



**HAL**  
open science

# Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR dans le cadre du diagnostic de neurosarcoïdose

Jean-Noël Goguet

► **To cite this version:**

Jean-Noël Goguet. Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR dans le cadre du diagnostic de neurosarcoïdose. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03611792

**HAL Id: dumas-03611792**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03611792v1>**

Submitted on 17 Mar 2022

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

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



# THESE

(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE DE L'E.C.A. DANS LE  
L.C.R. DANS LE CADRE DU DIAGNOSTIC DE LA NEUROSARCOÏDOSE

Présentée par

**Jean-Noël GOGUET**

**Soutenue publiquement le 11 Octobre 2021**

**devant le jury composé de**

Madame le Professeur Pascale SCHUMANN-BARD	Professeur des Universités, U.F.R. Santé, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Caen	Présidente du jury
Monsieur le Professeur Stéphane ALLOUCHE	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef du Service de Biochimie, C.H.U. de Caen	Examineur
Madame le Docteur Frédérique GRANDHOMME	Praticien Hospitalier, Service de Biochimie, C.H.U. de Caen	Examineur
Monsieur le Docteur Julien ROGOWSKI	Praticien Hospitalier, Chef du Service de Biologie Médicale, C.H.I.C. Alençon-Mamers	Examineur

**Thèse dirigée par le Professeur Stéphane ALLOUCHE**

## LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

### **Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

Professeur Michel BOULOUARD

#### **Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

#### **Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

#### **Directrice administrative adjointe**

Madame Emmanuelle BOURDON

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

<b>BOULOUARD Michel</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b> .....	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b> .....	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b> .....	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b> .....	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b> .....	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GIARD Jean-Christophe</b> .....	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b> .....	Pharmacie galénique
<b>ROCHAIS Christophe</b> .....	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b> .....	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b> .....	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b> .....	Chimie médicinale

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

<b>ANDRE Véronique – HDR</b> .....	Biochimie, Toxicologie
<b>BOUET Valentine – HDR</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>CAILLY Thomas – HDR</b> .....	Chimie bio-inorganique, Chimie organique

<b>DENOYELLE Christophe – HDR</b> .....	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
<b>DHALLUIN Anne</b> .....	Bactériologie, Virologie, Immunologie
<b>ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>GROO Anne-Claire</b> .....	Pharmacie galénique
<b>KIEFFER Charline</b> .....	Chimie médicinale
<b>KRIEGER Sophie</b> (Praticien hospitalier) – <b>HDR</b> .....	Biologie clinique
<b>LAPORTE-WOJCIK Catherine</b> .....	Chimie bio-inorganique
<b>LEBAILLY Pierre – HDR</b> .....	Santé publique
<b>LECHEVREL Mathilde – HDR</b> .....	Toxicologie
<b>LEGER Marianne</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>LEPAILLEUR Alban – HDR</b> .....	Modélisation moléculaire
<b>N'DIAYE Monique</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>PAIZANIS Eleni</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima</b> .....	Chimie organique et thérapeutique
<b>POTTIER Ivannah</b> .....	Chimie et toxicologie analytique
<b>PREVOST Virginie – HDR</b> .....	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
<b>QUINTIN Jérôme</b> .....	Pharmacognosie
<b>RIOULT Jean-Philippe</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>SINCE Marc</b> .....	Chimie analytique
<b>VILLEDIEU Marie – HDR</b> .....	Biologie et thérapies anti-cancéreuses

#### **PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)**

**PRICOT Sophie** .....

Anglais

#### **PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)**

**SAINT-LORANT Guillaume** .....

Pharmacie clinique

**SEDILLO Patrick** .....

Pharmacie officinale

**RICHARD Estelle** .....

Pharmacie officinale

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

**JOURDAN Jean-Pierre**

**Enseignants titulaires du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

# REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Pr Stéphane ALLOUCHE, qui a bien voulu m'accompagner et m'encadrer pour faire grandir ce projet, des manip pendant le confinement à la rédaction de ce travail. Tu as toujours su être disponible et impliqué malgré la multitude d'obligations qui t'incombent.

Merci également au Pr SCHUMANN-BARD de me faire l'honneur de présider ce jury.

Merci au Dr Frédérique GRANDHOMME pour m'avoir apporté tes précieux conseils durant ce travail mais aussi tout au long de ces deux dernières années.

Mention spéciale au Dr Julien ROGOWSKI, tu es pour moi l'image du professionnel, n'hésitant pas à partager tout ce que tu as sans rien attendre en retour. Merci également à toute l'équipe du laboratoire du CH d'Alençon pour leur accueil en 2020, vous avez tout gagné, je reviens !

Merci à tous ceux, séniors, techniciens et internes, qui ont pris le temps de me former, de m'apprendre notre métier et de m'inculquer leurs valeurs et leur conscience professionnelle.

Merci à l'ensemble de mes co-internes pour tous ces moments, ces rires, ces galères parfois et beaucoup (vraiment beaucoup) de cafés partagés ensemble.

Un merci particulier à Charlie et Aurélian qui ont su m'intégrer et me faire sentir chez moi lors de mon arrivée à Caen. J'ai tout de suite eu l'impression que ce n'est pas avec un hôte, mais avec un ami que vous avez partagé cette pinte.

Plus personnellement, merci à toi Charlie, mon meilleur ami de Normandie, pour tout ce que nous avons partagé et partagerons encore. Toutes ces discussions sur tout et n'importe quoi, même si on est souvent d'accord et c'est pour ça qu'on s'aime. Tous ces « petite bière ? », ces « café ? », ces « ciné ce soir ? » et ces débriefings de Koh-Lanta.

Merci à tous mes amis, des plus anciens de la P1 avec qui j'ai tant vécu tout au long de ces années, merci d'être restés si proches malgré la distance. À ceux de la fac de pharma à qui je dois sans doute mes plus gros fous rires et mes soirées les plus mémorables, et à tout le groupe de Sa Riera qui m'a fait vivre des semaines

incroyables dont chaque minute est inoubliable, j'espère qu'on remettra ça vite. Merci à celles parmi mes co-internes qui sont devenues de vraies amies, il nous reste un paquet de restos à tester.

Merci à toute ma famille qui a suivi mon parcours et m'a encouragé, qui a partagé mes échecs comme mes réussites.

Et enfin, merci à mes parents. Je vous dois tout, plus que tout. Merci de m'avoir fait grandir en me guidant si bien, sans jamais me contraindre. Merci de m'aimer encore et toujours, d'avoir tout fait pour m'apprendre, me soutenir et me faire réussir. Merci d'être vous. Je vous aime.

# TABLE DES MATIERES

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des Figures</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des Tableaux</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>1) Sarcoïdose</b> .....	<b>6</b>
a) Épidémiologie.....	6
b) Physiopathologie.....	7
c) Diagnostic clinique, radiologique et biologique.....	8
d) Évolution et traitement.....	15
<b>2) Neurosarcoïdose</b> .....	<b>16</b>
a) Épidémiologie.....	16
b) Clinique.....	16
c) Évolution.....	23
d) Diagnostic.....	24
e) Marqueurs biologiques.....	27
f) Imagerie.....	28
g) Traitements.....	29
<b>3) L'enzyme de conversion de l'angiotensine I</b> .....	<b>32</b>
a) Système rénine-angiotensine-aldostérone.....	32
b) Rôles physiologiques.....	34
c) Structure.....	34
d) Mécanisme.....	37
e) Méthodes de dosage.....	38
<b>4) Le processus qualité</b> .....	<b>40</b>
a) La démarche qualité en France.....	40
b) Vérification et validation de méthode.....	41
<b>5) Objectifs</b> .....	<b>42</b>
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>43</b>
<b>1) Matériel et réactifs</b> .....	<b>43</b>
a) Réactifs.....	43
b) Spectrofluorimétrie.....	44
<b>2) Mise au point de la méthode</b> .....	<b>45</b>
a) Principe de la mesure.....	45
b) Gamme de calibration.....	46

c)	Détermination de l'activité .....	47
d)	Contrôles.....	48
<b>3)</b>	<b>Protocole.....</b>	<b>48</b>
a)	Phase pré-analytique .....	48
b)	Préparation des réactifs .....	48
c)	Préparation de la plaque.....	49
d)	Lecture .....	50
e)	Analyse .....	50
<b>4)</b>	<b>Essais .....</b>	<b>52</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>52</b>
<b>1)</b>	<b>Détermination de la phase stationnaire .....</b>	<b>52</b>
<b>2)</b>	<b>Répétabilité .....</b>	<b>54</b>
<b>3)</b>	<b>Reproductibilité .....</b>	<b>54</b>
<b>4)</b>	<b>Variabilité inter-opérateurs.....</b>	<b>55</b>
<b>5)</b>	<b>Incertitudes de mesure .....</b>	<b>57</b>
<b>6)</b>	<b>Étendue de mesure .....</b>	<b>58</b>
a)	Limite de détection.....	58
b)	Limite de quantification et linéarité.....	58
<b>7)</b>	<b>Valeurs de référence .....</b>	<b>60</b>
<b>8)</b>	<b>Comparaison de méthodes .....</b>	<b>61</b>
<b>9)</b>	<b>Interférences et spécificité analytique .....</b>	<b>63</b>
<b>10)</b>	<b>Contamination .....</b>	<b>65</b>
<b>11)</b>	<b>Robustesse et stabilité des réactifs .....</b>	<b>67</b>
a)	Tampon.....	67
b)	Substrat.....	69
c)	Stabilité des échantillons de LCR congelés à -20°C.....	69
<b>Discussion .....</b>		<b>70</b>
<b>1)</b>	<b>Dossier de validation de méthode .....</b>	<b>70</b>
a)	Répétabilité .....	71
b)	Reproductibilité .....	71
c)	Variabilité inter-opérateurs.....	71
d)	Incertitudes de mesure .....	72
e)	Étendue de mesure.....	72
f)	Valeurs de référence.....	73

g) Comparaison de méthode.....	73
h) Interférences et spécificités pré-analytique et analytique .....	74
i) Contamination .....	74
j) Robustesse et stabilité des réactifs .....	75
<b>2) Application en routine .....</b>	<b>76</b>
a) Technique .....	76
b) Validation biologique.....	76
c) Interprétation des résultats .....	76
<b>3) Échanges inter-laboratoires.....</b>	<b>77</b>
<b>4) Perspectives .....</b>	<b>77</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>80</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>88</b>
<b>Annexe 1 : Fiche technique.....</b>	<b>88</b>
<b>Annexe 2 : Exemple d'un fichier de calcul des résultats .....</b>	<b>95</b>
<b>Annexe 3 : Formulaire SH-Form 43 .....</b>	<b>98</b>
<b>Annexe 4 : Quizz d'habilitation technicien .....</b>	<b>109</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADEM : encéphalomyélite aiguë démyélinisante

BHE : barrière hémato-encéphalique

BOC : bandes oligoclonales spécifiques du LCR

CI50 : concentration inhibitrice à 50%

CIQ : contrôle interne de qualité

CH : centre hospitalier

CHU : centre hospitalier universitaire

COFRAC : comité français d'accréditation

CV : coefficient de variation

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine I

ECAs : ECA somatique

ECA<sub>t</sub> : ECA testiculaire

EEQ : évaluation externe de la qualité

FLAIR : fluid attenuated inversion recuperation

GUM : guide of uncertainty of measurement

HLA : human leucocyte antigens

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion

IL2 : interleukine 2

INF- $\gamma$  : interferon  $\gamma$

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISO : International Organization for Standardization

