UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé

Validation des résultats de l'immuno-dosage de la micro-albuminurie au sein du laboratoire des analyses médicales de l'Hôpital Ibn Al Khatib

Présenté par : FAHFOUHI OUAFAE

Encadré par :

Dr. BAROUDI AMINA
Pr. HALOTI SAID

Soutenu le : 14 Juin 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. HALOTI SAID : Président
- Dr. BAROUDI AMINA : Encadrant
- Pr. El ABIDA KAOUAKIB : Examinateur

Année Universitaire : 2012-2013

INTRODUCTION

Ce rapport est le fruit d'un stage de deux mois, effectué au laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Ibn Al Khatib à Fès, au service de biochimie. Ayant eu lieu du 08 Avril 2013 au 31 Mai 2013, dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude de la Licence en Biologie et Santé de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques-Fès.

Le thème retenu dans le cadre de ce stage est ***«Validation des résultats de l'immuno-dosage de la micro-albuminurie »***. Le choix de ce thème est en raison de l'intérêt de l'utilisation du contrôle de qualité interne dans la validation technique des résultats.

L'objectif de ce stage est d'étudier l'un des marqueurs de surveillance et de suivi de la néphropathie diabétique (complications diabétique): la micro-albuminurie, et de montrer la nécessité d'instaurer le contrôle de qualité dans son dosage pour délivrer au clinicien un résultat de qualité.

Dans une première partie, nous aborderons les généralités concernant le diabète, la définition de ce marqueur, les conditions pré-analytiques et les techniques requises pour son dosage, ainsi que son apport clinique dans le cadre du suivi et de la prise en charge du diabétique. Dans une seconde partie nous rapportons les résultats d'étude rétrospective concernant 11patients.

PARTIE THEORIQUE

1-Présentation de l'Hôpital Régional Ibn Al Khatib:

L'Hôpital Ibn Al Khatib de Fès est un hôpital général faisant partie des trois hôpitaux du Centre Hospitalier Régional de Fès-Boulemane.

C’est un établissement qui dessert la population de toute la région de Fès-Boulemane, estimée à 1.704.000 habitants en 2010.

La figure ci-dessous montre la situation géographique de l’Hôpital Ibn Al Khatib.

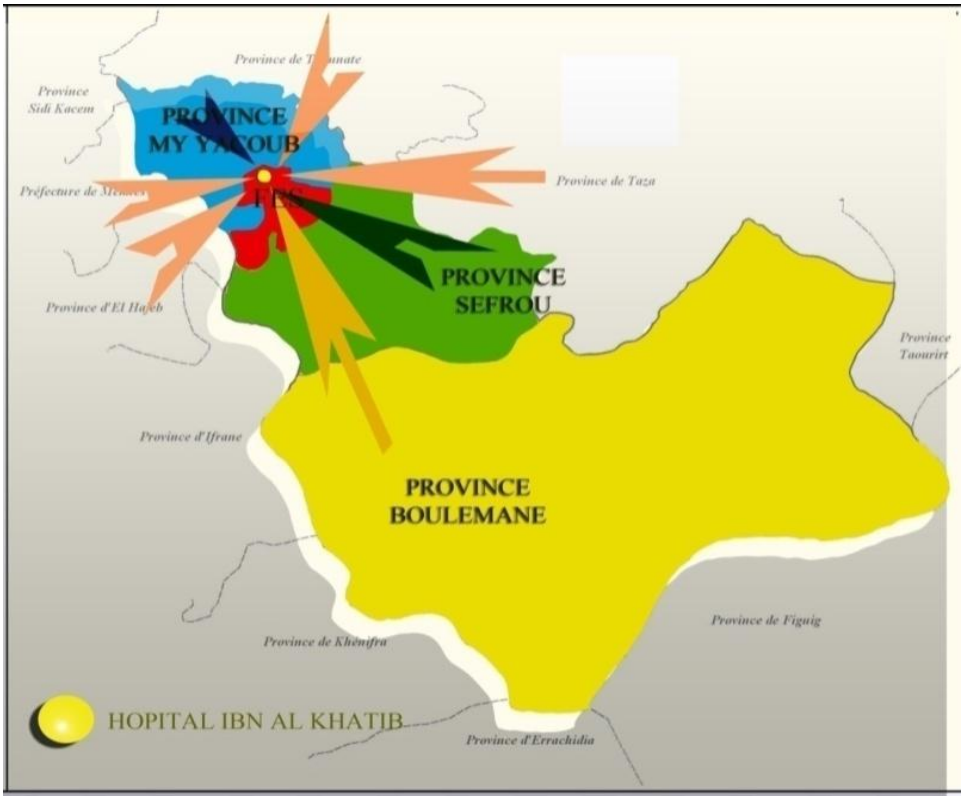

Figure 1 : La situation géographique de l’Hôpital Ibn Al Khatib.

2- Le Laboratoire de l’Hôpital Ibn Al Khatib:

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

2-1- Les locaux :

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

- Salle de biochimie, de sérologie et d’hémostase.
- Salle d’hématologie et d’immuno-hormonologie.
- Locaux destinés aux prélèvements des patients.
- Site d’accueil, d’orientation et de remise des résultats.
- Lieu de stockage des réactifs et matériels.

2-2- Le rendement :

Le laboratoire traite les prélèvements émanant :

* des services de soins multidisciplinaires

* du service des urgences, du centre des consultations externes,

Le laboratoire à une vocation régionale puisqu'il reçoit également les patients de la région de Fès-Boulemane et mêmedes régions limitrophes.

Le tableau ci-dessous montre le rendement en nombre de tests réalisés en 2012 selon les spécialités.

Tableau 1 : Rendement du laboratoire d'analyses médicales en tests effectués

	Nombre de test annuel	Rendement (%)
Biochimie	**90766**	**49%**
Hématologie	**85658**	**46%**
Séro-Immuno-Parasito et bactériologie	**8876**	**5%**
Total	**185300**	**100**

Le nombre d'examens effectués est d'environ 185300/an dont 90766 tests relatifs à la biochimie, soit 49%.Les tests de dosage de la micro-albuminurie n'en représentent que 1%.

3. Définition et généralité :

3-1. Diabète :

3-1-1.Définition :

Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Cela se traduit par un taux élevé de glucose dans le sang (encore appelé glycémie) : on parle d'hyperglycémie. (1)

D'après l'OMS (organisation mondiale de Santé), la prévalence du diabète chez l'adulte de plus de 20 ans était de 4% de la population mondiale en 1995 (environ 135 millions) et devrait atteindre 5,4% en 2025 (environ 300 millions).

Au Maroc, près de 6,6 % des personnes âgées de plus de 20 ans ont le diabète (OMS).

3-1-2.Classification :

Il existe différentes formes de diabète qui sont répertoriées, et que l'on distingue en fonction de leur étiologie.

