive humaine, qui s'agglutinent en présence de protéine C-réactive dans le sérum des patients. Dans les conditions opératoires, la mesure du développement de cette agglutination enregistre une variation de densité optique proportionnelle à la quantité de CRP dans l'échantillon.

#### B. Le prélèvement :

La qualité des résultats de l'analyse médicale ne dépend pas uniquement de la qualité de l'analyse. Des sources d'erreurs peuvent provenir de la phase pré-analytique qui comporte :

- la préparation du patient,
- les conditions dans lesquels sont exécutés les prélèvements,
- le choix des tubes,
- le délai d'acheminement et les conditions de transport des échantillons vers le laboratoire.

Le prélèvement est effectué sur flacon sec. Après centrifugation le sérum peut être conservé 7 jours à 2-8 °C.

#### ➤ Prélèvement et conservation :

Conservation	Température	Stabilité
Température ambiante	18°C- 28°C	≤ 4 heures
Réfrigérés	2°C- 8°C	≤ 3 jours
Congelés	≤ - 18°C	≤ 6 mois

Tableau2 : Conservation et stabilité des échantillons pour la CRP : sérum et plasma :

## C- Méthode du dosage :

Le dosage se fait en utilisant le même principe avec deux techniques différentes l'une est manuelle et l'autre est automatisée.

### 1- Technique manuelle :

#### a- Appareils et accessoires :

✚ Spectrophotomètre.

C'est une technique qui utilise un spectrophotomètre conçu pour la chimie clinique et turbidimétrie, avec une cuvette de débit de 18 µL. il a une grande capacité de mémoire, le contenu est riche en programmes pour répondre aux besoins des patients. La technologie d'aspiration d'air minimise la contamination.

✚ Autres :

- Centrifugeuse.
- Réfrigérateur.
- Tubes à essai.
- Micropipettes réglables (5 - 50µl).
- Micropipettes réglables (50 - 1000µl).
- Cônes pour micropipettes.

#### b- Réactifs utilisés :

##### ➤ Composition :

- Particules de latex couplées d'anti-humain CRP.
- Diluant tampon.
- Calibrateur (sérum humain).

La concentration de protéine C- Réactive est indiquée sur l'étiquette du flacon.

##### ➤ Conservation :

Stable jusqu'à la fin du mois indiqué et l'année d'expiration à 2-8°C.

➤ Caractéristiques métrologiques :

- Les limites de la linéarité :

- Limite supérieure : jusqu'à 80 mg/l.

Au delà de cette valeur, il faut diluer l'échantillon puis multiplier les résultats par le facteur de dilution.

- Limite inférieure de linéarité ou de détection : 2 mg / l.

Les valeurs inférieures à 2 mg/l donnent des résultats non reproductibles.

c- Technique :

➤ .Préparation du réactif de travail :

On agite le latex avant usage et on préparer la quantité nécessaire ainsi : 1ml réactif latex + 9 ml diluant,

Le réactif de travail est stable 1 mois à 2-8°C.

Il est recommandé de préparer un réactif de travail en fonction de La charge de travail.

➤ Procédure :

1. Programmation de l'appareil :

- On règle la longueur d'onde de lecture du spectrophotomètre à 540 nm
- On règle à zéro d'absorbance sur l'eau distillée (blanc réactif).

2. Etalonnage de l'appareil pour tracer la courbe d'étalonnage. (tableau : 3)

	Calibrateur	Blanc
Réactif de travail (µL)	500	500
Calibrateur (µL)	3	--
Eau distillée (µL)	--	3

Tableau3 : Etalonnage de l'appareil.

La courbe d'étalonnage est stable pendant 10 jours, après quoi une nouvelle courbe doit être générée.

3. On analyse la série d'échantillons des patients

- On va pipeter dans une cuvette (tableau : 4)

	Echantillons		
	<i>Contrôle</i>	Patient	Blanc
Réactif de travail (µL)	500	500	500
contrôle (µL)	3	--	--
Echantillon (µL)	--	3	--
Eau distillé (µL)	--	--	3

Tableau4 : Préparation des réactifs.

- On va mélanger et lire l'absorbance (A1) et après 2 minutes de l'ajout de l'échantillon lire (A2).
- On Calcule la concentration en CRP selon la formule suivante :

$$\frac{(A2 - A1) \text{ Echantillon} - (A2 - A1) \text{ Blanc}}{(A2 - A1) \text{ Calibrateur} - (A2 - A1) \text{ Blanc}}$$

La concentration de la CRP est exprimée en mg/L.

## 2- technique automatisée :

### a- Appareils:

C'est une technique qui utilise un automate de biochimie:



C'est le nouvel automate multiparamétrique issu de l'évolution et de l'expérience d'une longue génération de photomètres et analyseurs automatiques, il est à la pointe de la technologie.

Environ 240 tests/h, jusqu'à 50 tests simultanés, 50 réactifs en chimie et turbidimétrie, 120 échantillons, tubes primaires ou cupules gériatrie, station de travail indépendante sans connexion eau, CQ.

## b- Réactifs utilisés :

### ➤ Composition :

Réactif A : Tampon.

Réactif B : Suspension de particules de latex sensibilisées avec les anticorps anti-CRP humaine.

Étalon de CRP ou standard est un lyophilisat de sérum humain qu'on reconstitue avec 1,0 ml d'eau distillée.

### ➤ Conservation :

On conserve à 2-8°C les réactifs reconstitués. La solution étalon est stable 1 mois à 2-8°C.

### ➤ Caractéristiques métrologiques :

- Limite de détection : 1,20 mg/L.
- Limite de linéarité : 150 mg/L. Quand des valeurs supérieures sont obtenues, diluer l'échantillon au 1/5 avec de l'eau distillée et répéter la mesure.