KL-6 : Krebs von den Lungen-6

LBM : laboratoire de biologie médicale

LCR : liquide céphalo-rachidien

LEMP : leucoencéphalopathie multifocale progressive

MAG : myelin-associated-glycoprotein

PIDC : polyneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique

SFBC : société française de biochimie clinique

SIL : système informatique du laboratoire

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

TE : temps d'écho

TEP : tomographie par émission de positons

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

TR : temps de répétition

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 Aspect des lésions dans plusieurs sièges de sarcoïdose en anatomopathologie .....	7
Figure 2 Immunopathogénèse de la sarcoïdose .....	8
Figure 3 Radiographies thoraciques illustrant quatre stades radiologiques de la sarcoïdose médiastino-pulmonaire.....	10
Figure 4 IRM cérébral coronal T1 avec un granulome sarcoïdien initialement pris pour un méningiome .....	19
Figure 5 IRMs T1 d'un même patient atteint de sarcoïdose méningée avant et après un traitement par corticoïdes à haute dose .....	21
Figure 6 Tomodensitométrie cérébrale d'un patient atteint de neurosarcoïdose avec hydrocéphalie nécessitant la mise en place d'une dérivation ventriculaire .....	22
Figure 7 Encéphalopathie focale du lobe temporal droit (IRM T2) .....	23
Figure 8 Neurosarcoïdose, IRM T1. A : Réhaussement diffus leptoméningé diffus micronodulaire. B : Réhaussement méningé nodulaire.....	29
Figure 9 Algorithme thérapeutique dans la neurosarcoïdose.....	32
Figure 10 Système rénine-angiotensine-aldostérone.....	33
Figure 11 Action de l'ECA sur l'angiotensine I.....	34
Figure 12 Structure globale de l'ECA .....	36
Figure 13 Structure primaire de l'ECA et ses homologues.....	37
Figure 14 Modèle tétraédrique du site HEXXH de la thermolysine .....	37
Figure 15 Modèle d'hydrolyse d'un tripeptide sur le site catalytique de l'ECA testiculaire.....	38
Figure 16 Schéma de l'interaction entre un agent fluorescent et son quencher .....	43
Figure 17 Compilation des données de fluorescence .....	45
Figure 18 Calcul des données de qualification d'un échantillon .....	46
Figure 19 Exemple de droite de calibration. ....	47
Figure 20 Plan de plaque .....	50
Figure 21 Exemple de représentation graphique de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps .....	51
Figure 22 Cinétique enzymatique .....	53
Figure 23 Détermination de la phase stationnaire.....	53
Figure 24 Corrélation entre les 2 méthodes de mesure .....	63
Figure 25 Essai d'interférence du captopril sur le dosage du pool LCR.....	64

Figure 26 Essai de spécificité analytique avec de l'ECA purifiée et du captopril.....	65
Figure 27 Plan de plaque pour l'essai de contamination .....	66

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principales manifestations extra-respiratoires de sarcoïdose .....	12
Tableau 2 Caractéristiques et fréquence des principales atteintes au cours des neurosarcoïdoses .....	17
Tableau 3 Critères diagnostiques des neurosarcoïdoses .....	24
Tableau 4 Exemples de diagnostics différentiels des neurosarcoïdoses .....	26
Tableau 5 Traitements des neurosarcoïdoses .....	31
Tableau 6 Détermination de la répétabilité.....	54
Tableau 7 Détermination de la reproductibilité .....	55
Tableau 8 Détermination de la variabilité inter-opérateurs.....	56
Tableau 9 Détermination des incertitudes de mesure .....	57
Tableau 10 Détermination de la limite de détection .....	58
Tableau 11 Essai de linéarité. Les résultats sont exprimés bruts et rapportés au facteur de dilution. ....	59
Tableau 12 Activités des 50 échantillons de LCR « témoins » analysés .....	60
Tableau 13 Comparaison de méthode sur 30 échantillons .....	62
Tableau 14 Essai de contamination .....	67
Tableau 15 Stabilité du tampon et valeurs de reproductibilité.....	68
Tableau 16 Résultats de stabilité du substrat.....	69
Tableau 17 Détermination de la stabilité du pool LCR .....	70

# INTRODUCTION

## 1) Sarcoïdose

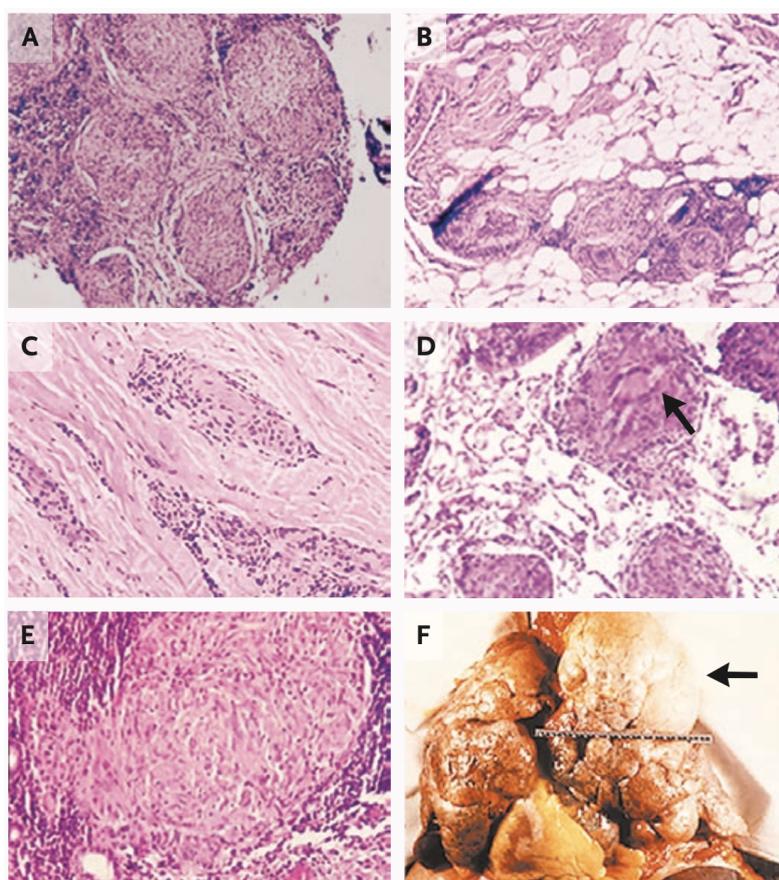
### *a) Épidémiologie*

En 1899, le dermatologue Norvégien Caesar Boeck décrit chez un policier de 37 ans des nodules cutanés dont il compare l'aspect des cellules à un sarcome (1). Il est en fait le premier à décrire ce qui plus tard sera connu comme la sarcoïdose, cette affection systémique qui reste encore inconnue sous bien des aspects, que ce soit du point de vue clinique, biologique ou sur la physiopathologie de formation des granulomes. Sur un plan strictement médical elle est définie comme une atteinte systémique caractérisée par l'infiltration, d'un ou plusieurs organes, par des granulomes immuns épithélioïdes aux cellules géantes, aussi appelés granulomes tuberculoïdes sans nécrose caséeuse (2). Le diagnostic, difficile, se fait en éliminant les autres causes connues de granulome. Le principal défi réside dans l'hétérogénéité de la présentation clinique, de l'épidémiologie et de l'évolution de la maladie.

En France la prévalence est de 30/100 000 habitants, au niveau mondial la répartition de la maladie est ubiquitaire mais varie en fonction de l'ethnie, de l'âge ou du sexe. Les populations afro-américaines et d'Europe du Nord ont les taux les plus élevés, alors que les pays d'Asie orientale ont les plus bas. Les premières manifestations surviennent généralement entre 25 et 45 ans, avec une discrète prédominance féminine (sex ratio entre 1 et 1,5). La recherche de facteurs environnementaux s'est principalement portée sur les agents aéroportés du fait de l'atteinte plus fréquente des poumons, des yeux et de la peau. Des études ont rapporté le lien entre la survenue de la maladie et l'exposition à des facteurs comme des insecticides, certains pollens, la fumée d'incendie ou celles issues de la métallurgie, et même certaines mycobactéries. En 2007, Izbicki et al. ont décrit une augmentation significative de l'incidence de la sarcoïdose chez les pompiers intervenus au World Trade Center le 11 Septembre 2001 (3). Étant donné la variété des facteurs de risques environnementaux rapportés, il semblerait que la sarcoïdose soit l'aboutissement de la réponse immunitaire à plusieurs déclencheurs environnementaux et ubiquitaires (4). L'existence de formes familiales est confirmée et représenterait environ 10% des cas (5), avec notamment l'implication de plusieurs gènes du système HLA (4).

### *b) Physiopathologie*

Le développement et l'accumulation de granulomes constitue l'élément central de la sarcoïdose (Figure 1). Les granulomes sont des collections compactes et centrifuges de macrophages et cellules épithéliales entourés de lymphocytes. Les macrophages, sous l'effet de la stimulation chronique par des cytokines, se différencient en cellules épithéliales, acquièrent des propriétés sécrétoires et bactéricides et fusionnent pour former des cellules géantes multi-nucléées (Figure 1D)(6). Dans les granulomes les plus matures, des fibroblastes et du collagène s'enchevêtrent autour du premier noyau de cellules (Figure 1E). S'ensuit dans certains cas une sclérose altérant l'architecture et le fonctionnement de l'organe touché (Figure 1F).



*Figure 1 Aspect des lésions dans plusieurs sièges de sarcoïdose en anatomopathologie. A : granulomes dans un épithélium nasal. B : tissu synovial. C : biopsie cutanée. D : biopsie pulmonaire. E : glande lacrymale. F : cœur et poumons à l'autopsie (2)*

Sur le plan immunologique, on retrouve systématiquement des lymphocytes T CD4+ interagissant avec les cellules présentatrices d'antigènes pour initier et faire perdurer le granulome via une stimulation constante. Une sélection clonale progressive de ces

lymphocytes T CD4+ aboutirait en leur différenciation en cellules type 1 helper (Th1)-like, secrétant majoritairement de l'interleukine 2 (IL2), de l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), augmentant la production de tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) des macrophages et amplifiant localement la réponse immunitaire (Figure 2)(4,7).