A. Diabète primaire :

- **Diabète de type I :**

Le diabète de type 1 est un diabète de type sucré. Ce type de diabète est le plus souvent un diabète insulinodépendant (DID). C'est la cause la plus fréquente de diabète chez l'enfant, mais il peut survenir à tous les âges. (2)

- **Diabète de type II :**

Le diabète de type 2, ou diabète de la maturité, s'observe le plus souvent chez des individus en surpoids ou obèses. Ce type de pathologie est le plus souvent non-insulino dépendant (DNID), mais un traitement par insuline peut être nécessaire pour la maîtrise de l'équilibre glycémique. (2)

- **Diabète gestationnel :**

C'est un diabète qui apparaît pour la première fois chez certaines femmes au cours de la grossesse. Il est caractérisé par une intolérance au glucose due à la production d'hormones placentaires, provoquant une insulinorésistance qui entraîne une hyperglycémie. (2)

3-1-3-Physiopathologie :

En post prandiale, la glycémie peut augmenter légèrement, puis revenir à un taux normalsuite à une conversion du glucose en réserves et en énergie. Chez les personnes diabétiques, ce système ne fonctionne pas.

Selon le type de diabète, on note :

- **Diabète insulino-dépendant (DID) ou de type I :** Il est caractérisé par la destruction des cellules béta des îlots de Langerhans ce qui entraîne une incapacité de production de l'insuline par le pancréas, nécessaire au fonctionnement cellulaire, d'où une augmentation de sucre dans le sang.
- **Diabète non insulino-dépendant (DNID) ou de type II** : Dont la sécrétion d'insuline est normale mais peu active, c'est une incapacité de réponse de l'insuline souvent due à la surcharge pondérale et donc aux cellules adipeuses.

3-1-4-Evolution :

3-1-4-1-Complication du diabète :

a) Complications aiguës :

Les complications aiguës du diabète de type I sont parfois des malaises ou des comas par l'hyperglycémie et l'acidocétose, mais beaucoup plus souvent par hypoglycémie, dues respectivement à une insuline non injectée ou mal dosée. (3)

L'acidocétose survient quand l'organisme ne peut plus utiliser le glucose comme carburant (le sucre ne pénètre plus dans les cellules à cause de l'absence d'insuline). Les cellules s'attaquent alors aux graisses, provoquant leur dégradation anormalement massive en corps cétoniques toxiques pour l'organisme. Non traitée, l'acidocétose évolue vers le coma et la mort.

L'hypoglycémie, accident de loin le plus fréquent, elle peut aussi conduire au coma avec séquelles neurologiques irréversibles.

Le coma hyper-osmolaire, accident rare, survient surtout chez le sujet de plus de 60 ans à la suite d'une forte déshydratation lors d'infections. (6)

b) Complication chronique :

Pratiquement toutes les parties du corps peuvent subir les contrecoups d'un diabète mal contrôlé, comme:

- **Les micro-angiopathies**

Les micro-angiopathies concernent les vaisseaux de petits calibres avec épaississement membranaire. Le tissu et l'organe particulièrement atteints par cette anomalie sont la rétine et le rein. La rétinopathie diabétique non traitée évoluera vers la cécité, et la néphropathie diabétique, vers l'insuffisance rénale chronique et en particulier insuffisance glomérulaire.

- **Les macro-angiopathies :**Atteignent les grosses artères. Elles touchent essentiellement les artères coronaires ; cérébrales et celles des membres inférieurs.
- **Les neuropathies diabétiques :** Il s'agit de troubles sensitifs,troubles de la marche, perte de la sensibilité des doigts, douleur en éclair dans les membres inférieurs et hypoesthésie ou de troubles moteurs de type paralysies, troubles digestifs (retard de la digestion et diarrhée).
- **Troubles végétatifs :**Il s'agit d'hypotension orthostatique et de troubles génito-urinaires (vessie dilatée, incontinence, impuissance).

3-1-5-Diagnostic :

D'après les recommandations de l'OMS, le diagnostic repose sur les dosages suivants :

- Glycémie à jeun ≥ 1,26 g/L (à 2 reprises), seuil d'apparition de lamicro-angiopathie diabétique (rétinopathie).
- Glycémie aléatoire ≥ 2 g/L et signes cliniques d'hyperglycémie.

Il est à noter selon la même source que la glycémie à jeun normale est inférieure à 1,10 g/L.

La différenciation des diabètes de type I et II selon leurs caractéristiques propres est résumée dans le tableau 2

Tableau 2 : .Caractéristiques respectives des diabètes de type 1 et 2 (5)

	Type I	Type II
Antécédents familiaux du même type	**Rares**	**Fréquents**
Age de survenue	**Plutôt avant 35ans**	**Plutôt après 35ans**
Début	**Rapide ou explosif**	**Lent et insidieux**
Facteur déclenchant	**Souvent +**	**Souvent +**
Symptomatologie	**Bruyante**	**Pauvre ou absente**
Poids	**Normal ou maigre**	**Obésité ou surcharge**

Hyperglycémie au diagnostic	**Majeure > 3g/L**	**Souvent < 2g/L**
Cétose	**Souvent présente**	**Le plus souvent absente**
Complication dégénérative au moment du diagnostic	**Absente**	**Présente dans 50% des cas**
Cause principale de mortalité	**Insuffisance rénale**	**Maladie cardio-vasculaire**

3-2 Complication rénale :

- **Néphropathie diabétique(NPD) :**

Les vaisseaux des reins peuvent être atteints et provoquer une néphropathie, pouvant entrainer une insuffisance rénale. Vingt-cinq pourcent des diabétiques de type II, présentent une néphropathie diabétique.

Celle-ci n'entraine pas de manifestations cliniques au début de son apparition, la présence de protéines dans les urines permet le plus souvent le diagnostic lorsqu'aucune autre manifestation n'est décelée.

La néphropathie diabétique peut ensuite évoluer vers une insuffisance rénale : fatigue, infections urinaires, œdèmes des membres inférieurs, hypertension artérielle, polyurie.

Les études statistiques ont montré que 50 % des diabétiques insulinodépendants sont atteints d'insuffisance rénale chronique, d'où la nécessité d'un dépistage précoce et d'un suivi régulier de la NPD qui reposent sur le dosage de la micro-albuminurie. La présence d'une faible quantité d'albumine dans les urines (micro-albuminurie) est le premier signe d'une perméabilité anormale des reins. Sa recherche est essentielle et doit être réalisée au moins une fois par an. Décès en insuffisance rénale terminale : 20% des DID 5% des DNID ;

3-3- -Albumine :

L'albumine est la protéine la plus représentée dans le sang. Elle est fabriquée par le foie, mais est également apportée par certains aliments, notamment le lait et l'œuf.