## c- Technique :

### ➤ Préparation du réactif de travail :

On vide le contenu d'un tube de réactif B dans un flacon de Réactif A. Pour préparer des volumes moins importants, on mélange dans la proportion : 1ml de Réactif B + 4ml de Réactif A, puis on homogénéise.

Cette préparation est stable 20 jours à 2-8°C.

### ➤ Procédure :

Le manuel d'utilisation de l'automate comporte les instructions nécessaires pour l'utilisation de l'appareil. La manipulation de l'analyseur est simple et intuitive, elle comporte :

## Programmation :

La programmation des paramètres de l'essai figurant sur le prospectus qui accompagne le réactif (tableau : 5)

Général	Technique Mode d'analyse Type d'échantillon Unités Type de réaction Technique de turbidimétrie Décimales N° Répliques	CRP Point final mono Sérum Mg/L Croissante Oui 1 1
Procédure volumes  Filtres  Temps	Lecture Echantillon Réactif1 Réactif2 Lavage Facteur prédilution Facteur postdilution Principal Référence Lecture1	Bichromatique 3 440 - 1,2 - 1,4 535 670 180s
Calibration	Type de calibration N° calibreurs Répliques calibreur Répliques blanc	Spécifique 1 3 3
Options	Limite absorbance blanc Limite blanc cinétique Limite de linéarité	0,700 - 150

Tableau5 : Programmation des paramètres de l'essai.

➤ La méthode d'opération de routine de l'analyseur peut être résumée par les instructions suivantes :

1. Vérifier que le conteneur de déchets est vide et que l'accord rapide de celui-ci est dûment connecté. Remplir le conteneur de liquide de système.
2. Mettre en place un rotor de réactions.
3. Allumer l'ordinateur et accéder au logiciel d'usage.
4. Cliquer sur le bouton Warm Up pour allumer et démarrer l'analyseur.
5. Saisir si besoin le code du patient et ajouter l'échantillon à la liste d'échantillon en cliquant sur le bouton ajouter.
6. Cliquer sur le bouton positionner et positionner l'échantillon pour que l'analyseur positionne automatiquement l'échantillon pour que l'analyseur positionne tous les éléments nécessaires sur le plateau à racks.
7. Cliquer sur le bouton ok.
8. Placer les flacons de réactifs et les tubes d'échantillons sur le plateau de l'analyseur, en suivant la configuration affichée par l'ordinateur. Placer le flacon d'eau distillée et, si besoin, les flacons de solution de lavage et de solution saline.
9. Cliquer sur le bouton commencer pour démarrer le travail de l'analyseur et visualiser le moniteur.
10. Une fois les analyses terminées, visualiser et imprimer les rapports à partir de l'écran.
11. Extraire le rotor de réactions de l'analyseur.
12. Eteindre l'analyseur en cliquant sur le bouton Shutdown.
13. Vider le conteneur de déchets, lorsque l'analyseur est éteint.

#### Etalonnage :

Il est recommandé d'utiliser un étalon de CRP et de calibrer au moins tous les 2 mois, après un changement de lot de réactif.

## D- Expression des résultats :

### 1- Valeurs normales :

Inférieur ou égal à 6 mg/l.

### 2- Variations pathologiques :

#### - Augmentation de la CRP :

La CRP sérique augmente dans les **inflammations aiguës** rencontrées dans les infections bactériennes et n'augmente pas si l'infection est virale, l'Infarctus du myocarde et dans d'autres maladies inflammatoires aiguës (arthrites, rhumatisme articulaire aigu).

## II- Contrôle de qualité interne :

La fiabilité analytique d'une méthode est une qualité globale qui réunit des critères variés dans le manquement ou défaut conduisent à des erreurs diverses.

En théorie, le contrôle de qualité d'une méthode a pour but de permettre l'approche de la valeur vraie : en fait, il a aussi celui, non moins appréciable, de permettre un choix judicieux et une amélioration scientifique d'une méthode d'analyse.

Le contrôle de qualité permet la comparabilité entre deux méthodes. Il fait appel à des critères dits de qualité pour le choix d'une méthode d'analyse fiable garantissant des résultats de bonne qualité.

### A. Objectif :

Les qualités d'une méthode font appel au contrôle de qualité qui contribue à la détection des erreurs imputables au laboratoire et à l'élaboration des moyens qui permettent de les mesurer et de les éviter pour ne pas entraîner **d'erreurs d'interprétation**.

Il existe plusieurs **guides et normes internationaux** établis par des commissions d'**experts** qui permettent l'étude détaillée des qualités d'une méthode choisie.

Ils s'adressent à toutes les catégories de laboratoire mais particulièrement aux laboratoires accrédités à pratiquer des analyses en **série** afin :

- de **déceler** des erreurs,
- et de les **réduire** au maximum.

## B- Les critères de fiabilité d'une méthode :

Il est nécessaire de concevoir que l'évaluation des mesures réalisées sur les humeurs de l'homme sain ou malade n'a pas seulement à tenir compte des qualités intrinsèques des mesures, mais aussi de leur fiabilité. Celle-ci doit être appréciée avant de procéder à l'interprétation des résultats analytiques.

L'étude scientifique des performances propres de chaque méthode est appelée « critères de fiabilité ».

## C- Réactifs :

Les réactifs nécessaires pour la réalisation du CQI sont :

### 1. L'étalon :

La première démarche lors de la mise en œuvre d'une méthode est de procéder à un étalonnage qui est nécessaire quel que soit son principe de mesure. De plus, chaque fois que l'on change les conditions de mesure, il faut vérifier l'identité de la courbe d'étalonnage.

### 2. Le contrôle de référence :

Pour l'étude de la fiabilité d'une méthode, on utilise un sérum de contrôle. Ce lui-là va permettre de faire une exploration générale des deux méthodes de dosage de la CRP au niveau du laboratoire, afin d'en juger les qualités.

De nombreuses maisons (Biotrol, Biomérieux, Biosystèmes, Boehringer, Hyland, Merck, etc.) fabriquent des sérums de contrôle de commerce dosés permettant le contrôle d'une technique.