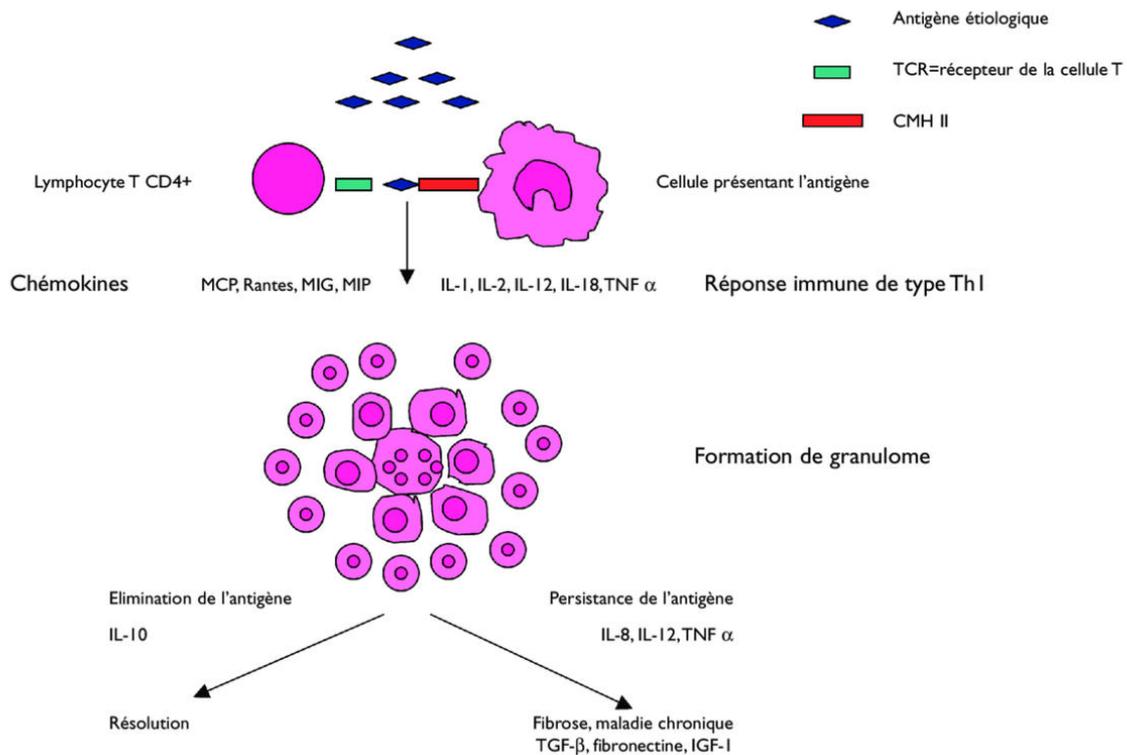


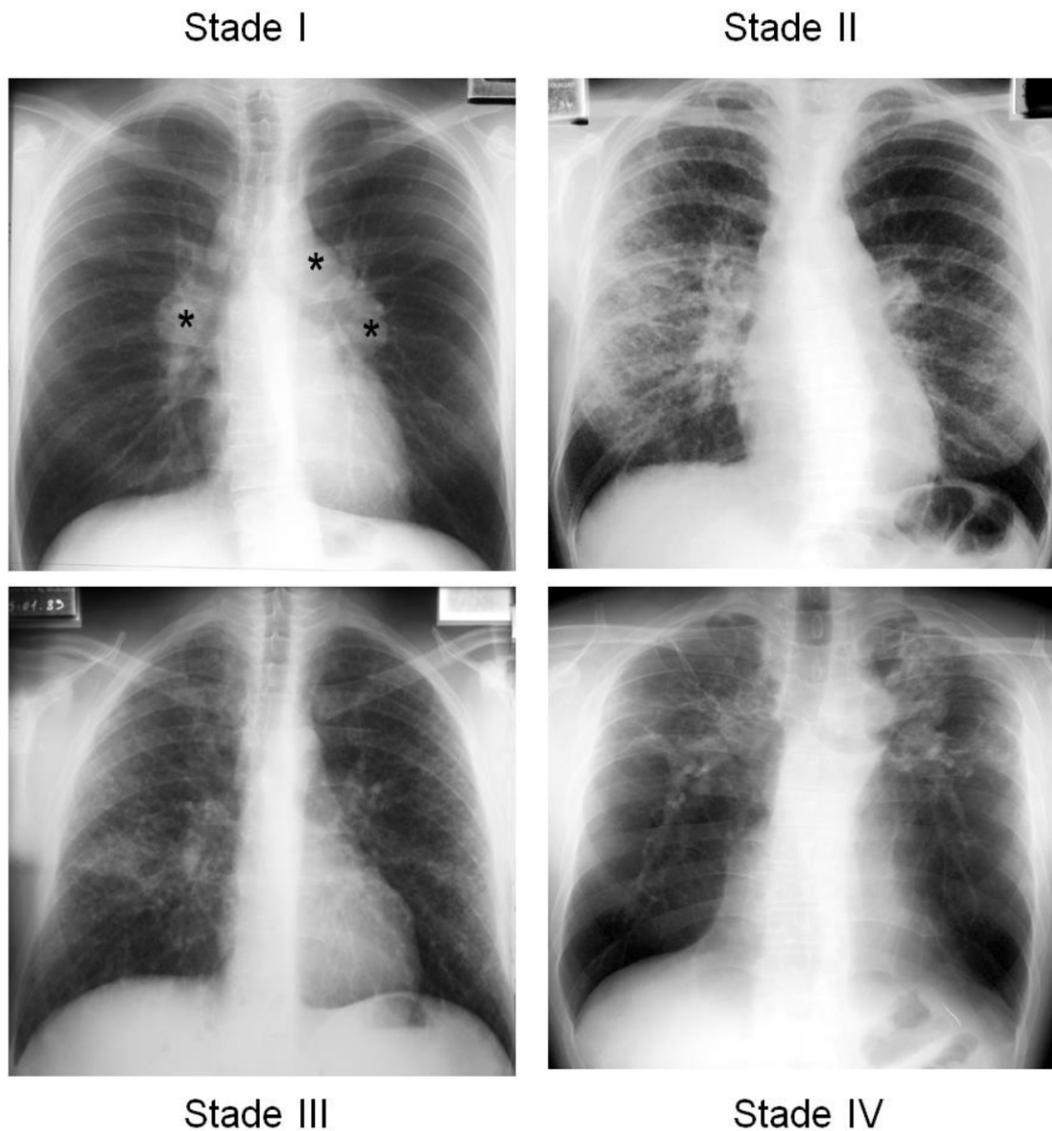
Figure 2 Immunopathogénèse de la sarcoïdose. Adapté et modifié d'après Moller et al. CMH = complexe majeur d'histocompatibilité, IL = interleukine, TNF = tumor necrosis factor, CD = cluster de différenciation, MCP = Membrane Cofactor Protein, MIG = Monokine induced by gamma-interferon, MIP = Macrophage Inflammatory Protein, TGF = Transforming Growth factor, IGF = insulin-like growth factor.

### c) Diagnostic clinique, radiologique et biologique

Les signes d'appel cliniques varient en fonction des différentes formes et localisations, qui seront abordées par la suite. La forme majoritaire étant pulmonaire, on retrouve le plus fréquemment des signes respiratoires à type de toux, de dyspnée ou de douleur thoracique. La toux est sèche et le plus souvent non productive, la dyspnée, rare en phase précoce, se rencontre dans les stades avancés, les douleurs thoraciques sont liées aux adénopathies intra-thoraciques, parfois volumineuses. L'auscultation est généralement normale et le diagnostic repose sur l'imagerie et la biologie.

Dans la forme pulmonaire la radiographie est réalisée systématiquement. Elle permet non seulement le diagnostic, mais aussi le suivi et le pronostic de la maladie. Cinq stades radiographiques sont décrits et sont corrélés à la probabilité de résolution spontanée de la sarcoïdose (Figure 3)(8) :

- Stade 0 : radiographie thoracique normale
- Stade I : adénopathies hilaires bilatérales et médiastinales (\*) sans atteinte parenchymateuse
- Stade II : association d'adénopathies hilaires et médiastinales et d'une atteinte parenchymateuse pulmonaire
- Stade III : atteinte parenchymateuse pulmonaire isolée
- Stade IV : fibrose pulmonaire



*Figure 3 Radiographies thoraciques illustrant quatre stades radiologiques de la sarcoïdose médiastino-pulmonaire. (2)*

L'atteinte du parenchyme forme un aspect micronodulaire diffus. Il est fréquent d'observer dans la sarcoïdose une différence entre l'atteinte radiologique et l'absence de symptomatologie respiratoire fonctionnelle franche, ceci constitue un élément en faveur du diagnostic de sarcoïdose.

Si elle est présente, la fibrose se caractérise par une opacité parenchymateuse et est à l'origine de lésions cicatricielles, parfois cavitaires dont le risque est l'envahissement aspergillaire.

Toujours sur le plan radiologique, le scanner par tomodensitométrie en haute résolution permet de mieux caractériser l'atteinte parenchymateuse notamment en

différenciant les lésions inflammatoires actives réversibles des lésions fibreuses anciennes et irréversibles.

À l'épreuve fonctionnelle respiratoire, la spirométrie est peu altérée dans le stade I. Au repos, les gaz du sang sont longtemps normaux, un test de marche de 6 minutes permet facilement d'objectiver une réduction de la distance parcourue et une désaturation en oxygène à l'effort.

L'endoscopie bronchique a un intérêt essentiellement diagnostique, de par la réalisation de prélèvements histologiques. L'aspect macroscopique de la muqueuse est souvent normal. Les recommandations actuelles préconisent la réalisation de biopsies étagées ainsi que d'un lavage broncho-alvéolaire à la recherche d'une alvéolite lymphocytaire T CD4+.

Les formes extra-pulmonaires de sarcoïdose sont très polymorphes et d'un grand apport diagnostique lorsqu'elles sont associées à une atteinte médiastino-pulmonaire, signant le caractère systémique de la maladie (Tableau 1)(8). La forme neuro-méningée est abordée en détail ultérieurement.

Tableau 1 Principales manifestations extra-respiratoires de sarcoïdose (2)

Localisations	Fréquence	Manifestations cliniques	Explorations
Œil	15-30%	Uvéite, atteinte lacrymale, névrite optique, nodule conjonctival	Fond d'œil, angiographie rétinienne
Peau	15-25%	Sarcoïdes à petits ou gros nodules ou en plaques, nodules sous cutanés, lupus pernio	Biopsie cutanée
Adénopathies	15%	Superficielles et/ou profondes	Échographie, biopsie
Foie	15%	Cholestase non ictérique, hépatomégalie	Biologie, échographie, biopsie
Système nerveux	5-10%	Syndrome méningé : atteinte neuroendocrine (diabète insipide), atteintes des fonctions cognitives, épilepsie, hydrocéphalie, troubles psychiatriques, atteinte médullaire, atteinte des nerfs crâniens ou périphériques	IRM, dosages hormonaux, ponction lombaire, électromyogramme
ORL	2-4%	Obstruction nasale, anosmie, parotidite, dysphonie, dyspnée	Scanner
Ostéo-articulaire	< 5%	Arthralgies, ostéites chroniques	Radiographie, scintigraphie, biopsie
Cœur	< 5%	BAV, bloc de branche droit, tachycardie	électrocardiogramme, écho-cœur, TEP-scanner
Rein	2%	Élévation de la créatininémie, troubles de la calcémie mais aussi sécrétion par activité 1-alpha-hydroxylase du granulome	Calciurie, biopsie, échographie

Les anomalies biologiques observables dans le cadre de la sarcoïdose sont pour la plupart peu spécifiques. En dehors des manifestations liées à une atteinte d'organe, on distingue généralement des troubles du métabolisme phospho-calcique, fréquemment associés à une hypercalcémie et une hypercalciurie, par augmentation de l'absorption intestinale du calcium et majoration du turn-over osseux secondaire à une élévation des taux de calcitriol (1-25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) liée à la sécrétion de la 1 $\alpha$ -hydroxylase par les macrophages sarcoïdiens. Une lymphopénie prédominante sur les

T CD4+, une hypergammaglobulinémie polyclonale à l'électrophorèse des protéines plasmatiques témoignant de l'activation des lymphocytes B ainsi qu'une négativation des tests tuberculiques (80% des cas) sont courants. Cette anergie tuberculique a une valeur diagnostique mais ne serait pas due à une diminution de l'immunité étant donné que la sarcoïdose ne s'accompagne classiquement pas d'un déficit immunitaire.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) est le marqueur biochimique historique du diagnostic de la sarcoïdose (9). L'élévation, notamment sérique, de l'activité de l'ECA serait due à une synthèse de l'enzyme par les macrophages activés des granulomes et serait un reflet de la masse granulomateuse (10). Quelques temps envisagé comme une piste étiologique, le polymorphisme du gène de l'ECA n'a pas été significativement impliqué (voir ci-dessous)(11,12). En ce qui concerne la performance du dosage, de nombreuses études s'y sont penchées depuis la fin des années 1970, et bien que les chiffres varient significativement, toutes s'accordent à dire que le dosage sérique de l'activité de l'ECA ne représente pas un élément diagnostique suffisamment fiable pour signer à lui seul la maladie. La sensibilité n'est que de 60 à 80% selon les études et augmenterait dans les stades II et III, même si la corrélation n'est pas bonne (13). L'association de l'ECA avec un autre examen tel que la scintigraphie au <sup>67</sup>Ga permettrait d'atteindre une sensibilité presque parfaite pour les stades II et III, une négativité conjointe des deux examens constituerait donc un critère solide d'exclusion du diagnostic. L'activité de l'ECA permettrait également de suivre l'évolution de la maladie, notamment sous corticothérapie, en faisant diminuer les granulomes et en freinant l'activité cellulaire, les corticoïdes diminueraient l'activité de l'enzyme (10). Le principal inconvénient à l'utilisation intégrante du dosage de l'activité sérique de l'ECA au diagnostic est sa spécificité, de 70 à 90% selon les études (13). La tuberculose miliaire et la maladie de Gaucher (80 %), la lèpre et la cirrhose biliaire primitive (20 %), ou encore la schistosomiase vésicale et hépatique, sont toutes des granulomatoses ou maladies à composante granulomateuse pour lesquelles une augmentation de l'activité de l'ECA peut être observée (14). L'activité ECA est parfois augmentée dans les pneumoconioses toxiques, industrielles ou agricoles, comme la silicose (45 %), l'asbestose (toxicité de l'amiante) ou la bérylliose. Enfin l'ECA sérique peut être un peu élevée dans l'hyperthyroïdie et la cholestase intrahépatique (15). En revanche, l'ECA n'a pas d'intérêt dans le diagnostic de ces maladies pulmonaires ou extrapulmonaires. Plusieurs cas de figure exposent à une activité ECA faible voire nulle :

- Il a été montré au début des années 1990 qu'un polymorphisme d'insertion (I) ou délétion (D) d'une séquence intronique de 250 paires de bases dans le gène codant pour l'ECA a un fort impact sur son taux sérique (16). Dans une étude comprenant 80 patients, 14 étaient homozygotes I/I (17%), 37 hétérozygotes (46%) et 29 homozygotes D/D (37%). Les sujets I/D et D/D ont montré respectivement une activité sérique 1,5 et 2 fois plus forte en moyenne que les sujets I/I, suggérant ainsi que ce simple polymorphisme jouerait un rôle dans 50% de la valeur d'activité sérique de l'ECA chez une large partie de la population (17).
- La prise d'inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) sous-estime la valeur de l'activité (18) et empêche l'interprétation du dosage (8).
- Une atteinte endothéliale : en effet, comme détaillé ultérieurement, les cellules de l'endothélium des vaisseaux sont la principale source de production de l'ECA plasmatique, une atteinte vasculaire mécanique ou fonctionnelle (défaut de synthèse et/ou de sécrétion) va se manifester par une ECA plasmatique basse voire à la limite du domaine mesurable. C'est le cas du cancer bronchique, de la fibrose pulmonaire, de l'asthme, de l'emphysème, de la bronchite chronique, de l'œdème aigu du poumon et du syndrome de détresse respiratoire aiguë (13).