L'albumine joue un ensemble de rôles qui la rendent indispensable à l'organisme. Elle est en effet nécessaire, entre autre, à la bonne répartition des liquides entre les différentes structures que sont les vaisseaux, les tissus et l'espace qui les sépare, appelé milieu interstitiel.

Par ailleurs, elle véhicule un certain nombre d'hormones, des acides gras, et la bilirubine.

Dans le sang, le taux d'albumine normal, aussi appelé albuminémie, se situe entre 38 et 48 g/l.

Elle est abaissée en cas de dénutrition ou fuite des protéines dans les urines (protéinurie), qui est le cas du syndrome néphrotique,maladie rénale.

3-4- Albuminurie ou protéinurie :

3-4-1-Définition :

Une protéinurie est la présence de protéines dans l'urine, qu'elle soit physiologique ou pathologique. Elle est quantifiée en mg par 24h. On parle parfois d'albuminurie puisque l'albumine étant la protéine la plus présente quantitativement.

3-4-2-Physiopathologie :

On distingue trois grands types de protéinurie, à savoir :

a) **Protéinurie glomérulaire :** C'est le passage de protéines, principalement d'albumine, au travers d'une barrière glomérulaire lésée, dont la fonction normale est précisément d'en empêcher le passage. C'est la protéinurie du syndrome néphrotique, de la glomérulonéphriteet du diabète sucré.Lorsque la protéinurie est trop sévère, elle entraîne une hypo-protéinémie généralisée. Cela se traduit par une baisse de la pression oncotique vasculaire entraînant la fuite de sodium et d'eau, du sang vers le secteur interstitiel.

b) **Protéinurie tubulaire :**Elle consiste en une déficience de la réabsorption de protéines au niveau du tubule rénal.

c) **Protéinurie orthostatique :** Elle est présente surtout chez la personne jeune, la protéinurie ne survenant alors que lors d'une position debout prolongée. Le diagnostic est suspecté lorsque la protéinurie du matin (urines de la nuit) est très sensiblement inférieure à celle mesurée sur un échantillon prélevé le soir.

3-4-3-Complication :

Lorsque la protéinurie devient chronique, elle se complique parfois d'une hypertension artérielle, et d'une insuffisance rénale chronique. La présence d'une protéinurie est statistiquement associée avec un risque de mortalité plus élevée.

3-5- Micro-albuminurie (µalb) :

Elle est définie comme la présence d'albumine dans les urines, comprise entre 30 à 300 mg par 24 heures.

3-5-1-Physiopathologie :

La barrière de filtration glomérulaire est constituée de trois éléments disposés en continu : l'endothélium fenestré tapissé de son glycocalyx (protéoglycanes, sialoprotéines chargées négativement), la membrane basale et le diaphragme de fente qui relie les pédicelles.

Cet ensemble fonctionne comme une barrière très sélective, elle sélectionne les molécules selon leur taille et leur charge. Les molécules de poids moléculaire élevé et celles chargées négativement sont repoussées par la première barrière (glycocalyx). Une modification, même subtile, du glycocalyx peut être observée au cours du diabète, elle pourrait favoriser la filtration de protéines(4).

Le diaphragme de fente qui relie les podocytes est une barrière complexe, très solide, composée de nombreuses molécules dont l'agencement permet la constitution d'une barrière efficace et adhérente à la membrane basale. Au cours du diabète, il a été observé une diminution du nombre de podocytes qui est d'autant plus importante que la protéinurie est élevée.

Les cellules endothéliales s'enrichissent en glucose ce qui entraîne une production mitochondriale accrue de radicaux libres d'oxygène favorisant la génération de produits avancés de la glycosylation (5). Ces cellules sont fragilisées et deviennent plus sensibles à l'élévation de la pression artérielle. Des lésions de l'endothélium mais aussi de l'ensemble des éléments constitutifs de la barrière se développent, entraînant une augmentation de la filtration de l'albumine et d'autres protéines.

Aussi, une lésion des cellules tubulaires provoque une diminution de la réabsorption d'albumine d'où albuminurie supérieur à la normale.

3-5-2-Intérêt du dosage de la micro-albuminurie :

La micro-albuminurie constitue à la fois un indicateur diagnostic, de suivi thérapeutique et pronostic dans le diabète.C'est un facteur important dans la surveillance de la fonction rénale. Il est important de dépister précocement une micro-albuminurie, qui a une valeur prédictive de la survenue de lésions micro-angiopathies responsables de la néphropathie diabétique

L'existence d'une albuminurie pathologique doit modifie la façon dont le patient doit être pris en charge, suivi et traité.

L'albuminurie doit être mesurée dans des conditions strictes de prélèvement, au moins à deux reprises à visée diagnostic. Son dosage actuel est bien standardisé. Il fait appel à des techniques très sophistiquées, rapides et fiables.

3-6.Contrôlequalité (CQ):

C'est l'ensemble des procédures de vérification visant à garantir la fiabilité d'une méthode et la bonne qualité des différentes analyses biologiques en incluant une décision d'acceptation ou de rejet. Dans le cadre de mon stage nous s'intéressons en contrôle de qualité au sein du laboratoire de HIK (QCI).(11)

- **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. Il s'agit d'un contrôle de calibrage et de reproductibilité.

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

- **Paramètres du contrôle de qualité interne :**

a) **Matériel d'essai :** Matériel ou substance sur lequel peut être appliqué un mesurage. exemple : urine sang...

b) **Analyte** : C'est l'objet de la méthode d'analyse, exemple : micro-albuminurie, glucose….

c) **Mesurage** : C'est l'ensemble d'opérations ayant pour but de déterminer une résulta. Le déroulement des opérations peut être automatique ou fait manuellement.

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

e) **Substance de référence (étalon ou contrôle)** : C'est une Substance dont une ou des propriétés ont été suffisamment définies pour servir :

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

f) **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 :***Sont des sérums dont les résultats sont obtenus par comparaison aux étalons primaires.

g) **Contrôle** : Est constitué d'échantillons contenant une quantité défini de la ou des substances à dosées. 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.

h) **Blanc** : C'est la mesure de l'absorbance du réactif en absence d analytre.

i) **Techniques** :Ce sont les détails opératoires et les procédés utilisés.

j) **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 méthode est dénommé méthodologie.

k) **La précision analytique :** La précision donne une idée sur la qualité de l'accord entre des mesures : Répétées, effectuées sur un même échantillon, et réalisées dans des conditions déterminées et constantes.

l) **Les erreurs :** Plusieurs facteurs sont à contrôler pour éviter de rendre des analyses contenants 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 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.

m) **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 mesure 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 meilleur précision.

n) **la *valeur vraie d'une grandeur :*** C'est une valeur qu'on obtiendrait par un mesurage parfait. Les valeurs des solutions simples peuvent être considérée 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

o) **la valeur cible ou de référence acceptée:**C'est la valeur qui sert de référence agrée 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.

p) **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.

q) **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.