#### Description:

Le sérum contrôle est un lyophilisat de sérum humain qui contient des protéines dans des concentrations adéquates et ne contient pas des conservateurs qui puissent interférer sur les déterminations.

#### Stabilité :

Le sérum contrôle lyophilisé est stable à 2-8°C pendant la durée de validité indiquée sur l'étiquette.

Le sérum contrôle reconstitué est stable au moins 10 jours à 2-8°C ou à 20°C.

### Valeurs assignées :

Le contrôle utilisé par le laboratoire est un contrôle de commerce dont les valeurs assignées (la valeur moyenne et les limites) pour la CRP ont été déterminées grâce à un nombre considérable d'essai en utilisant l'expérience en variabilité inter-laboratoire.

Les valeurs cibles sont comprises entre 36,5 et 67,7 mg/litre soit  $52,1 \pm 15,6$  mg/litre.

## Chapitre IV : L'expression des critères de fiabilité:

La fiabilité analytique est une qualité globale qui réunit des critères variés qui recouvrent les performances fondamentales d'une méthode. On les classe en deux groupes :

- Les critères statistiques définissant la précision d'une méthode en appréciant la distribution autour d'une moyenne de résultats d'un grand nombre de mesures sur un même échantillon.
- Le critère opérationnel caractéristique d'une méthode appelé « exactitude ». Un manque d'exactitude conduit à une erreur systématique.

### I- La précision analytique:

La précision analytique d'une méthode représente la qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions constantes et déterminées.

#### A- L'imprécision :

On calcule habituellement à partir de mesures répétées le manque de précision ou d'imprécision d'une méthode. Celle-ci est déterminée par des **critères statistiques** :

- *courbe de Gauss* (*l'écart type relatif ou par le coefficient de variation*) Ces critères apprécient la **distribution** autour d'une **moyenne** des résultats d'un grand nombre de mesures effectuées sur un **même échantillon**. Une distribution est dite **normale** lorsque les résultats se répartissent **symétriquement** autour d'une moyenne à fréquence élevée (sur une **courbe de Gauss**). Lorsque la distribution est **normale**, l'imprécision peut s'exprimer par **l'écart type relatif** ou par **le CV**. Les **trois indices** suivants expriment l'importance de la dispersion des résultats autour de la moyenne :

➤ Calcul des indices :

Soit une série de N mesures qui ont fourni des valeurs  $x_i$  ( $x_1, x_2, x_3, \dots, x_N$ ).

$$\text{La moyenne } \bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

L'écart d'une mesure  $x_i$  par rapport à la moyenne  $\bar{x} = x_i - \text{moyenne } \bar{x}$ .

$$\text{La variante } s^2 = \frac{\sum (x_i - \text{moyenne } \bar{x})^2}{N-1}$$

L'écart-type  $s$  ou déviation standard : (exprimé en valeur absolue)

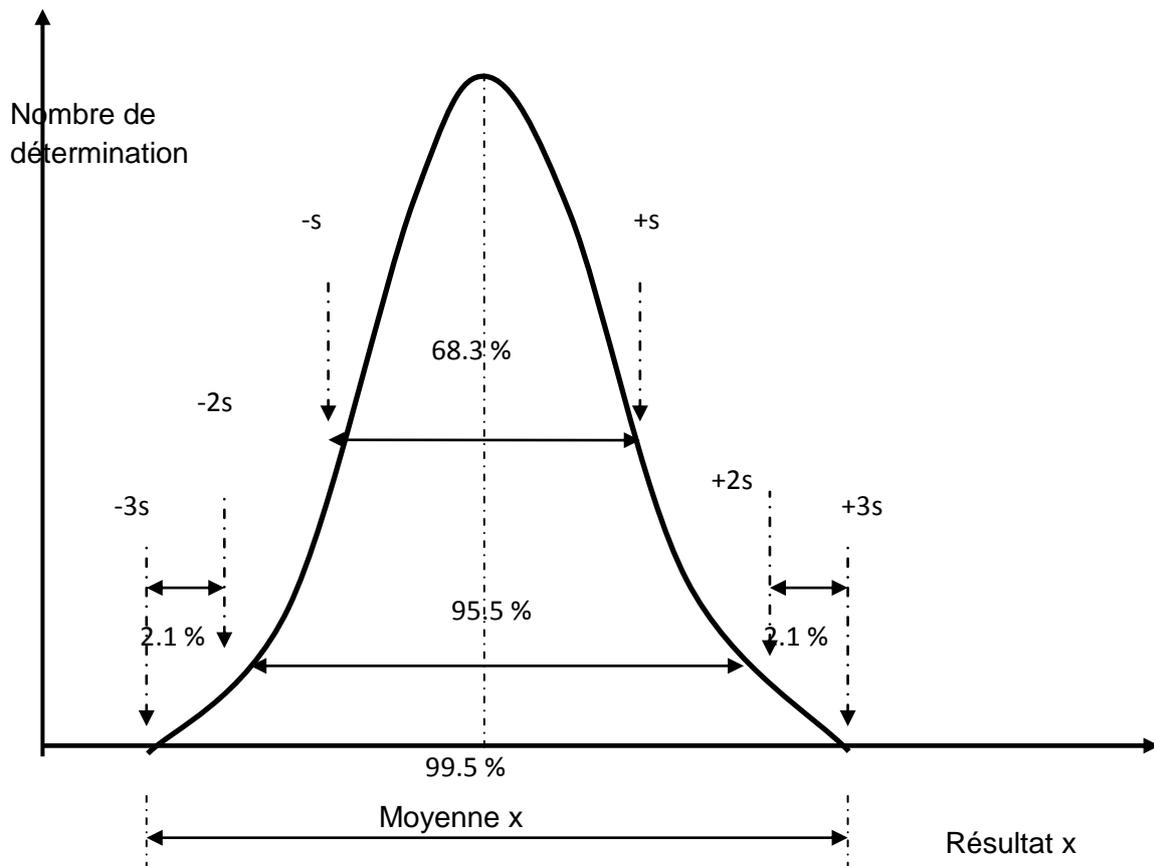
$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \text{moyenne } \bar{x})^2}{N-1}}$$