D'autres marqueurs biologiques ont été utilisés ou étudiés dans le diagnostic de la sarcoïdose. Le lysozyme, autre biomarqueur « historique », s'avère au final peu utile, sa spécificité étant encore moins bonne que celle de l'ECA (13,19,20). Le Krebs von den Lungen-6 (KL-6) est une mucine dérivée de l'ECA, sa concentration sérique est élevée dans plusieurs pathologies pulmonaires (21). La chitotriosidase est un biomarqueur sécrété par les macrophages et les neutrophiles activés dont l'élévation sérique serait liée à l'importance de la masse granulomateuse (22). Aucun de ces deux marqueurs n'a montré de supériorité significative vis à vis de l'ECA ou du lysozyme (20).

La démarche diagnostique comprend donc un faisceau d'arguments qui auront à être recoupés entre eux et associés pour augmenter leur force. La mise en évidence de granulomes typiques reste le plus souvent nécessaire, en dehors d'une présentation ciblée comme le syndrome de Löfgren qui associe un érythème noueux, une polyarthrite aiguë et une adénopathie hilare. Le diagnostic de sarcoïdose repose sur :

- Une présentation clinico-radiographique évocatrice ou au moins compatible.

- La présence de granulomes sans nécrose caséuse.
- L'élimination des autres étiologies de granulomes.

Les diagnostics différentiels sont multiples et varient en fonction de la localisation et des manifestations engendrées. Ils comprennent la tuberculose, la granulomatose sarcoïdose-like induite par certains médicaments (23), les maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn, la maladie de Wegener ou la sclérose en plaques, les réactions tumorales, les maladies d'exposition particulaire, le déficit immunitaire commun variable et les pneumopathies d'hypersensibilité.

#### *d) Évolution et traitement*

L'évolution et la sévérité de l'atteinte sont très variables. La moitié des patients connaît une régression de la maladie dans les deux ans, alors qu'après cinq ans une rémission est peu probable (2). On définit ainsi les formes aiguës de sarcoïdose < 2 ans et les formes chroniques > 3-5 ans. Un suivi trimestriel ou semestriel est nécessaire dans les formes chroniques afin de détecter précocement les localisations qui pourront menacer le pronostic vital. Les patients rechutent le plus souvent dans les 2 à 6 mois suivant l'interruption du traitement et exceptionnellement après 3 ans de recul sans traitement. La guérison de la maladie est définie par une rémission stable en dehors de tout traitement pendant 3 ans. Le pronostic de la sarcoïdose est bon dans 80% des cas avec ou sans traitement. Dix à vingt pourcents des patients vont garder des séquelles et 1-5% des patients vont décéder de leur sarcoïdose.

La plupart des patients atteints ne sont pas handicapés par leur maladie, il ne convient alors pas d'introduire un traitement. Lorsqu'il est jugé nécessaire, la pierre angulaire du traitement est l'utilisation de glucocorticoïdes (24), leur introduction est généralement inévitable lorsque la fonction de l'organe atteint est menacée (4). Des agents immunosuppresseurs et cytotoxiques sont également utilisés dans de rares cas (4,25) mais leur toxicité fait tendre la balance bénéfice/risque en leur défaveur.

## 2) Neurosarcoïdose

### *a) Épidémiologie*

Les manifestations neurologiques de la sarcoïdose ont pour la première fois été décrites en 1909 par Heerfordt qui associait des paralysies faciales à la sarcoïdose (26). Plusieurs cas sont individuellement publiés durant le XX<sup>e</sup> siècle puis inclus dans des séries permettant de dresser le panorama des atteintes retrouvées dans la neurosarcoïdose. Cette forme particulière est souvent révélatrice de la sarcoïdose systémique sous-jacente (70% des cas) et peut constituer son unique localisation (20%)(27), l'âge médian de découverte serait plus élevé (environ 40 ans), suggérant la possibilité qu'une sarcoïdose jusque-là passée inaperçue se révèle par la survenue de signes neurologiques.

### *b) Clinique*

L'ensemble du système nerveux central (SNC) et périphérique peut être touché, même si le SNC en représente une large majorité (85%). On peut dégager l'atteinte des nerfs crâniens (50-75%) et la méningite aseptique (10-20%) comme étant les manifestations les plus fréquentes (Tableau 2)(28). Il est à noter qu'un tiers voire la moitié des patients développent plus d'une manifestation neurologique de leur pathologie (28).

Une hypertension intracrânienne peut survenir et est alors à considérer comme un signe de gravité. La neurosarcoïdose doit être évoquée devant des céphalées ne cédant pas aux antalgiques de palier I, des nausées ou vomissements, un œdème papillaire ou une hyperprotéinorachie disproportionnée. Le tableau clinique dépend essentiellement de la localisation des granulomes, pouvant alors donner des troubles moteurs, sensitifs, psychiatriques ou encore hormonaux.

Tableau 2 Caractéristiques et fréquence des principales atteintes au cours des neurosarcoïdoses (27)

Type d'atteinte	Caractéristiques cliniques	Fréquence	Remarques
<b>SNC</b>		85–90 %	
Méningées	Présentation variable : troubles cognitifs, psychiatriques, épilepsie, hypertension intracrânienne, etc. Parfois asymptomatiques	10–50 %	Définie par une prise de contraste leptoméningée ou une pléiocytose sur le LCR
Médullaires	Troubles moteurs et sensitifs de degrés variables Troubles sphinctériens	3–43 %	Peut se présenter sous forme d'une pseudo-compression médullaire
Hypothalamo-hypophysaires	Atteintes de l'hypophyse antérieure et/ou diabète insipide	≈ 20 %	Associées aux atteintes rhino-sinusiennes
Nerfs optiques	Neuropathie rétrobulbaire, peut être associée à une atteinte ophtalmologique	3–38 %	
Nerfs crâniens (hors nerfs optiques)	Les plus fréquemment atteints : V, VII, plus rarement : VIII, oculomotricité, peut être bilatérale ou à bascule	11–80 %	Peut récupérer spontanément, souvent récidivante
Autres atteintes du SNC	Atteintes parenchymateuses de localisation variable, parfois pseudo-tumorales Atteintes temporales Atteintes pseudo-vasculaires		Rarement hématome intracrânien
<b>SNP</b>		10–15 %	
Radiculopathies	Atteintes pluri-radiculaires, pouvant se limiter à un syndrome de la queue de cheval, atteintes thoraciques possibles		
Musculaires	Forme nodulaire Forme aiguë Forme pseudo-myopathique	5%	La forme pseudo-myopathique est de survenue plus tardive
Autres atteintes du SNP	Neuropathie axonale motrice pure, sensitive pure ou sensitivomotrice Neuropathie pseudo-démyélinisante Mononeuropathie multiple (exceptionnel) Neuropathie des petites fibres	Rares	

Les atteintes retrouvées sont résumées par fréquence dans le tableau ci-dessus (Tableau 2). Les atteintes extra-neurologiques associées à la neurosarcoïdose sont généralement pauci-symptomatiques et peuvent passer inaperçues.

L'atteinte des nerfs crâniens est la plus fréquemment décrite, concernant plus de la moitié des patients (29). Chacun des nerfs crâniens peut être concerné et plus de la moitié des patients présentent des lésions multiples. L'origine de la majorité de ces tableaux étant une compression granulomateuse du nerf sur son trajet. Ainsi le retentissement clinique dépend du nerf lésé :

- Nerf olfactif (I) : anosmie ou hyposmie. Ce nerf peut aussi être touché de manière secondaire lors d'une méningite sarcoïdienne siégeant dans la région sous-frontale.
- Nerf optique (II) : la cause d'atteinte oculaire la moins fréquente de la sarcoïdose. Résultant en une baisse d'acuité visuelle aiguë ou chronique, douloureuse ou non.
- Nerfs oculomoteurs et pathétique (III, IV et VI) : dysfonction de la motricité oculaire, diplopie.
- Nerf trijumeau (V) : engourdissement facial, ou rarement, neuropathie du trijumeau. On peut aussi observer des céphalées et de manière atypique une atteinte de la mastication.
- Nerf facial (VII) : le syndrome de paralysie faciale causé par la lésion du nerf facial est la plus fréquente des atteintes des nerfs crâniens (29). Il est également celui le plus souvent retrouvé de manière isolée, on le retrouve chez 25 à 50% des patients atteints de neurosarcoïdose. Il se présente comme une paralysie, habituellement unilatérale mais pouvant être bilatérale, alors simultanée ou séquentielle. Le pronostic de recouvrement des fonctions faciales est plutôt bon, 80% des patients connaissent une issue « favorable » (28).
- Nerf auditif (VIII) : la plus fréquente après l'atteinte du VII, les deux attributions du nerf, l'audition et les fonctions vestibulaires, peuvent être touchées, de manière soudaine ou insidieuse. Comme pour le VII l'atteinte du VIII peut être bilatérale.
- Nerfs glosso-pharyngien et pneumogastrique (IX et X) : dysphagie et dysphonie.
- Nerfs spinal et grand hypoglosse (XI et XII) : leur atteinte semble très rare et peu décrite.

L'atteinte méningée prend généralement la forme d'une méningite aseptique, plus rarement d'une masse au niveau des méninges (Figure 5). La méningite aseptique se présente sous la forme d'un syndrome méningé à LCR stérile avec une hyperleucorachie en majorité mononuclée. Une hypoglycorachie et une hyperprotéinorachie surviennent également fréquemment. Lorsqu'elles sont présentes, les masses méningées sont facilement confondues avec des tumeurs intracrâniennes comme les méningiomes (Figure 4)(30).

Une hydrocéphalie survient chez 10% des patients touchés et peut être associée à la méningite sarcoïdienne. Il s'agit d'une complication grave voire létale car pourvoyeuse d'hypertension intracrânienne. L'hydrocéphalie peut aussi bien être aiguë que chronique, communicante ou non. À nouveau, elle trouve son origine dans l'infiltration du système ventriculaire par des granulomes, de l'inflammation ou de la fibrose. Le LCR peut voir sa circulation réduite voire bloquée, causant ainsi un élargissement ventriculaire (Figure 6). On observe chez 50% des patients une atteinte du tissu parenchymateux dont la manifestation la plus fréquent touche le système hypothalamo-hypophysaire.

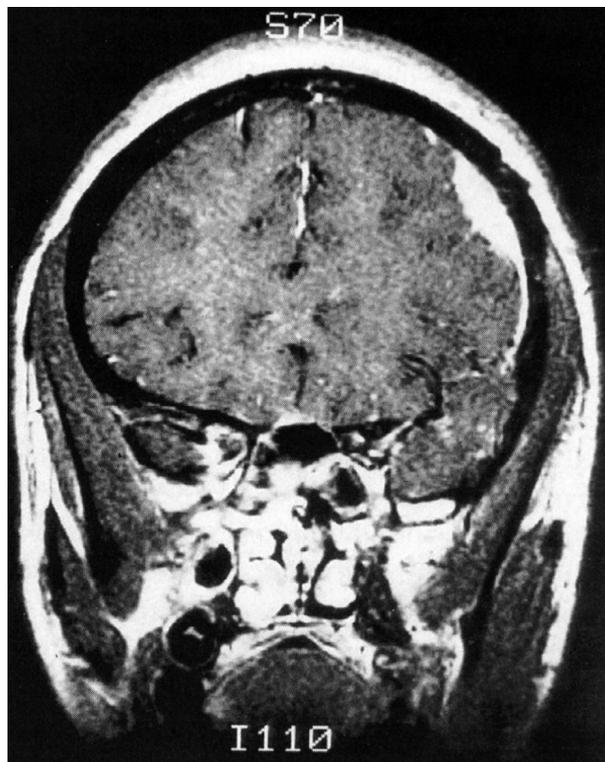
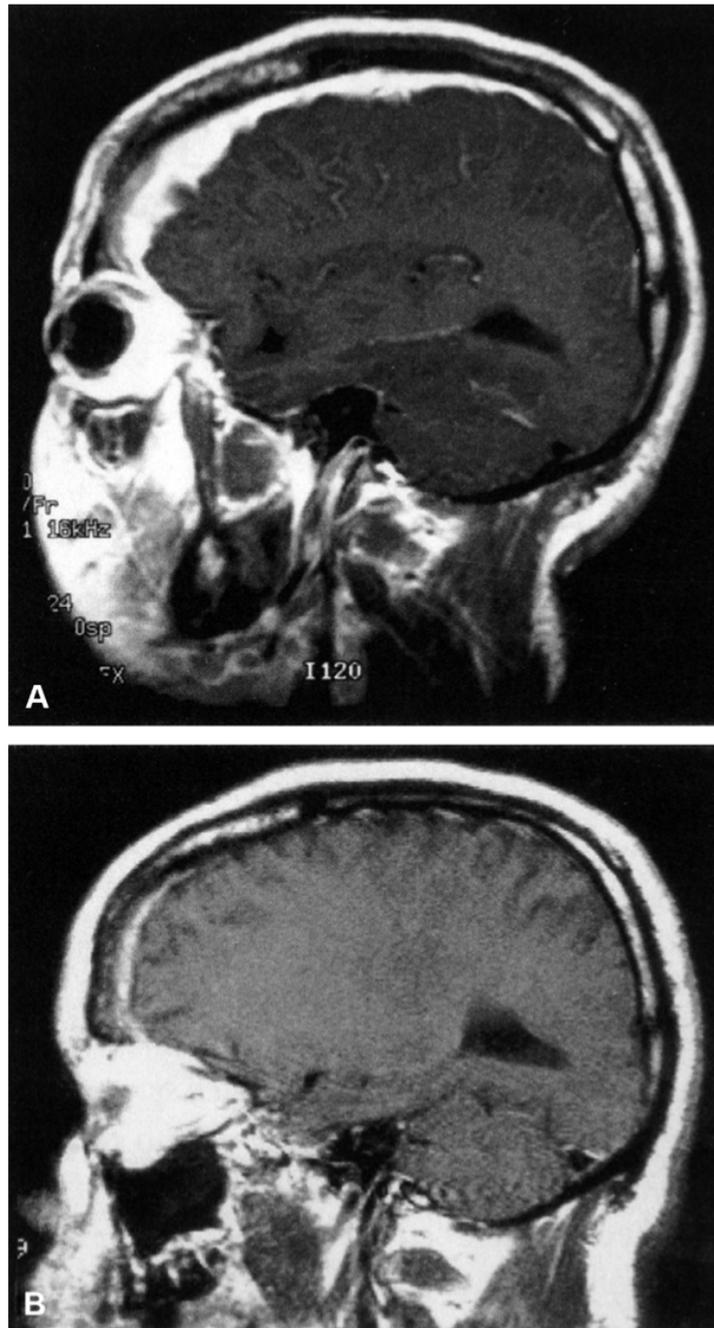