➢ détermination réalisées à des dates différentes.

➢ résultats obtenus par différents analystes.

➢ utilisation de matériel différent.

r) **Validation technique :** La validation technique comporte la vérification de la conformité des conditions d'exécution aux procédures et tient compte notamment des résultats obtenus avec leséchantillons de contrôle. (12)

s) **Validation biologique :** La validation biologique est le contrôle de la vraisemblance 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. (12)

t) **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.

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

- ***Calcul des indices***

Soit une série de N mesures qui ont fourni des valeurs xi (x1, x2, x3, xN).

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

L'écart d'une mesure xi par rapport à la moyenne x = xi – moyenne x.

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

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

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

Il représente donc la dispersion des résultats.

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

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

- ***Courbe de Gauss (l'écart type relatif ou par le CV) :***

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. (7)

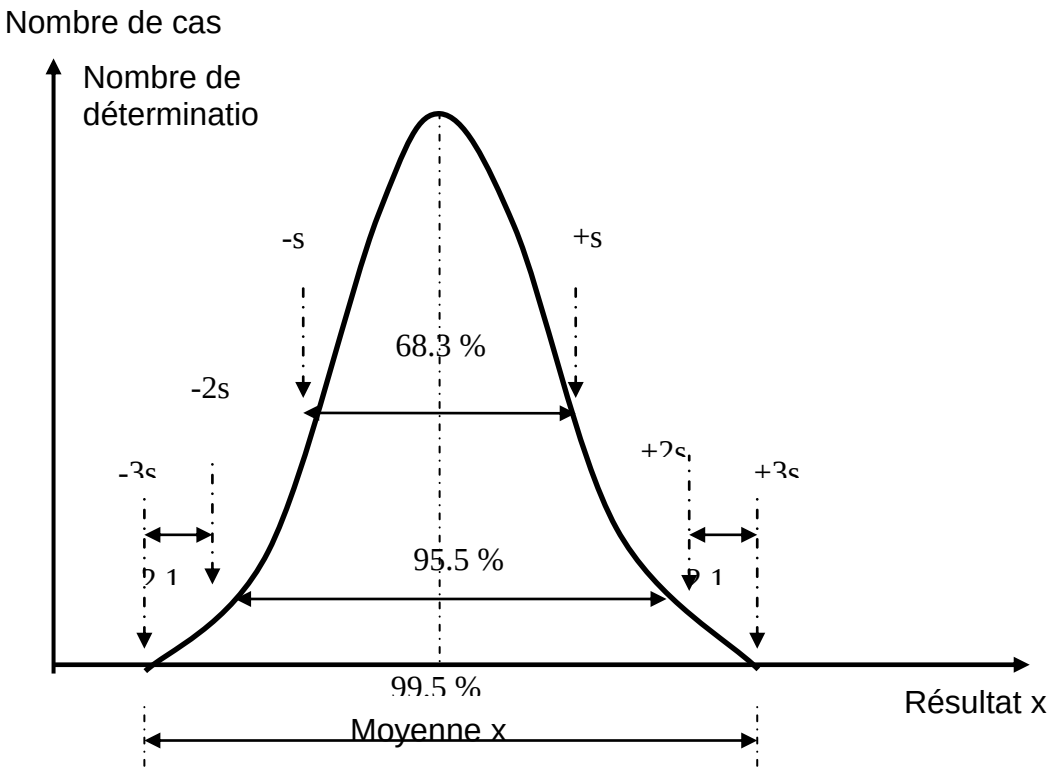

Figure2: Représentation d'une distribution :

- ***L'intervalle de confiance et de risque :***

Quand 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 - 1,96 s) (Intervalle symétrique par rapport à la moyenne)

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

PARTIE PRATIQUE

Le stage s'est déroulé sur deux mois, au laboratoire du HIK précisément au service de biochimie. Les premières semaines de mon stage ont été consacrées à la bibliographique relative à mon sujet de fin d'étude, les autres semaines ont été consacrées à la réalisation de la partie pratique de mon sujet.

Durant les premières semaines ; j'ai pris connaissance de la méthodologie du travail du laboratoire, depuis l'étape pré-analytique jusqu'à l'étape post-analytique en passant par l'analytique. En plus, j'ai préparé la documentation relative au thème choisi du projet de fin de stage.

En deuxième lieu, je me suis consacrée à la réalisation du thème concernant la validation des résultats du dosage de la micro-albuminurie par turbidimétrie d'une série de prélèvements urinaires.

Notre étude repose sur l'analyse d'une série de prélèvements urinaires et la validation technique des résultats. Les données nécessaires à l'étude sont recueillies au fur et à masure du déroulement du processus de la prise en charge des prélèvements, pour mieux les interpréter et analyser on n'a eu recours à leur traitement sous forme de tableau et de graphiques.

1. Matériel et méthodes :

1-1. Matériel :

1-1-1. Échantillons des urines :

Nous avons collecté 11 échantillons urinaires de 24hdes différents services hospitaliers ainsi que ceux des malades externes (non hospitalisés).

Pour cela nous avons utilisé :matériel pour le recueil des urines, tubes propres, et gants à usage unique.

1-1-2. Les bandelettes urinaires pour la recherche des protéinuries :

Pour la recherche de protéinurie nous avons utilisé comme matériel bandelettes urinaires réactives, réglette d'échelles colorimétriques et le réactif utilisé étant le bleu tetrabromothymolphenol 0.34 mg. (13)

1-1-3. Automate de dosage :

Pour effectuer cette analyse nous avons utilisé l'automate de biochimie*A25*pour *Diagnostic In Vitro* à accès aléatoire spécialement conçu pour réaliser des analyses cliniques de biochimie et turbidimétrie. Le contrôle de l'appareil se fait *on-line* en temps réel à partir d'un ordinateur PC externe. L'automate réalise

les analyses des échantillons, permet l'introduction continue des échantillons. Les résultats sont obtenus au bout de 3 à 4 min. (10)

La figure ci-dessous présente l'automate A25.

Figure 3 : l'automate A25

1-2. Méthode :

a) Protocole du recueil des urines:

Au lever, vider la vessie dans les toilettes, noter sur le flacon : Nom, Prénom, date et heure de départ du recueil, pendant 24 heures recueillir **la totalité** des urines dans le flacon jusqu'à l'heure indiquée au départ et les conserver si possible au réfrigérateur (2 à 8°C). La première miction du second matin doit impérativement être recueillie. La totalité des urines de 24 heures doit être acheminé au laboratoire dans lesplus brefs délais (maximum 2 heures après la fin du recueil).

b) Collecte des échantillons urinaires des patients :

Avant de procéder au traitement et à l'analyse des prélèvements, des conditions d'hygiène sont rigoureusement respectées : le port d'une blouse, les gants (immédiatement après le lavage et le séchage des mains), aussi les paillasses doivent être dégagées et propres pour gérer l'espace du travail.