Il représente donc la dispersion des résultats.

$$\text{L'écart-type relatif } s_r \text{ (par rapport à la moyenne)} = \frac{\sum (x_i - \text{moyenne } \bar{x})^2}{N-1}$$

$$\text{Le coefficient de variation (CV)} = \frac{S}{100}$$

➤ Graphique1: Représentation d'une distribution :



➤ L'intervalle de confiance et de risque :

Quant on dit qu'une répartition est définie par sa moyenne et son écart type on sait qu'en fait que :

-95,5 % des valeurs se situent dans un intervalle limité par les valeurs  $(x + 1,96s)$  et  $(x - 1,96s)$  (Intervalle symétrique par rapport à la moyenne)

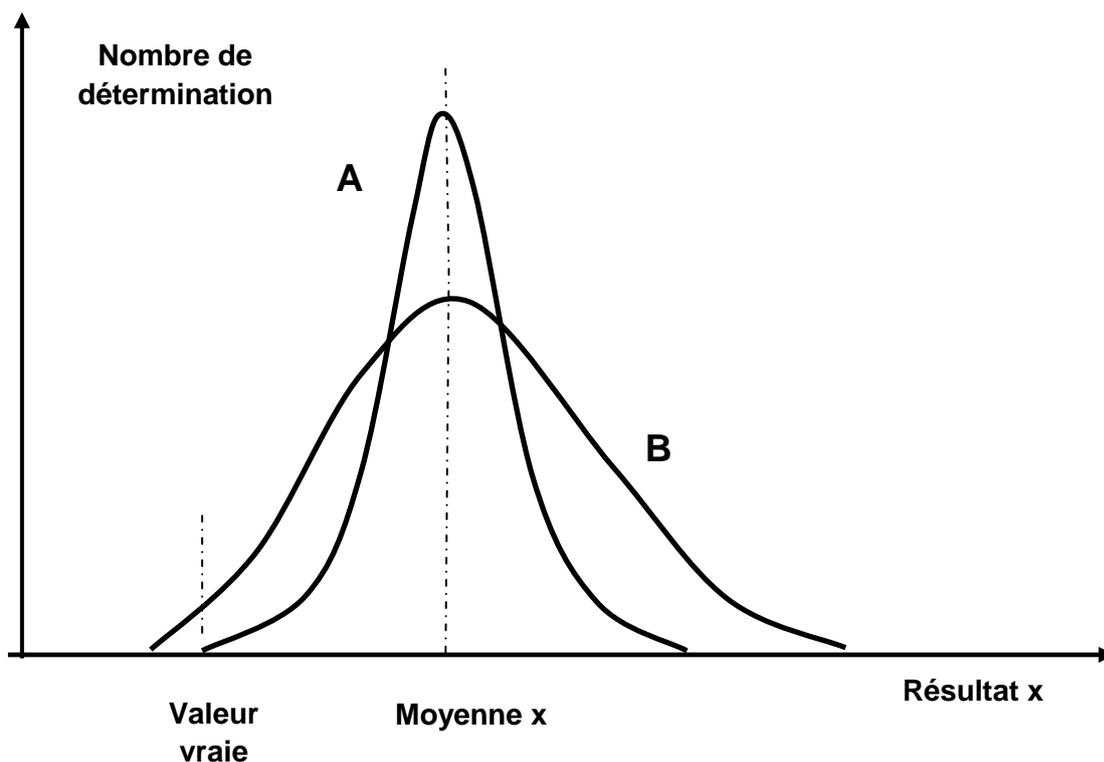
-Et que 99,7 % des valeurs se situent dans un intervalle limité par les valeurs  $(x + 2,9766s)$  et  $(x - 2,9766s)$ .

B- La précision :

La précision (**gamma  $\Gamma$** ) est l'inverse de l'imprécision, sa description numérique est fournie par la valeur réciproque de l'écart-type relatif :

$$\Gamma = sr^{-1} = x / s$$

La précision est dite acceptable lorsque sa valeur reste à l'intérieur des limites établies sur des bases statistiques et choisies en fonction des performances conformes aux critères d'efficacité.



**Graphique2: Reproduction de deux techniques :**

« A » est une technique aussi exacte mais plus précise que « B ».

## **II- l'exactitude analytique :**

### **A- L'inexactitude :**

L'inexactitude peut être appréciée par la différence entre la moyenne d'une série de mesures répétées et la valeur conventionnellement vraie c-à-d, les valeurs cibles de la CRP du contrôle utilisé (52.1mg/l). Si  $\Delta c$  est cette différence (+ou-), l'inexactitude peut être chiffrée par cette grandeur exprimée en unité caractéristique de la propriété mesurée.

### **B. l'exactitude :**

Dans ces conditions, l'exactitude analytique étant l'inverse de l'inexactitude. La description numérique de l'exactitude A est fournie par l'expression :  $A = 1 / \Delta c$ .