Figure 4 IRM cérébral coronal T1 avec un granulome sarcoïdien initialement pris pour un méningiome (28)

Les répercussions se font alors majoritairement au niveau neuroendocrine avec une altération des fonctions végétatives telles que la régulation thermique, l'appétit, le sommeil, la libido et de manière plus caractéristique, la soif (29). À l'IRM, les atteintes endocrines peuvent s'expliquer par des granulomes hypothalamiques ou pituitaires (31). De fait, des anomalies hormonales peuvent apparaître au niveau sérique, avec des perturbations des bilans thyroïdien et surrénalien. Un taux élevé de prolactine étant régulièrement retrouvé, elle peut servir d'indicateur de dysfonction hypothalamique. De par leur fréquence chez les patients atteints de neurosarcoïdose, un bilan hormonal est à réaliser chez les patients présentant d'autres signes que des paralysies faciales (28).

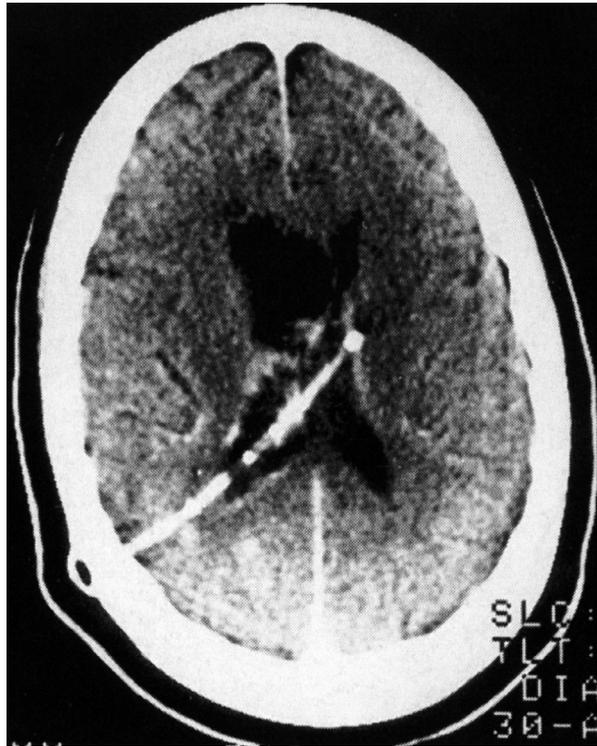
L'encéphalopathie et les vasculopathies sarcoïdiennes sont d'autres manifestations à prendre en compte au niveau du SNC. Leurs mécanismes mal connus et leur fréquente association les rendent difficiles à dissocier cliniquement et histologiquement. De manière focale ou diffuse, l'inflammation peut toucher les deux hémisphères ou la région basilaire provoquant ainsi chez le patient confusion, troubles de la personnalité ou amnésie (Figure 7). Au niveau vasculaire, des atteintes artérielles et veineuses sur des vaisseaux de différents calibres ont été décrites (32). Des incidents ischémiques ou hémorragiques sont également possibles, consécutivement à l'inflammation des artères ou au développement de masses compressives périvasculaires (33).

Environ 20% des patients développent des troubles cognitifs ou comportementaux (28). Ces présentations varient largement et incluent des hallucinations, des psychoses, de la dépression ou de la démence. Il est alors complexe de déterminer la stricte origine de ces troubles : ils peuvent aussi bien résulter de l'infiltration granulomateuse à proprement parler, d'un effet indésirable des corticoïdes ou du stress provoqué par la découverte d'une maladie neurologique chronique et récurrente.



*Figure 5 IRMs T1 d'un même patient atteint de sarcoïdose méningée avant (A), et après (B) un traitement par corticoïdes à haute dose (28)*

Des crises d'épilepsie sont à rapporter chez 20% des patients atteints de neurosarcoïdose. Elles sont liées à un pronostic sombre de la maladie du fait qu'elles reflètent de sévères lésions parenchymateuses du SNC ou une hydrocéphalie (34). Ces crises semblent en revanche faciles à endiguer si le traitement anti-inflammatoire est efficace sur le SNC.



*Figure 6 Tomodensitométrie cérébrale d'un patient atteint de neurosarcoïdose avec hydrocéphalie nécessitant la mise en place d'une dérivation ventriculaire (28)*

Au niveau de la moelle épinière, les atteintes peuvent être des masses intramédullaires, extramédullaires ou extradurales. Une myélite intramédullaire peut aussi survenir.

Plus rares qu'au niveau central, les atteintes du système nerveux périphérique sont également une possibilité (35). Les neuropathies, généralement chroniques, peuvent être sensorielles, motrices (ou les deux) ou survenir sous la forme de polyneuropathies démyélinisantes aiguës (Guillain-Barré-like)(36). La présentation la plus fréquente est une neuropathie sensitivo-motrice axonale chronique. D'apparition tardive après le diagnostic de sarcoïdose, elles sont généralement bénignes et apparaissent comme des paresthésies distales, une diminution des capacités proprioceptives et une altération des réflexes. La sensibilité à la douleur et la température semble aussi pouvoir être touchée.



Figure 7 Encéphalopathie focale du lobe temporal droit (IRM T2)(28)

### c) *Évolution*

L'évolution et le pronostic des patients touchés par la neurosarcoïdose varient mais peuvent être anticipés dans leurs grandes lignes. Deux tiers des patients ne connaîtront qu'un seul épisode de leur manifestation neurologique, le plus souvent une neuropathie des nerfs crâniens ou une méningite aseptique, le reste fera face à une forme chronique, récidivante ou récurrente. Il s'agit alors plus d'atteintes parenchymateuses du SNC, d'hydrocéphalie ou d'atteintes multiples des nerfs crâniens. La mortalité survient majoritairement chez les patients avec une forme parenchymateuse ou une hydrocéphalie, de par le phénomène inflammatoire lui-même ou à cause des complications thérapeutiques, elle serait de 5 à 10 % (29,34). L'évolution sans traitement de la neurosarcoïdose n'a pas été déterminée du fait de la mise systématique des patients sous corticoïdes ou immunosuppresseurs. Mais bien que le traitement soit toujours bénéfique à court terme, son impact dans le temps est à relativiser, même si l'inflammation peut être spontanément résolutive, certains patients souffrant de formes progressives ou récidivantes se voient sévèrement handicapés malgré un traitement agressif.

#### d) Diagnostic

Le diagnostic se présente sous deux cas de figure de fréquences égales. Soit un patient sans sarcoïdose connue se présente avec des signes orientant vers une neurosarcoïdose, le but va alors être de mettre en évidence la sarcoïdose systémique sous-jacente. Soit la sarcoïdose est déjà connue, il faudra alors s'assurer que les signes neurologiques sont bien dus à une neurosarcoïdose et non pas à une autre pathologie évoluant en parallèle de la sarcoïdose. La difficulté d'accès du tissu nerveux à la biopsie et la fréquente unicité des granulomes rendent le diagnostic particulièrement compliqué de par le peu de recours possible à l'anatomopathologie. D'après une classification de Zajicek et al en 1999, reprise par la suite, une neurosarcoïdose « prouvée » se caractérise par une mise en évidence de structures granulomateuses au niveau du système nerveux, le diagnostic est « probable » si une atteinte neurologique est associée à la présence de granulomes dans d'autres organes et « possible » si ces conditions ne sont pas remplies (Tableau 3)(37).

Tableau 3 Critères diagnostiques des neurosarcoïdoses (37)

Prouvée	Présentation clinique compatible avec une neurosarcoïdose Exclusion des diagnostics différentiels Histologie du système nerveux positive
Probable	Présentation clinique compatible avec une neurosarcoïdose Éléments en faveur d'une inflammation du système nerveux (protéïnorachie élevée ou cellularité du LCR élevée ou IRM cérébrale ou médullaire ou électromyogramme compatible avec une sarcoïdose) Exclusion des diagnostics différentiels Au moins une preuve de sarcoïdose systémique (histologie autre que le système nerveux)
Possible	Présentation clinique compatible avec une neurosarcoïdose Exclusion des diagnostics différentiels Les critères pour une neurosarcoïdose prouvée ou probable ne sont pas remplis

Un autre argument diagnostique est l'efficacité du traitement. Si la sarcoïdose est prouvée sur un organe extra-neurologique, la résistance au traitement doit remettre en cause le diagnostic de neurosarcoïdose (27). Si le diagnostic de sarcoïdose n'a pas été précédemment posé, l'enjeu est d'envisager la neurosarcoïdose et d'obtenir une preuve histologique. Elle est à évoquer devant une atteinte du SNC lorsqu'il existe des atypies vis à vis des autres maladies inflammatoires neurologiques, devant des localisations évocatrices, une méningite lymphocytaire, une hypoglycorachie, une prise de contraste lepto-méningée, une atteinte médullaire ou hypothalamo-hypophysaire (clinique ou biologique)(27). Les examens de première intention sont alors un examen clinique avec recherche d'adénopathies périphériques, un scanner thoraco-abdomino-pelvien à la recherche d'adénopathie ou d'une atteinte parenchymateuse, un examen ophtalmologique, des épreuves fonctionnelles respiratoires et un examen ORL. En plus de la biopsie des glandes salivaires, facile à réaliser, à la recherche de granulomes, d'autres biopsies seront à envisager en fonction des résultats précédents. Lorsqu'une preuve histologique d'un granulome épithélioïde est trouvée hors du SNC (neurosarcoïdose probable), il faudra écarter d'autres affections granulomateuses dans le cas où les résultats biologiques du LCR et l'imagerie sont concordants. Les diagnostics différentiels à envisager sont les mêmes que pour la sarcoïdose systémique (tuberculose, Lyme, VIH). Pour la neurosarcoïdose on peut évoquer de manière plus spécifique les vascularites à anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) telle que la granulomatose avec polyangéite, les autres maladies inflammatoires du système nerveux (Gougerot-Sjögren, lupus, histiocytoses, sclérose en plaque) ou des lymphomes ou cancers. Les diagnostics différentiels de neurosarcoïdose sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 Exemples de diagnostics différentiels des neurosarcoïdoses (27)