D'abord il faut vérifié la conformité des prélèvements, en s'assurant l'identité du patient, la nature du prélèvement, la concordance des renseignements figurant sur le tube de prélèvement et sur le bon de demande d'examen correspondant, la date du prélèvement, la diurèse etc… Cette vérification est très importante pour éviter les erreurs grossières.

Les tubes sont ensuite centrifugés, aliquotés dans des tubes propres et hermétiques. Chaque tube est identifié : il porte rigoureusement le nom, le prénom et

la référence du patient correspondant. Les aliquotes qui ne sont pas analysés sont conservés dans le réfrigérateur (2 à 8 °C), pour une durée qui ne doit pas dépasser 7 jours.

c) Recherche des protéines dans les urines par la bandelette urinaire :

La recherche des protéines se faite sur les urines de 24 h, elle est réalisée par les bandelettes réactives, c'est une méthode d'analyse biologique colorimétrique des urines qui sont mises en contact avec de réactifs spécifiques.

L'examen se fait par immersion de bandelettes réactives dans un échantillon d'urine, La coloration passe du jaune au vert puis bleu en fonction de la concentration des protéines, la coloration donnée est ensuite comparer à une échelle colorimétriques.

La méthode est très sensible, permettant de détecter une protéinurie autour de 100 mg/l, des traces de protéines peuvent être détectées quand la concentration est inférieure à 100 mg/l. dans ce cas-là il faut faire le dosage par une méthode plus sensible.

d) Contrôle de qualité interne:

Le CQI consiste au traitement du contrôle urinaire dans les mêmes conditions que celles de l'analyse des échantillons des patients. Les valeurs cibles ; dites référence ; sont déjà connues ; elles figurent sur le prospectus qui accompagne le contrôle urinaire. Les données observées seront donc recueillies et comparées aux valeurs de référence (13).Il est déroulé en trois étapes :

- ***Etape préopératoire :***

Cette étape comporte :

- ***La réalisation de l'étalonnage :***

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

- ***Le choixde l'urine contrôle :***

Le contrôle utilisé est une urine humaine de commerce, dont les valeurs cibles sont comprises entre 42 et 63 mg/l (MT± 2s).

- **Le graphique de contrôle :**

Nous avons tracé le graphique de contrôle de telle façon qu'il comporte deux lignes parallèles distantes de 2s de la moyenne.

- **Etape opératoire :**

L'urine de contrôle est traitée dans les mêmes conditions que les échantillons en Introduisant un échantillon de contrôle dans chaque série de dosage.

En pratique, on a effectué 04 analyses de l'urine de contrôle successives le premier jour, dans des conditions de répétabilité, puis quotidiennement, pendant cinq jours (conditions de reproductibilité).

- **Contrôle proprement dit:**

Par la suite, on inscrit journellement sur ce graphique les résultats observés du contrôle utilisé: Cette inscription va servir :

a. à surveiller les appareils et le matériel.

b. à déceler ainsi une erreur systématique ou aléatoire.

c. et à connaître à tout moment l'imprécision.

e) Analyse par automate A25 :

L'analyse consiste en un dosage de la micro-albuminurie par une technique immuno- turbidémitrique de manière automatique grâce à l'automate A25. La variation de la turbidité est inversement proportionnelle à la quantité de la micro-albumine qui est mesurée à 340 nm.

L'albumine présente dans l'échantillon d'urine provoque l'agglutination de particules de latex couvertes (réactif) avec les anticorps anti-albumine humaine. L'agglutination des particules de latex est proportionnelle à la concentration en albumine. (14)

Nous avons procède tout d'abord à l'étalonnage de l'appareil suivi de l'analyse du contrôle pour vérifier la qualité de la courbe d'étalonnage et en fin on passe la série d'échantillons urinaires des patients, Les urines des patients recueillies par des procédures standards sont préalablement centrifugées avant de réaliser l'essai. L'albumine dans l'urine est stable 7 jours à 2-8°C.

- **Préparation des réactifs :**

La préparation des réactifs se fait selon procédure suivante : (8)

- Le réactif de travail : Vider le contenu d'un tube de réactif B dans un flacon de réactif A. Homogénéiser. Stable 15 jours à 2-8°C.
- Etalon de l'albumine(S) : Reconstituer le lyophilisat avec 1ml d'eau distillée. Stable 1 mois à 2-8°C.
- Contrôle urinaire humaine: Reconstituer le lyophilisat avec 20 ml d'eau distillée, stable 5 jours à 2-8°C.

- **Procédure de l'analyse :**

- Programmation de l'automate :

Les paramètres de l'essai doivent être programmés aux préalables ; en suivants les données figurant sur le tableau ci-dessous (9) :

Tableau 3 : Programmation des paramètres de l'essai

Général	Technique	ALBUMIN/MICROALB.
	Mode d'analyse	Fixed time mono
	Type d'échantillon	Urine
	Unités	Mg/l
	Type de réaction	Croissante
	Technique de turbidimétrie	Oui
	Décimales	0
	N° Réplique	1
	Nom de la technique dans le rapport de patient	--
Procédure	Lecture	Monochromatique
Volume	Echantillon	3
	Réactif 1	420
	Réactif 2	--
	Lavage	1.2
	Facteur prédilution	--
	Facteur postdilution	1.4
Filtre	Principal	535
	Référence	--
Temps	Lecture 1	30 s
	Lecture 2	165 s
	Réactif 2	--
Calibration	Type de calibration	Specific
	N° calibreurs	1
	Réplique calibreur	3
	Réplique blanc	3
	Courbe calibration	--
Options	Limite absorbance blanc	1.2
	Limite blanc cinétique	
	Limite de linéarité	--

- **Théorie de fonctionnement de l'analyseur**

a) -Vérifier que :

- le conteneur de déchets est vide et l'accord rapide dument connecté.
- Le conteneur du liquide de système ainsi que la solution de lavage sont pleins.
- Le rotor de réactions se trouve correctement installé.

b) - Pour mettre en route l'analyseur, celui-ci doit se trouver en mode repos (*Sleeping*), c'est-à-dire, branché au réseau électrique et avec l'interrupteur postérieur sur la position (I)

c) -Allumer l'ordinateur et accéder au logiciel d'usage.

d) -Cliquer sur le bouton « Warm Up » pour allumer et démarrer l'analyseur, et pour commencer l'initialisation

e) - Une fois que l'initialisation a terminé, saisir si besoin le code du patient et ajouter l'échantillon à la liste d'échantillon en cliquant sur le bouton ajouter.

f) -Cliquer sur le bouton « Positionner » pour positionner l'échantillon.

g) -Une fois que la session de travail a été préparée depuis les écrans correspondants, l'analyseur commence à réaliser les analyses en cliquant sur le bouton « *Start* ».

h) - Lorsqu'il commence les analyses, l'automate se place en mode travail (*Running*).

i) - Lorsque les analyses sont terminées, l'analyseur revient automatiquement au mode attente.

j) -Visualiser et imprimer les résultats à partir de l'écran.

k) -Eteindre l'analyseur en cliquant sur le bouton « Shut Down ».

l) -Vider le conteneur de déchets, lorsque l'analyseur est éteint.