### III- La comparaison entre deux méthodes :

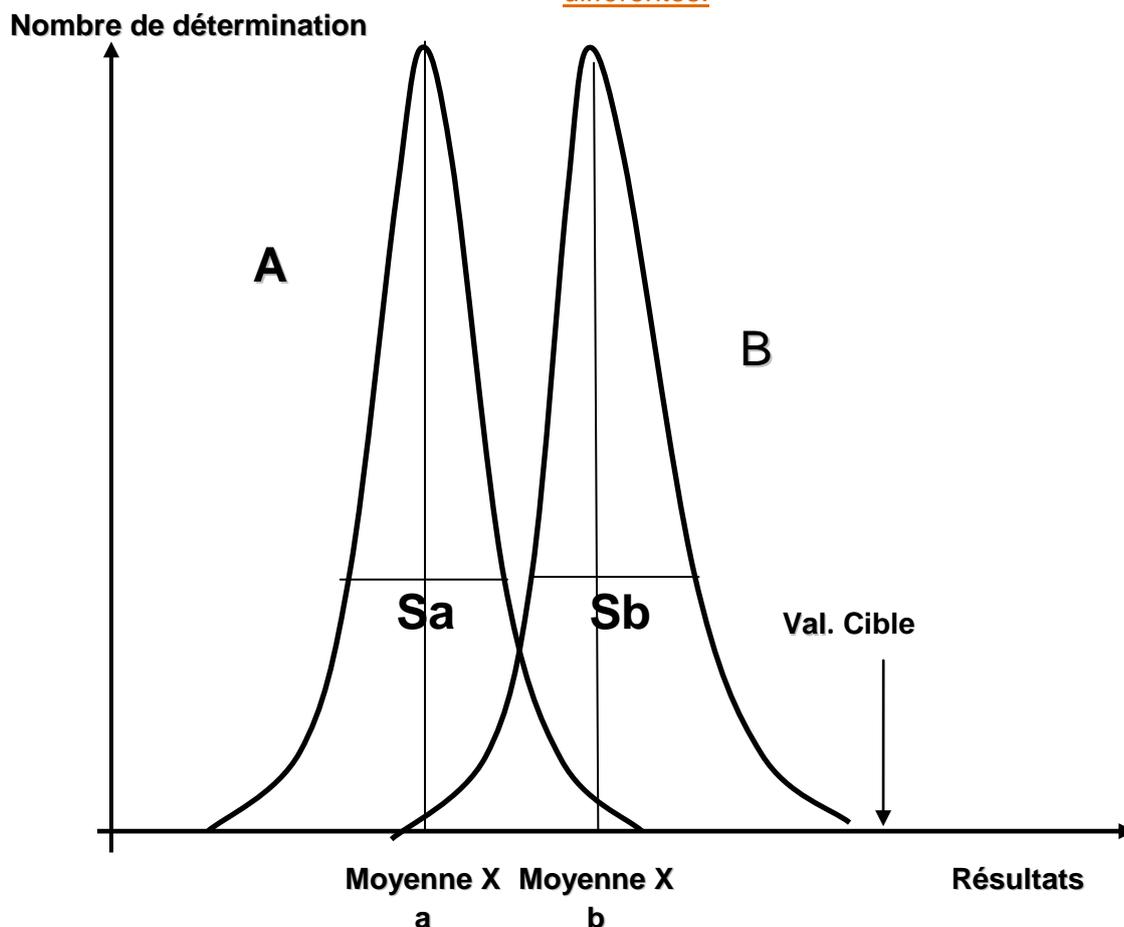
L'évaluation de l'inexactitude d'une méthode est souvent difficile. Elle intéresse pourtant le biologiste « inventeur » de la méthode autant que le biologiste « utilisateur ».

Les causes d'inexactitude peuvent être dues à la complexité de l'analyse ou des conditions techniques à réaliser, à la qualité des étalons utilisés, à la qualité technique de l'opérateur, des appareils de mesure, etc....

Les moyens pour vérifier l'exactitude analytique sont souvent complexes, dans la pratique, on procède par la comparaison de moyennes de différentes méthodes : en comparant les résultats moyens et leur répartition obtenue sur le même échantillon

On peut se faire une idée sur l'exactitude relative d'une méthode donnée, mais pour avoir des données plus précises il importe de comparer la méthode étudiée à la méthode de référence lorsqu'elle existe.

Graphique3: Représentation de la précision et de l'exactitude de deux techniques différentes.



La technique «a» a la même précision que la technique «b» ( $S_a = S_b$ ) mais présente une différence d'exactitude.

## Chapitre V : Application du CQI:

Lors de la mise en œuvre d'une méthode ou à chaque fois que le biologiste cherche à interpréter des résultats d'analyses, son travail consistera à s'assurer de la qualité propre de la méthode employée en fonction des critères de fiabilité, particulièrement la précision et l'exactitude, et de praticabilité dont la rapidité d'exécution et le transfert .

Les critères de fiabilité sont étudiés systématiquement au cours du fonctionnement du laboratoire. Ils sont devenus un mode de travail qui prévoit le contrôle systématique des méthodes, des appareils, des réactifs et des résultats.

En ce qui concerne le contrôle de qualité intra-laboratoire analytique ayant pour objectif la comparabilité entre les deux techniques manuelle et automatisée du dosage de la CRP, on a opéré ainsi :

### I- Collecte des données :

#### A- Etalonnage :

L'étalonnage est la première étape de mise en œuvre du contrôle d'une méthode afin d'établir la fonction d'étalonnage.

L'étalonnage est réalisé par l'usage d'un étalon de commerce dont la concentration en CRP est aussi bien définie que possible et qu'on retrouve dans le même coffret que celui des réactifs de dosage.

#### B- Choix du sérum de contrôle :

Le sérum de contrôle peut être un sérum commercial lyophilisé ou non, ou un pool de sérum réalisé au laboratoire, conservé en petits tubes fractionnés à usage unique et congelés. La régénération des sérums lyophilisés ou la décongélation est réalisée avec beaucoup de soin dans des conditions standardisées.

En ce qui concerne notre étude, on a utilisé un sérum humain lyophilisé dont la concentration en CRP, après reconstitution avec 1,0 ml d'eau distillée, est comprise entre 36,5 et 67,7 mg/litre, soit  $C = 52,1 \pm 15,6$  mg/litre.

Il est stable dans le temps jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette du conditionnement.