Type d'atteintes	Exemples de diagnostics différentiels	Exemples d'examens utiles
Méningées	Infections (borréliose, brucellose, syphilis, listeria, mycobactéries, cryptocoque, LEMP, toxoplasmose) Granulomatose avec polyangéite Maladie de Rosai-Dorfman Maladie de Behçet Neuro-lupus Maladie à IgG4 Neuro-lymphomatose Méningite carcinomateuse Encéphalites auto-immunes	Examens bactériologiques, virologiques et parasitologiques Examen anatomopathologique du LCR Dosage des interleukines du LCR Examen ophtalmologique Dosage des anticorps antinucléaires
Médullaires	Neuromyéélite optique Maladie de Behçet Neuro-lupus Tumeurs Carence en vitamine B12	Anticorps anti-aquaporine 4 Dosage de la vitamine B12
Cérébrales parenchymateuses	Sclérose en plaques ADEM Tumeurs Infections Maladie de Behçet Lymphomes cérébraux	Analyse du LCR (BOC, IL-10) Examens bactériologiques, virologiques et parasitologiques Biopsie cérébrale à discuter
Nerfs crâniens et nerfs optiques	Causes virales Maladie de Lyme Diabète Syndrome de Gougerot-Sjögren Sclérose en plaques	Analyse du LCR Recherche d'anticorps anti-SSA et SSB Sérologie de Lyme
Hypothalamo-hypophysaires	Histiocytoses	Scintigraphie osseuse ou TEP corps entier, IRM cérébrale
Radiculopathies	Maladie de Lyme, tuberculose, listériose Méningite carcinomateuse Neuro-lymphomatose	Examens bactériologiques, virologiques, parasitologiques Sérologie de Lyme Examen anatomopathologique du LCR
Neuropathies axonales ou démyélinisantes	Causes toxiques, carentielles, dégénératives Amylose PIDC Neuropathie anti-MAG	Recherche activité anti-MAG Analyse du LCR Biopsie des glandes salivaires accessoires Discuter biopsie de nerf
Atteintes musculaires	Maladies inflammatoires du muscle Myopathies	Biopsie du muscle

*MAG : myelin-associated-glycoprotein ; PIDC : polyneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique ; TEP : tomographie par émission de positons ; BOC : bandes oligoclonales spécifiques du LCR ; IL : interleukine(s) ; ADEM : encéphalomyélite aiguë démyélinisante ; LEMP : leucoencéphalopathie multifocale progressive.*

#### *e) Marqueurs biologiques*

Du point de vue biologique, si le diagnostic de sarcoïdose systémique n'a pas été posé il est important de réaliser les examens et de rechercher les anomalies mentionnées précédemment. Pour le diagnostic spécifique de neurosarcoïdose, l'analyse du LCR se révèle intéressante puisque plus de 50% des patients présenteront des anomalies biologiques du LCR (29). Elles incluent une augmentation de la pression du LCR, une hyperprotéinorachie, une hypoglycorachie et une hypercellularité à prédominance mononuclée jusqu'à plusieurs centaines de cellules par microlitre. On note chez certains patients la présence de bandes oligoclonales à l'isoélectrofocalisation ou une augmentation de l'index IgG montrant une synthèse intrathécale. En parallèle, il est recommandé de réaliser les examens suivants sur la ponction lombaire : recherches bactériologiques (avec recherche de mycobactéries), virologiques voire parasitologiques de routine ainsi qu'une étude des cellules en cytométrie en flux.

Le dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR constitue un examen plus ciblé bien que relativement peu sensible et spécifique. La sensibilité du dosage serait de 50% mais varie largement en fonction des études (27,38,39), une cause possible de ces variations pourrait être la mise sous traitement corticoïde ou non des patients. Il est également possible que l'élévation du taux d'ECA suive le développement clinique de la neurosarcoïdose, en outre, plus l'invasion du SNC par des granulomes ou des lésions sarcoïdiennes serait importante, plus le taux d'ECA dans le LCR serait élevé (40). La rareté des cas avérés de neurosarcoïdose rend compliquées les études de grande échelle sur la fiabilité du dosage. Certaines études de petite à moyenne envergure se contredisent quant à la spécificité de l'ECA dans le LCR (41–44). Néanmoins, tous les auteurs se rejoignent sur sa faible spécificité, notamment en raison de taux élevés d'ECA dans le LCR retrouvés dans les méningites, certaines tumeurs cérébrales, la maladie de Behçet ou le syndrome de Guillain-Barré (41). En somme, une activité ECA non pathologique dans le LCR n'exclut pas une neurosarcoïdose, de plus la portée diagnostique de l'analyse est limitée du fait de manque de standardisation du dosage et de la mise en place de valeurs usuelles consensuelles. Se rajoutent également les dissensions quant à l'interprétation d'un

taux qui serait jugé pathologique notamment sur l'indexation ou non de l'ECA sur la protéinorachie pour compenser un phénomène de transsudation des protéines sériques, il ne serait pas recommandé d'indexer le taux d'ECA sur celui des protéines dans le LCR mais une hyperprotéinorachie serait à prendre en compte (41). D'autres études n'ont pas retrouvé de corrélation entre l'activité de l'ECA dans le LCR et celle du sérum, l'albuminorachie ou les IgG du LCR (41,45).

#### *f) Imagerie*

Comme dans la sarcoïdose systémique, l'imagerie a une place significative dans le diagnostic de neurosarcoïdose, en particulier l'IRM avec injection de gadolinium (46,47), permettant de mettre en évidence les atteintes de la barrière hémato-encéphalique et les zones inflammatoires actives. Ce qui fait de l'IRM un outil particulièrement adapté est sa maniabilité pour obtenir des coupes dans les plans et la qualité de contraste sur les tissus mous. Un signal IRM se définit par son temps de répétition (TR) correspondant à l'intervalle entre deux excitations, et son temps d'écho (TE), le temps entre l'excitation et la survenue du signal IRM. Une séquence IRM est un ensemble d'impulsions excitatrices dont les paramètres (TE, TR) sont ajustés pour obtenir des images ayant un contraste donné (T1 ou T2 par exemple).. Fréquemment on retrouve dans la neurosarcoïdose une prise de contraste leptoméningée évocatrice lorsqu'elle présente un aspect micronodulaire confluent (Figure 8).

Les nerfs crâniens peuvent apparaître épaissis ou réhaussés, les nerfs optiques augmentés de taille en hypersignal FLAIR (FLuid Attenuated Inversion Recovery), technique basée sur l'inversion-récupération, le signal provenant du LCR est supprimé et un long TE est donné afin de donner à l'image une forte pondération T2 (49). Au niveau médullaire l'IRM peut montrer des prises de contraste des méninges et/ou un hypersignal intramédullaire généralement étendu sur plusieurs étages vertébraux permettant de faire la différence avec d'autres pathologies démyélinisantes où l'hypersignal ne s'étend que sur moins d'un corps vertébral (27).

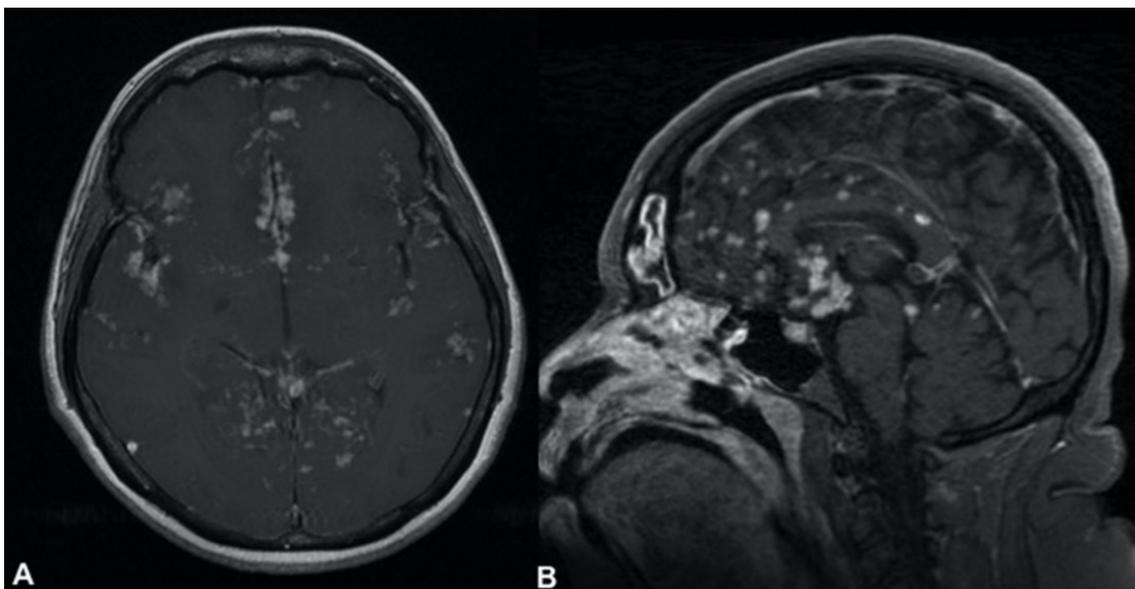


Figure 8 Neurosarcoïdose, IRM T1. A : Réhaussement diffus leptoméningé diffus micronodulaire. B : Réhaussement méningé nodulaire (27)

#### *g) Traitements*

Pour ce qui concerne la prise en charge thérapeutique, trois situations sont à distinguer entre elles. Le patient symptomatique avec une neurosarcoïdose documentée en anatomo-pathologie doit être traité le plus rapidement possible pour éviter de rendre permanents de potentiels dommages fibrotiques ou micro-ischémiques. Ensuite, si la biopsie n'est pas réalisable mais que des images sont évocatrices en IRM ou en tomodensitométrie, avec une sarcoïdose systémique documentée, un traitement d'épreuve peut être entrepris si des étiologies infectieuses ou néoplasiques peuvent être exclues. Enfin, le patient asymptomatique avec une neurosarcoïdose documentée ou non, pose toujours un dilemme. La décision doit alors être individualisée en se basant sur la localisation des lésions, leur évolution et les risques encourus avec le traitement (47). A ce jour, il n'existe pas d'étude scientifique comparant l'efficacité de différents traitements pour la neurosarcoïdose, en revanche, la corticothérapie est recommandée pour tous les patients qui n'ont pas de contre-indication spécifique (27,28,47). Bien que la réponse au traitement puisse être impressionnante à court terme, il n'est pas certain qu'il altère l'histoire naturelle et le développement au long cours de la maladie. Un objectif important de la corticothérapie à long terme est de prévenir et de diminuer au maximum la formation de fibrose et les accidents ischémiques du fait de l'inflammation péri-vasculaire, or, il est impossible de poursuivre une corticothérapie (ou toute autre immunosuppresseur à forte dose). Il est donc

souhaitable de diminuer le traitement en même temps que les signes inflammatoires reculent. En cas d'échec des corticoïdes, des alternatives sont possibles :

- Le méthotrexate aurait un taux de réponse d'environ 60% (50), il peut notamment être utile pour diminuer les doses de corticoïdes, voire les supprimer.
- Le mycophénolate mofetil, bien que le recul soit limité aux sarcoïdoses cutanées et gastro-intestinales.
- Le cyclophosphamide dans les cas sévères (51), permettant par la suite un contrôle plus aisé de la pathologie par les corticoïdes.
- L'aziathioprine.
- La chloroquine et l'hydroxychloroquine (52).
- L'utilisation de l'infliximab, un anti TNF- $\alpha$ , reste délicate en raison de résultats contradictoires entre les études (47).

Terushkin et al. ont proposé un résumé des options thérapeutiques ainsi qu'un algorithme de traitement (Tableau 5 et Figure 9).