RESULTATS

&

INTERPRETATION

1. Présentation et analyse des résultats :

Les résultats des différentes analyses des urines sont représentés sous forme de tableaux et de graphiques :

1-1. Répartition des échantillons selon l'origine des prélèvements :

La répartition des échantillons selon l'origine du prélèvement; figurent sur le tableau N°4.

Tableau 4 : Représentation des références des échantillons à analyser

Origine	Service hospitalier	Externe	Total
Total des échantillons	**6**	**5**	**11**
Pourcentage (%)	**54,5**	**45,5**	**100**

A partir de ce tableau nous avons tracé le graphe ci-dessous

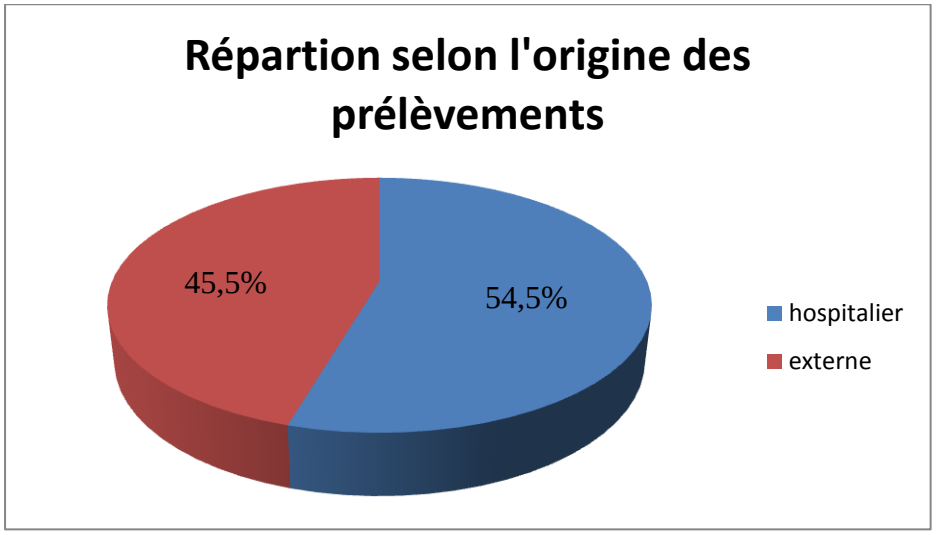

Figure 3 : Répartition selon l'origine des prélèvements.

La moitié (54.5 %) des prélèvements urinaires émanent des services hospitaliers, et particulièrement de la Médecine générale.

1-2. Répartition selon la mention de renseignement clinique (RC):

La Répartition selon la présence ou non des RC mentionnés sur le bon de demande d'examen ou bien sur l'ordonnance figure dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Répartition selon la mention de RC

Renseignement clinique	Oui	Non	Total
Total des échantillons	7	4	11
Pourcentage (%)	63	47	100

A partir de ce tableau nous avons tracé le graphe ci-dessous

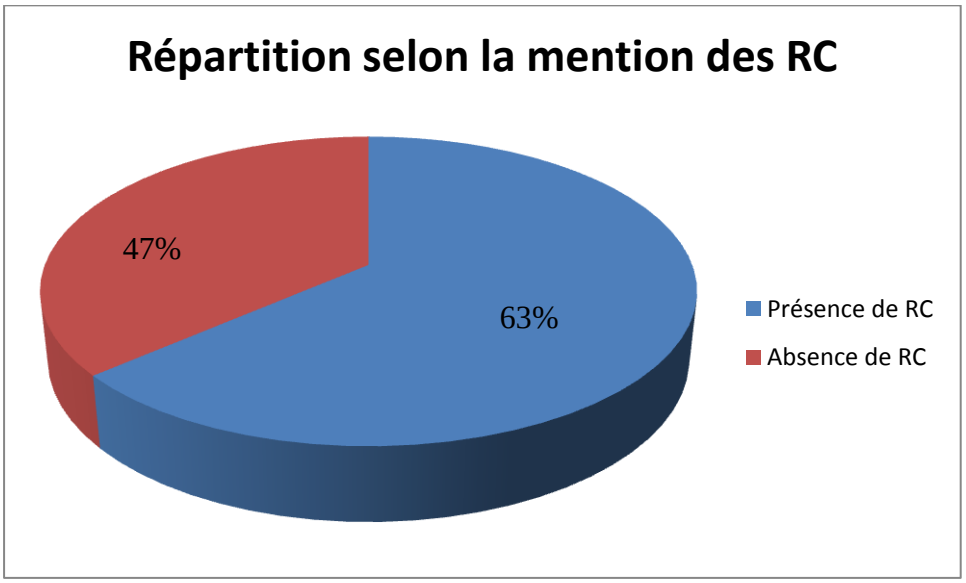

Figure 4 : Répartition selon la mention de RC

La majorité des prélèvements sont accompagnés des RC.

1-3. Répartition selon la conformité des prélèvements :

La Répartition selon la conformité des prélèvements figure dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Représentation de la conformité des échantillons à analyser

La conformité	Conforme	Total

	Oui	Non	
Total des échantillons	**11**	**0**	**11**
Pourcentage (%)	**100**	**0**	**100**

A partir de ce tableau nous avons tracé le graphe ci-dessous

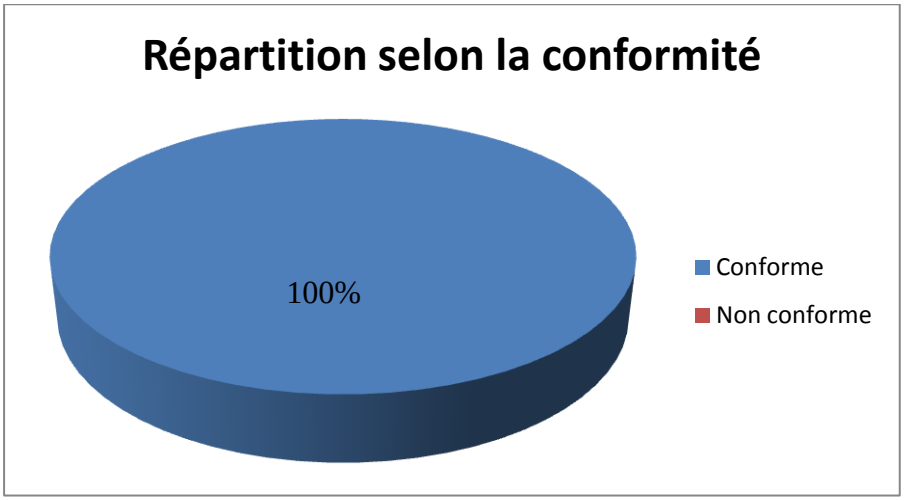

Figure5: Représentation de la conformité des échantillons à analyser

Nous n'a noté aucun vis de conformité, tous les prélèvements reçus respectent les bonnes pratiques du recueil des urines.