## C- Traitement des échantillons de contrôle :

Les échantillons du contrôle sont traités de la même façon que les échantillons des patients. Les tests statistiques simples utilisés en chimie clinique basés sur les propriétés de la loi normale, supposent que le nombre de mesures est égal ou supérieur à 30 déterminations.

Mais à cause de contraintes d'ordre technique, on n'a pu réaliser qu'une série de 23 analyses de la CRP par la technique utilisant l'automate de biochimie et 23 fois en technique manuelle dont la lecture est effectuée par un spectrophotomètre.

## II- Traitement des données :

On a pratiqué dans des conditions de répétabilité une série de mesures sur un même contrôle, dans le même laboratoire, pendant un court intervalle de temps, et par le même opérateur. Seule la technique de dosage diffère (réactifs et équipements).

On a réalisé 23 déterminations par la technique manuelle utilisant le spectrophotomètre et 23 par l'automate de biochimie. On a représenté les données sous forme de tableaux et de graphiques.

## A- Représentation des tableaux :

Les résultats des déterminations du contrôle de référence obtenues par les deux techniques figurent sur les deux tableaux ci-dessous :

Tableau 6 : Représentation des résultats d'analyses réalisées par la technique manuelle.

N. déterminations	Concentrations (mg/l)
1	41
2	39
3	42
4	38
5	42
6	40
7	42
8	39
9	43
10	38
11	43
12	39
13	43
14	41
15	41
16	39
17	42
18	39
19	42
20	41
21	40
22	41
23	42

Tableau 7 : Représentation des résultats d'analyses réalisées par la technique automatisée.

N. déterminations	Concentrations (mg/l)
1	54
2	57
3	58
4	57
5	58
6	56
7	57
8	56
9	59
10	57
11	58
12	56
13	55
14	57
15	58
16	60
17	56
18	58
19	56
20	59
21	57
22	55
23	57

**✚ Calculs des moyennes et des écart-types :**

Il est important de connaître la moyenne et l'écart-type qui expriment l'importance de la dispersion autour de la moyenne et qui permettent d'évaluer la précision et l'exactitude des deux techniques.

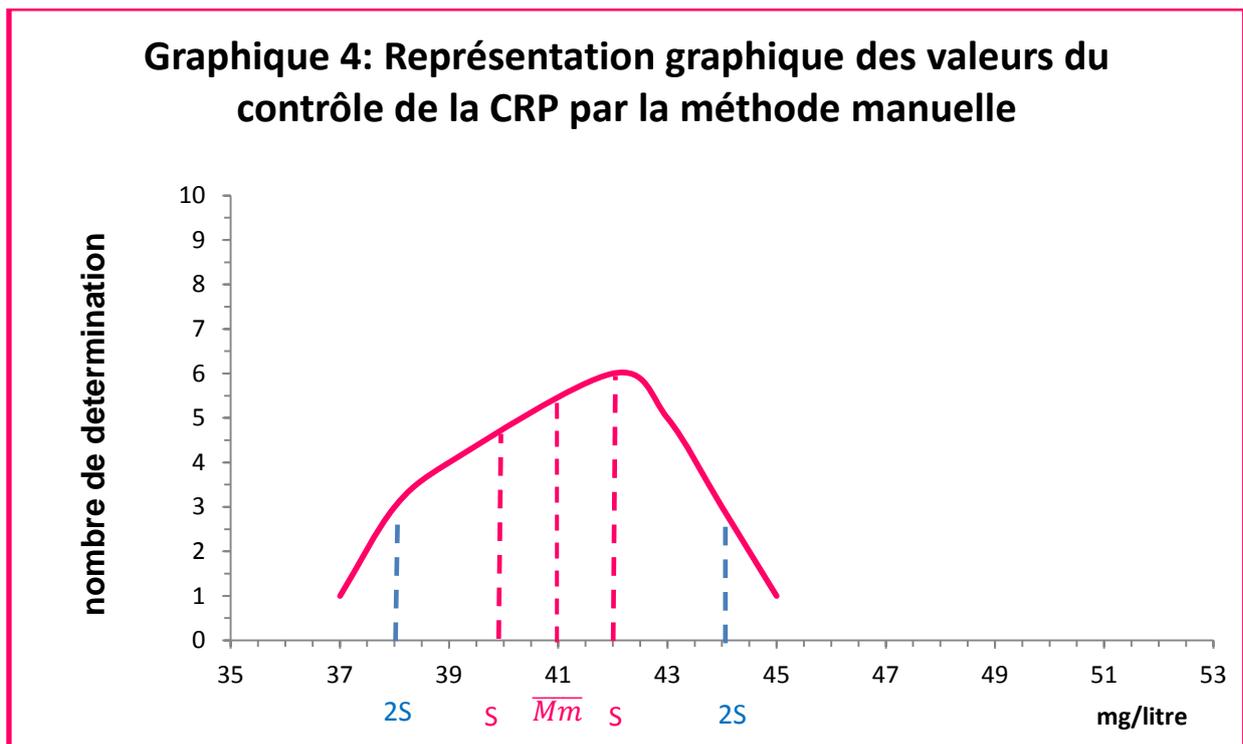
		Moyenne $\bar{M}$ (mg/L)	L'écart-type S	L'écart-type 2S	Précision $\Gamma = \bar{M} / S$	Exactitude $A = 1/ VO - c $
Technique	Spectro-Photomètre	41.02	± 1.59	± 3.18	21.90	- 0.08
	l'automate de biochimie	57	± 1.41	± 2.82	28.30	0.20
Valeurs cibles du contrôle de référence (c)		52.1	±15,6	± 3,16	-	

VO : valeur observée.