Tableau 5 Traitements des neurosarcoïdoses (47)

Traitements	Posologies	Effets indésirables notables
Prednisone	Initialement 40-80 mg/j ou 0,5-1 mg/kg/j, diminution lente selon la réponse	Hypertension, insuffisance surrénalienne, hyperglycémie, psychose, insomnie, gastrite, prise de poids, ostéoporose
Méthylprednisone	1 g/j ou 20 mg/kg/j pendant 3-5 j	Idem
Méthotrexate	7,5 mg par semaine, 2,5 mg supplémentaires toutes les 2 semaines jusque 10-25 mg/kg pendant 4-6 semaines	Hépatotoxicité, pneumopathie interstitielle, aplasie, anémie
Mycophénolate mofetil	500 mg la première semaine, 1g si toléré, puis 1,5g si toléré à 2-3 mois	Leucopénie, anémie, oesophagite, gastrite
Azathioprine	2 mg/kg jusque 200 mg	Aplasie, hypersensibilité, lymphome ou leucémie secondaire
Chloroquine, hydroxychloroquine	250 mg	Atteinte rétinienne irréversible, épilepsie, acouphènes, atteinte cutanée, alopecie, hypertension
Infliximab	3-5 mg/kg IV à 0, 2 et 6 semaines, puis toutes les 4-8 semaines	Anaphylaxie, infection, rash, hépatotoxicité, pancytopenie, atteinte neurologique
Cyclophosphamide	Initialement 500 mg IV puis 750 mg et 1 g per os ou 2-5 mg/kg/j	Cystite hémorragique, aménorrhée, cardiotoxicité, neutropénie, infertilité

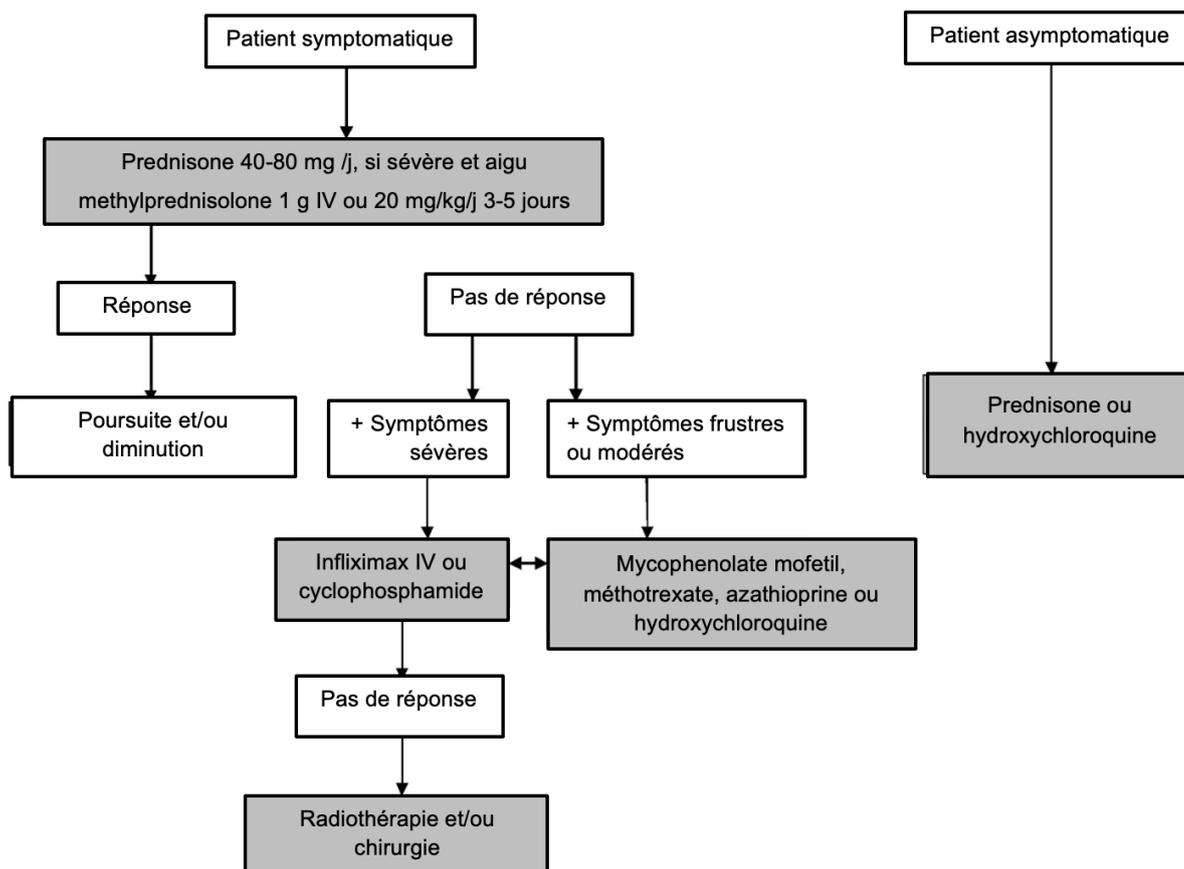


Figure 9 Algorithme thérapeutique dans la neurosarcoïdose (47)

La radiothérapie ciblée sur les granulomes représente une des alternatives de dernière ligne. Plusieurs études rapportent une efficacité faible à modérée dans les neurosarcoïdoses réfractaires au traitement médicamenteux, sans toutefois pouvoir s’y substituer (47). La chirurgie pour sa part n’est utilisée qu’en dernier recours, en cas d’échec thérapeutique ou de risque vital. Dans tous les cas il est recommandé de suivre l’efficacité du traitement par imagerie afin d’apprécier l’évolution des lésions dans le temps.

### 3) L’enzyme de conversion de l’angiotensine I

#### a) Système rénine-angiotensine-aldostérone

De par une action conjuguée sur les vaisseaux, les reins et le cœur, le système rénine-angiotensine est l’un des principaux régulateurs de l’homéostasie hydrosodée et de la

pression artérielle (53). Il comprend deux enzymes qui agissent de manière successive, d'abord la rénine, synthétisée par l'appareil juxta-glomérulaire en réponse aux variations de la volémie (54). Elle produit au niveau sanguin l'angiotensine I (décapeptide) à partir de l'angiotensinogène, un glycopeptide d'origine hépatique (55).

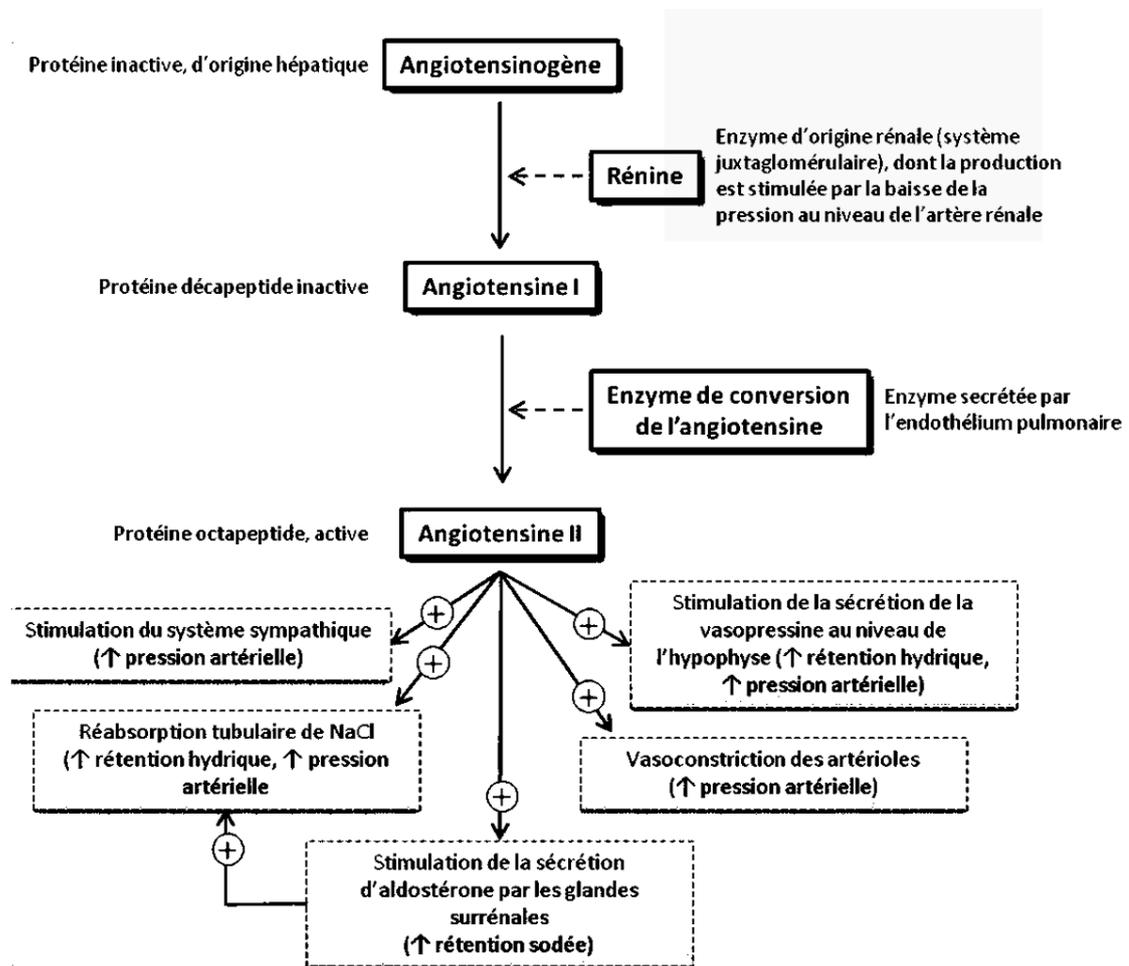


Figure 10 Système rénine-angiotensine-aldostérone

L'ECA clive ensuite les deux résidus His-Leu carboxy-terminaux de l'angiotensine I (56) pour donner l'angiotensine II (octapeptide)(Figure 11), vasoconstricteur (via ses récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>) et stimulateur de la production d'aldostérone par la glande surrénale (Figure 10)(57). L'aldostérone permet la réabsorption sodique au niveau du tube collecteur ainsi que l'élimination du potassium, maintenant ainsi la volémie et la tension artérielle dans les limites physiologiques (54). Le blocage de la cascade enzymatique du système rénine-angiotensine-aldostérone est largement utilisé en pratique dans le traitement de l'hypertension ou de l'insuffisance cardiaque avec les

inhibiteurs directs de la rénine, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II.

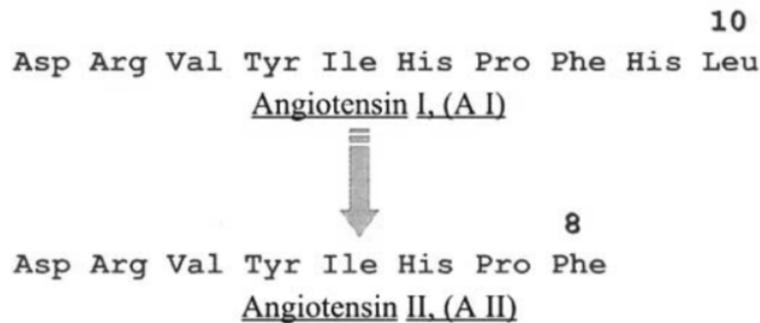


Figure 11 Action de l'ECA sur l'angiotensine I (56)

### b) Rôles physiologiques

Outre son action sur l'angiotensine I, l'ECA est également capable de cliver le dipeptide en C-terminal de la bradykinine, empêchant son action vasodilatatrice (58). L'ECA, et plus particulièrement son inhibition médicamenteuse, est aussi suspectée de jouer un rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer de par la dégradation du peptide  $\beta$  amyloïde, composant principal des plaques amyloïdes (59).

Bien qu'elle soit produite au niveau de tout le tissu endothélial, on la retrouve particulièrement au niveau des capillaires pulmonaires, des cellules épithéliales rénales, intestinales et épидидymaires. La régulation de l'enzyme au niveau endothélial est mal connue, bien que son activité reste relativement constante, plusieurs composés hormonaux ou médicamenteux mis en évidence in vitro en favoriseraient la production. On peut citer la dexaméthasone (60), l'endothéline-I (61) ou le peptide atrial natriurétique (62).

### c) Structure

L'ECA est une métalloenzyme ayant une fonction carboxy-dipeptidase, monomérique, transmembranaire, zinc et chlore dépendante (63), décrite pour la première fois en 1956 de par son rôle sur la tension artérielle (64). Chez l'humain, on la rencontre sous deux formes distinctes : la forme somatique abondante au niveau de l'endothélium vasculaire, et la forme testiculaire exclusive aux cellules germinales. Les deux formes diffèrent principalement au niveau du nombre et de la structure de leurs sites

catalytiques (56). Plus récemment, un homologue de l'ECA nommé ECA2 a été identifié et décrit comme ayant un rôle important dans la régulation cardiaque (65).

L'ECA somatique (qui est désignée ici comme « l'ECA ») est codée par un gène unique de 21 kpb situé sur le chromosome 17q23 comprenant 26 exons et 25 introns. Elle se compose de 1 306 acides aminés (aa) pour un poids moléculaire de 140-170 kDa (66). En partant de l'extrémité C-terminale elle comprend un domaine cytosolique de 28 aa, un domaine hydrophobe transmembranaire de 22 aa et un domaine extracellulaire de 1 227 aa fortement glycosylé (Figure 12). La partie extracellulaire est divisée en deux domaines homologues, le premier en N-terminal fait 612 aa est relié au second de 600 aa par une séquence de 15 aa. Chacun de ces deux domaines extracellulaires comprend une séquence HEXXH (H = histidine, E = acide glutamique et X n'importe quel acide aminé, séquence consensuelle à toutes les enzymes à zinc) dans laquelle les deux histidines servent de ligand à un atome de zinc. Elles forment, avec une glutamine située 23 aa au-delà vers le côté C-terminal et une molécule d'eau, le site catalytique de forme tétraédrique (63). Chacun des deux domaines exerce une action catalytique (67) et bien que hautement homologues, ils sont suffisamment différents pour exercer une action différente en fonction du substrat. Bien que l'affinité des deux sites pour l'angiotensine I soit la même, le domaine en C-terminal l'hydrolyse plus efficacement in vitro ou in vivo (66). La spécificité de chaque domaine pour un substrat donné se fait notamment en fonction de leur dépendance au chlore (66).