2. La recherche des protéinuries :

Je rappelle que la valeur normale de la protéinurie se situe entre 0,04 et 0,23 g/24, à partir de 0,25g/24h, on envisage une protéinurie clinique et à partir de 0.3g/24h, on évoque une atteinte rénale.

Après la réalisation de ce test, j'enregistrel'identité du patient ; sa référence et l'origine du prélèvement, ainsi que les résultats.de l'analyse sur le registre des archives et sur le bon du patient.

Les résultats obtenus de la recherche de la protéinurie urinaire figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : résultats de la recherche de la protéine urinaire.

N° d'ech.	Origine	Négative	trace	Positive
1	**Hospitalisé**		**Oui**	

2	Hospitalisé	Oui		
3	Hospitalisé		Oui	
4	Hospitalisé	Oui		
5	Hospitalisé	Oui		
6	Externe	Oui		
7	Hospitalisé			Oui
8	Externe	Oui		
9	Externe	Oui		
10	Externe	Oui		
11	Externe			Oui
Total	11	08	02	02

3. Résultat relatives au CQI :

a) -Conditions de répétabilité :

Les résultats de dosage de la micro-albuminurie dans les échantillons de contrôle par l'automate selon les conditions de répétabilité, figurent sur le tableau suivant:

Tableau8 : présentation des résultats de dosage du contrôle de la micro-albuminurie par l'automate dans les conditions de répétabilités

Date	Concentrations (mg/l)	Les valeurs cibles du contrôle urinaire
03/05/2013	51	42 – 63 mg/l
03/05/2013	50	
03/05/2013	52	
03/05/2013	51	

D'après ce tableau, toutes les valeurs du contrôle retrouvées sont comprises dans l'intervalle des valeurs cibles du contrôle urinaires. On fait également remarqué que la dispersion des valeurs est acceptable:

b) -Conditions de reproductibilité :

Les résultats de dosage de la micro-albuminurie dans les échantillons de contrôle par l'automate selon les conditions de rproductibilité, figurent sur le tableau suivant:

Tableau 9 : Présentation des résultats de dosage du contrôle urinaire réalisé par l'automate dans des conditions de reproductibilité

Date	Concentrations (mg/l)
03/05/2013	51
04/05/2013	49
06/05/2013	47
07/05/2013	50
08/05/2013	50

Afin de tracer le graphique de contrôle nous avons Calculé la moyenne etl'écart type :

- ✓ **La moyenne X =** $\frac{\sum X}{N}$

⇒ La moyenne X = $\frac{51+49+47+50+50}{5}$

⇒ La moyenne X = 49,5

- ✓ **L'écart type δ =** $\frac{\sum(xi-moyennex)^2}{N}$

⇒ l'écart type S =1,84

⇒ 2S =3,68

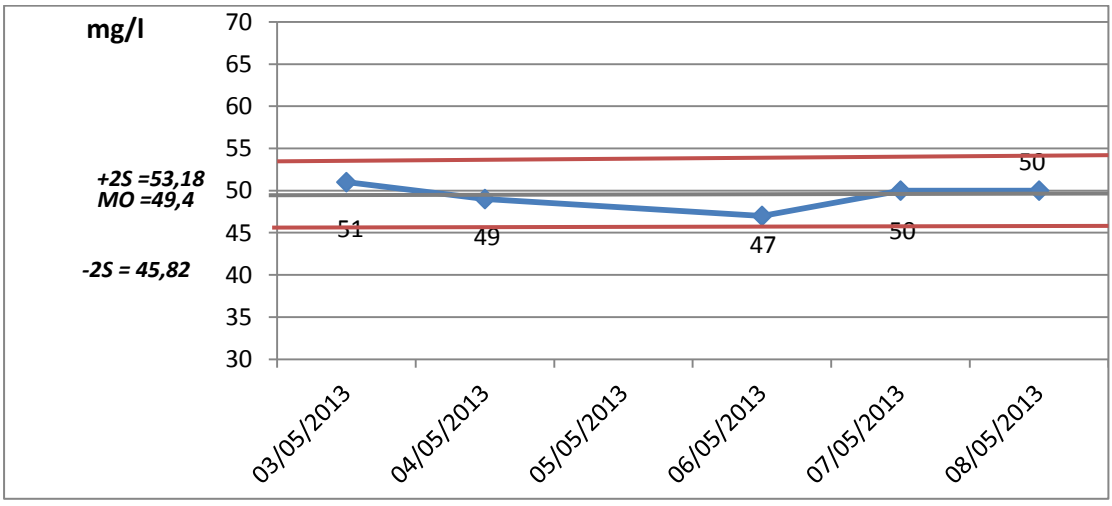

Figure 6 : Représentation des résultats journaliers de contrôle de qualité

On note que tous les résultats de contrôle sont compris dans l'intervalle MO ± 2S, c'est à dire entre 49,4 ± 3,68 mg/l ; et sont régulièrement dispersées de part et d'autre de la moyenne observée.

3. Résultats du dosage par A25 :

La micro-albuminurie peut être définie en fonction de son excrétion quotidienne (30 – 300 mg/j), des variations physiologiques sont observées surtout avec l'exercice physique, pour affirmer le caractère permanent d´une micro-albuminurie il est important de répéter les mesures dans des conditions identiques de prélèvement et par la même méthode de dosage.

- Les valeurs physiologiques de la micro-albuminuriesont inférieures à 30 mg/24 h. au-delà de cette valeur ;le résultat est considéré pathologique

La limite de linéarité étant de 130 mg/l. Quand des valeurs sont supérieures à cette limites ; il faut diluer l'échantillon au 1/3 avec de l'eau distillée et répéter la mesure. Le résultat sera multiplié par le facteur de dilution.

Les résultats de dosage de la micro-albuminurie par l'automate, figurent sur le tableau suivant:

Tableau 10 : résultats de dosage de la micro-albuminurie.