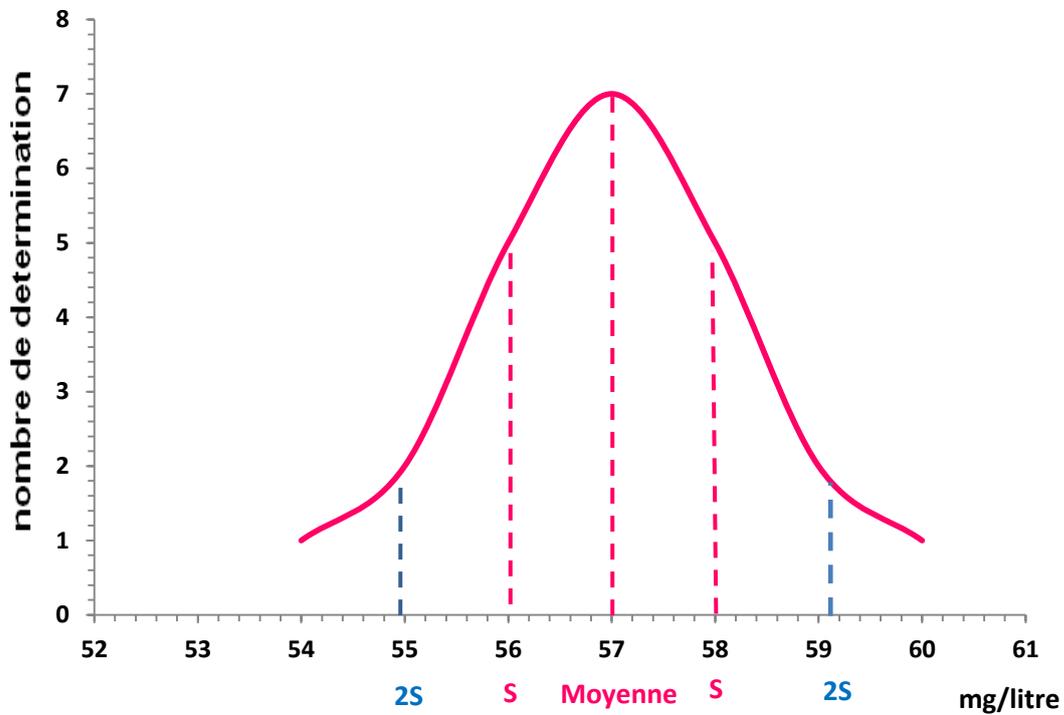
C : valeur cible du contrôle de référence.

Tableau8 : Représentation des moyennes, des écart-types, de la précision et de l'exactitude des deux techniques et des valeurs cibles du contrôle de référence.

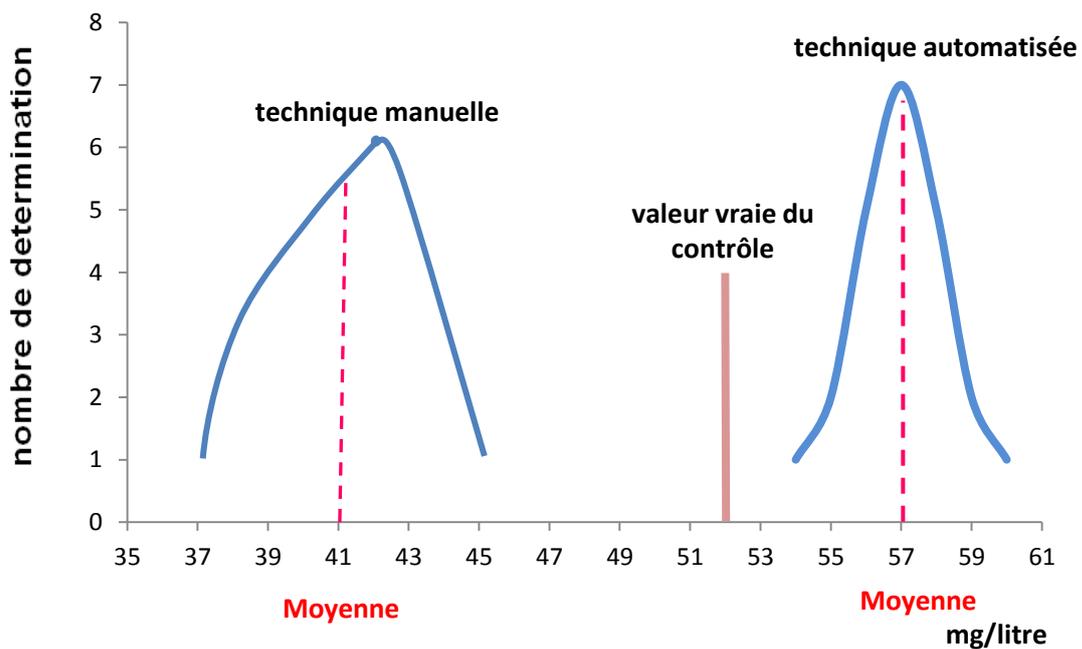
**B- Représentation des graphiques :**



**Graphique 5: Représentation graphique des valeurs du contrôle de la CRP par la méthode automatisée**



**Graphique 6: Représentation comparative des courbes des résultats de deux techniques par rapport à la valeur cible du contrôle de référence**



### III- Interprétation des données :

#### A- Validation des résultats :

Les résultats d'analyse du contrôle de référence de la CRP obtenus par les deux techniques montrent qu'ils sont compris entre 36,5 et 67,7 mg/litre. Ce qui implique que les deux méthodes d'analyse ne sont pas entachées d'erreurs aléatoires.

#### B- Evaluation de la précision et de l'exactitude :

Les deux courbes de Gauss relatives à chaque méthode montrent une distribution régulière de part et d'autre de leur moyenne respective. Cette dispersion est donc acceptable, ceci implique qu'on peut effectuer l'analyse des spécimens des patients par ces deux techniques qui seront déclarés techniquement valides.

Mais pour pouvoir mieux évaluer la fiabilité des deux techniques on procédera à l'étude comparative de la précision et de l'exactitude.

##### 1- Evaluation de la précision :

D'après les données de l'étude de la précision ;  $\Gamma$  de la méthode utilisant le spectrophotomètre est inférieure à celle de la technique automatisée. Ceci implique que la deuxième méthode est plus précise que la première.

##### 2- Evaluation de l'exactitude :

La moyenne (57 mg/l) de la technique utilisant l'automate s'approche de la moyenne du contrôle de référence (52,1 mg/l) plus que celle du spectrophotomètre (40.74 mg/l). Donc la première technique est plus exacte que la technique manuelle.

Si la technique utilisant l'automate est considérée comme la plus exacte, la technique manuelle sera inexacte par défaut.

### IV- Conclusion ;

La méthode automatisée est plus précise et exacte que la technique manuelle, en effet, la technologie et les composants de l'automate de biochimie permettent de minimiser les erreurs aussi bien aléatoires que systématiques contrairement à la technique manuelle qui fait intervenir plusieurs dispositifs moins performants et qui comportent eux même des erreurs de mesures qui se surajoutent (micropipettes, système d'aspiration, la lampe...).

## Bibliographie et webographie :

### Bibliographie :

- *Assessment of C-Reactive Protein in Risk Prediction for Cardiovascular Disease*, D Lloyd-Jones, K Liu, L Tian, P Greenland, *Ann Intern Med.* 2006;145:35-42.
- Chetana Veshnavi. *Immunology and Infectious Diseases* 1996; 6: 139-144.
- Dehghan A, Dupuis J, Barbalic M, *Meta-analysis of genome-wide association studies in >80 000 subjects identifies multiple loci for C - reactive protein levels*, *Circulation*, 2011; 123:731-738.
- Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACCC Press, 1977.
- Grange J, Roch AM, Quash GA. *Nephelometric assay of antigens and antibodies with latex particles.* *J Immunol Methods* 1977; 18: 365-375.
- Kari Pulki et al. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 606-607.
- Kelley-Hedgepeth A, Lloyd-Jones DM. Colvin A et al. SWAN Investigators, *Ethnic differences in C-reactive protein concentrations* , *Clin Chem*, 2008; 54:1027–1037.
- Kind mark C-O. *The concentration of C-reactive protein in sera from healthy individuals.* *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29: 407-411.
- Lars-Olof Chetana Hanson et al. *Current Opinion in Infect Diseases* 1997; 10: 196-201.

- Otsuji S, Shibata H, Umeda M. Turbidimetric immunoassay of serum C-reactive protein. *Clin Chem* 1982; 28: 2121-4.
- PIERRE METAIS, et al. BIOCHIMIE CLINIQUE, 1 BIOCHIMIE ANALYTIQUE. (SIMEP 12, rue de l'Eperon Paris Cedex06-1990-Paris. France).
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N et Als. *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*, *JAMA*, 2001; 286:327–334.
- Price CP, Trull AK, Berry D, Gorman EG. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein. *J Immunol Methods* 1987; 99: 201-211.
- Shogo Otsuji et al. *Clin Chem* 1982; 28/10: 2121-2124.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3<sup>rd</sup> edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co, 1999.
- Tillett W, Francis T, *Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus* , *J Exp Med*, 1930; 52:561–571.
- Volanakis JE, *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*, *Mol Immunol*, 2001; 38:189-197.
- Werner Muller et al. *Journal of Immunological Methods* 1985; 80: 77-90.
- Whitehead AS, Bruns GA, Markham AF et al. *Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1* , *Science*, 1983; 221:69–71.

- Yoshitsugy Hokama et al. Journal of Clinical Lab. Status 1987; 1: 15-27.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4<sup>th</sup> ed. AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
- Zacho J, Tybjærg-Hansen A, Skov Jensen J, Grande P, Sillesen H, Nordestgaard BG, *Genetically elevated C - reactive protein and ischemic vascular disease.*

#### Webographie :

- <http://ile-de-france.sante.gouv.fr/sante/gbea.pdf>
- <http://www.adneurope.com/index.php?id=241&L=0>
- [http://www.biodyssee.ch/website/index.php?option=com\\_content&view=article&id=58&Itemid=64](http://www.biodyssee.ch/website/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=64)
- [http://www.cermav.cnrs.fr/ANGD\\_qualite\\_en\\_chimie/Blanc\\_hin2.pdf](http://www.cermav.cnrs.fr/ANGD_qualite_en_chimie/Blanc_hin2.pdf)
- <http://www.labomediqua.ch/cq/ContrExt.htm>
- <http://www.labomediqua.ch/cq/ContrInt.htm>
- <http://www.labomediqua.ch/cq/QualCont.htm>

## Annexes:

➤ Tableau1 : Rendement des tests réalisés en 2011.....	6
➤ Tableau2 : Conservation et stabilité des échantillons pour la CRP.....	12
➤ Tableau3 : Etalonnage.....	14
➤ Tableau4 : Préparation des réactif.....	15
➤ Tableau5 : Programmation des paramètres de l'essai.....	18
➤ Graphique1 : Représentation d'une distribution.....	25
➤ Graphique2 : Reproduction de deux techniques.....	26
➤ Graphique3 : Représentation de la précision et de l'exactitude de deux techniques différentes.....	27
➤ Tableau6 : Représentation des résultats d'analyses réalisés par la méthode manuelle.....	30
➤ Tableau7 : Représentation des résultats d'analyses réalisés par la méthode automatisée.....	30
➤ Tableau8 : Représentation des moyennes, des écart-types, de la précision et de l'exactitude des deux techniques et des valeurs cibles du contrôle de référence.....	31
➤ Graphique4 : Représentation graphique des valeurs du contrôle de la CRP par la méthode manu.....	31
➤ Graphique5 : Représentation graphique des valeurs du contrôle de la CRP par la méthode automatisée.....	32
➤ Graphique6 : Représentation comparative des courbes des résultats de deux techniques par rapport à la valeur cible du contrôle de référence.....	32