N° d'ech.	*Origine*	*Concentration moyenne mg/l*
1	*Hospitalisé*	*38*
2	*Hospitalisé*	*4*
3	*Hospitalisé*	*41*
4	*Hospitalisé*	*8*
5	*Hospitalisé*	*5*
6	*Externe*	*9*

7	*Hospitalisé*	*103*
8	*Externe*	*8*
9	*Externe*	*1*
10	*Externe*	*6*
11	*Externe*	*101*

4. Etude comparative entre le résultat de la recherche des protéinuries et le dosage de la micro-albuminurie:

Le tableau ci-dessous montre les résultats de la recherche des protéines par la méthode des bandelettes urinaires et le dosage de la micro-albuminurie.

Tableau 12 : Résultats de la recherche des protéines et du dosage de la micro-albuminurie.

Technique	Recherche de la protéinurie			Dosage de la micro-albuminurie	Concordance des résultats	
N° d'ech.	Négative	trace	Positive	Concentration	Oui	Non

				moyenne mg/l		
1		Oui		38	Oui	
2	Oui			4	Oui	
3		Oui		41	Oui	
4	Oui			8	Oui	
5	Oui			5	Oui	
6	Oui			9	Oui	
7			Oui	103	Oui	
8	Oui			8	Oui	
9	Oui			1	Oui	
10	Oui			6	Oui	
11			Oui	101	Oui	
Nombre					100	0
Pourcentage (%)					100	0

On signale qu'il existe une concordance entre les résultats de la recherche manuelle et le dosage par l'automate. Les cas douteux par la recherche manuelle ont donnés des résultats positive par la technique automatisée c'est le cas des échantillons 1 et 3 ; témoignant de grande sensibilité de dosage de la microalbuminurie par turbidimétrie.

DISCUSSION

La fiabilité d'un résultat ne dépend pas uniquement du dosage mais également des conditions par lesquelles passe l'échantillon depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'au rendu des résultats.

D'après les données recueillies lors de notre période de stage depuis l'étape pré-analytiques, on dit que :

- Etant donné que tous les prélèvements urinaires des patients sont conformes, ce qui implique que ces prélèvements ont été réalisés selon les normes de prélèvements et qu'ils peuvent être analysés.
- Les résultats obtenus suite à l'analyse de l'urine de contrôle, introduite dans la série des urines des patients, sont compris dans l'intervalle des valeurs de référence. La série d'analyse des échantillons des malades est donc déclarée valide (validation technique), il reste alors à ce qu'ils soient validésbiologiquement (par le biologiste).

- D’après les données du contrôle relatives aux conditions de répétabilité et de reproductibilité, on peut direque la méthode de dosage employéepar l’automate est de qualité, en matière de précision ; c’est-à-dire que le matériel fonctionne normalement; les réactifs sont bien conservéset bien reconstitués ; et que la façon de travailler est correcte. Donc la méthode est dite sous contrôle.

Avant le rendu des résultats signés, le biologiste doit assurer la validation biologique. Différents outils sont nécessaires pour la réalisation de cette validation. Parmi ceux-ci, la connaissance

- des bornes dites de normalité ou de référence
- du ou des résultats antérieurs
- de la corrélation inter-analyses
- de la statue clinique du patient, de son âge et du sexe
- l’unité de soin dans laquelle il est hospitalisé

Latâche du biologiste rencontre certaines contraintes du moment que les RC et l’âge, ne figurent pas sur le bon d’examen émanant des services hospitaliers ni sur l’ordonnance ramenée par le malade externe.

Conclusion

Le diabète grave de par ses complications métaboliques et dégénératives. Parmi ces complications, l'atteinte rénale conditionne le pronostic vital du diabétique. Elle aboutit a plus au moins brève échéance à la défaillance de la fonction rénale et nécessite un traitement de substitution par dialyse itérative, relai difficile et couteux. Or, plusieurs études ont prouvé que la micro-albuminurie, définie par un taux d'excrétion urinaire d'albumine>30 et <300 mg/24h avait un intérêt prédictif de néphropathie débutante chez les diabétiques.

Cet outil biologique reste donc jusqu'à l'heure actuel parmi les paramètres qui permettent de retarder ou mieux minimiser cette atteinte il est donc impératif de le connaitre, de le faire pour tous ces malades d'améliorer leur pronostic fonctionnel et

vital, d’où la nécessité d’instaurer le contrôle de qualité dans son dosage pour délivrer au clinicien un résultat de qualité.

BIBLIOGRAPHIE&

WEBOGRAPHI

❖ Bibliographe :

(5) : Brownlee M. Biochemestry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001 ; 414 : 813-20.

(7) : PIERRE NETALE, JEAN AGNERY, JEAN CLAUDE JARDILLIER, ANDRE REVOL, ANDRE REVOL, ANDRE STAHL. Biochimie clinique.

(8) : Bernard A, Lauwerys R. Latex immunoassay of urinary albumin. J Clin Chem Clin Biochem 1983, 21(1) :25-30.

(9) : Harmoinen A, Ala-Houhala I, Vuorinen P. Rapid and sensitive immunoassay for albumin determination in urine. Clin Chim Acta 1995 15,149(2-3) :269_74.

(10) : C:\Users\hp\Desktop\AUTOMATE BIOCHIMIE A25.htm.

(11) : C:\Users\hp\Desktop\Contrôle qualité.htm.

(12) : C:\Users\hp\Desktop\ADN Validation des Méthodes Analytiques.htm.

(13) : NCCLS GP 16-A/ROUTINE URINALYSIS AND COLLECTION TRANSPORATION AND PRESEVATION OF URINE SPECIMENS, TRNTATIVE GUIDELINE VOL 12-NO 26, EC. 1992.

(14) : C:\Users\hp\Desktop\AUTOMATE BIOCHIMIE A25.htm.

❖ Webographie :

(1) : http://www.afd.asso.fr/diabete/complications/nephropathie.

(2) : http://fr.wikipedia.org/wiki/Diabète_sucré.

(3) : http://fr.wikipedia.org/wiki/Diabète_de_type_1.

(4) : http://www.jle.com/e-docs/00/04/27/C3/article.phtml.

(5) : http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/diabete/articles/895-diabete-complications.htm.

ANNEXE

Tableau : Réactifs utilisés dans le dosage de la micro-albuminurie :

Réactif	Composition
Réactif. A	**1x 16 ml. Tampon borate 0.1 ml/l, azide de sodium 0.95 g/l, pH10.**
Réactif B	**1x4ml .Suspension de particules de latex sensibilisées avec les anticorps, anti-albumine humaine, azide de sodium 0.95 g/l**
Etalon S	**de l'albumine. 1x1ml.Albumine humaine**
Contrôle X	**valeur cibles du contrôle (MT ± 2 s) = 52,5 ± 10;5 mg/litre**