La localisation extracellulaire de l'ECA sur les cellules endothéliales rend son interaction avec son substrat, l'angiotensine I, idéale. Il a été montré qu'un seul passage du sang au travers du système vasculaire pulmonaire permettait la conversion de tout l'angiotensine I circulant (68).

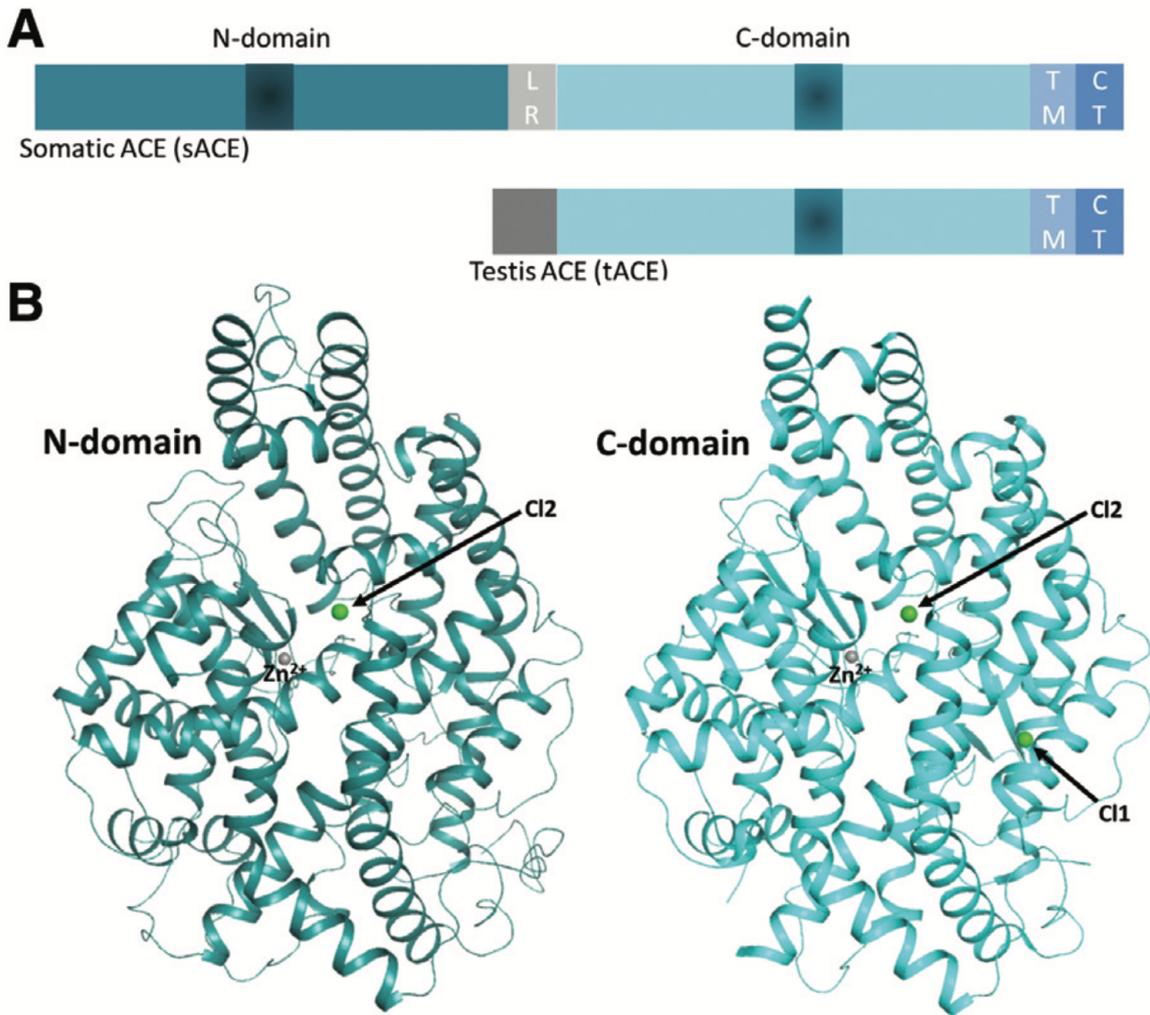


Figure 12 Structure globale de l'ECA. A : structure primaire des isoformes avec le domaine HEXXH en bleu foncé. B : structure tertiaire des isoformes. LR : région d'ancrage, TM : domaine transmembranaire, CT : domaine cytosolique,  $Zn^{2+}$  = atome de zinc, Cl = atome de chlore (56)

L'ECA2 diffère de l'ECA puisqu'elle ne contient qu'un seul domaine catalytique homologue au domaine N-terminal de l'ECA, n'est pas affectée par les IEC et ne dégrade pas la bradykinine (mais dégrade l'angiotensine I)(63). L'ECA testiculaire correspond quant à elle au domaine C-terminal de l'ECA somatique (Figure 12Figure 13).

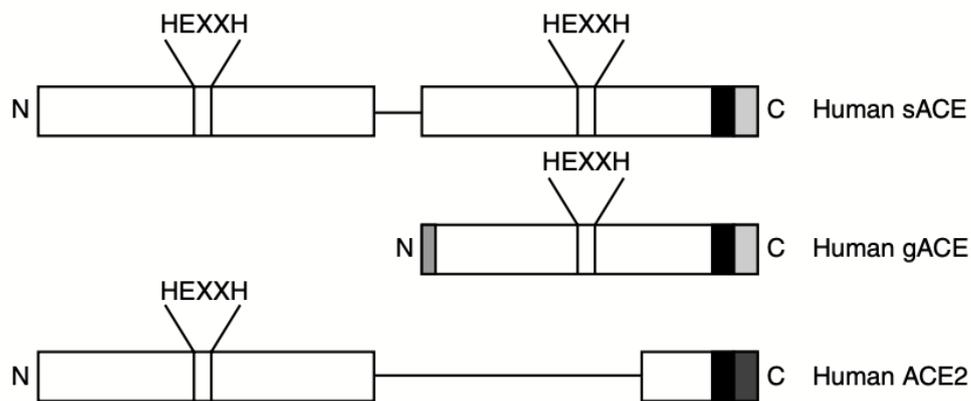


Figure 13 Structure primaire de l'ECA et ses homologues (63) sACE = ECA somatique (66), gACE = tECA = ECA testiculaire, ACE2 = ECA2

#### d) Mécanisme

Le mécanisme catalytique de l'ECA a été décrit en se basant sur celui d'autres métalloenzymes à zinc avec le même site HEXXH comme la thermolysine (Figure 14) ou la carboxypeptidase A (56).

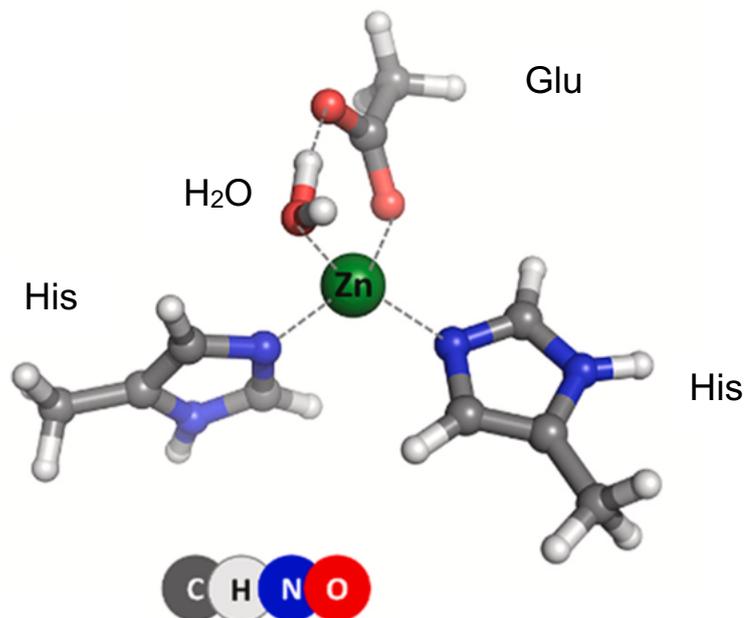


Figure 14 Modèle tétraédrique du site HEXXH de la thermolysine (69)

La protéine a une forme de puits avec le site catalytique situé au bout du canal ainsi formé, l'enzyme n'hydrolyse donc que des petits peptides non repliés sur eux-mêmes. L'hydrolyse du substrat se fait par une attaque sur le groupe carboxyl-alkyle de la



automatisables. Actuellement la détermination de l'activité de l'ECA sérique en routine dans les laboratoires s'effectue en spectrophotométrie à partir de substrats artificiels commercialisés sous forme de kits à installer sur des automates compatibles. Parmi ces substrats on peut citer l'hippuryl-histidileucine (HHL) et le furylacroloyl-phénylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG). L'Abz-FRK(dnp)P-OH trifluoroacetate (Abz = acide ortho-aminobenzoïque, FRK = phenylalaline, arginine et lysine, dnp = 2,4-dinitrophenyl) est un substrat synthétique développé en 2005 (76) qui est actuellement utilisé au Centre Hospitalier Universitaire de Caen dans le laboratoire de Biochimie et sera employé ici. L'activité est exprimée en Unité Internationale qui correspond à l'hydrolyse d'une micromole de substrat par minute.

#### Dans le LCR

Physiologiquement, la faible quantité d'ECA retrouvée dans le LCR proviendrait d'un détachement des plexus choroïdes (41). En 1984, Schweifurst et al. proposent une méthode de dosage par fluorimétrie de l'ECA dans le LCR, les techniques classiques de spectrophotométrie utilisées dans le sérum où l'enzyme est beaucoup plus concentrée ne sont pas assez sensibles pour des taux aussi faibles que ceux du LCR. La linéarité de l'essai est bonne mais il n'est pas fait mention de la sensibilité ou de la spécificité, de plus la technique requière d'assez nombreuses étapes, une incubation de 60 minutes et ne permet pas la lecture simultanée de plusieurs échantillons (essai de fluorimétrie en cuve)(77).

À la fin des années 1990, Baudin et al. ont développé une méthode de dosage radiométrique à l'hôpital Saint-Antoine à Paris. Le substrat HHL (hippuryl-histidine-leucine) est marqué au  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$ -HHL) puis hydrolysé par l'ECA dans des conditions de vitesse initiale de Michaelis-Menten. Un résidu hippurate marqué est libéré puis compté en scintillation liquide après extraction par l'acétate d'éthyl. Du point de vue analytique, le seuil de détection est à 0,04 U/l et la sensibilité proche, à 0,06 U/l. Le domaine de mesure va de 0,5 à 5 U/l et couvre toutes les valeurs rencontrées dans des LCR sains et pathologiques. La linéarité sur ce domaine est obtenue pour une durée d'incubation de 60 minutes, nécessaire à l'hydrolyse complète du substrat. Bien qu'analytiquement performante, cette technique nécessite une installation de radiométrie conséquente avec un système d'élimination de déchets chauds complexe et onéreux.

Aucune méthode standardisée n'existe à ce jour pour le dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR, la plupart des techniques développées par les quelques laboratoires s'y prêtant utilisent des méthodes adaptées du dosage sérique qu'ils proposent ou d'une technique commercialisée mais peu sensible. Le laboratoire Bühlmann® a développé une méthode de dosage par spectrophotométrie sur plaque utilisant le FAPGG comme substrat. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être automatisée mais ne propose une limite de détection que de 1 UI/L avec un seuil pathologique à 2UI/L, la quantification précise, même des valeurs faibles, reste importante pour le suivi des patients et l'évolution de l'activité. Une telle étroitesse analytique rend donc l'utilisation de cette technique difficile telle quelle.

#### **4) Le processus qualité**

##### *a) La démarche qualité en France*

Au XIXe siècle une volonté de normalisation européenne apparaît dans différents domaines techniques, industriels, économiques et scientifiques. Cet élan débouche sur la création de l'International Organization for Standardization (ISO) regroupant 25 pays. L'objectif est de définir des normes, des lignes directrices consensuelles sous l'égide d'une organisation d'experts reconnue, pour permettre l'échange, la transparence et la communication entre différents acteurs pour le développement ou l'utilisation de services ou de procédés techniques (78).

Dans les laboratoires de biologie médicale on parle alors de certification et d'accréditation. La certification correspond à la reconnaissance du système qualité de l'organisme, alors que l'accréditation requiert en plus une reconnaissance de sa compétence technique, il s'agit donc d'un niveau d'exigence plus élevé. Dans les faits l'accréditation du laboratoire signifie qu'un organisme faisant autorité reconnaît qu'il est compétent pour effectuer les prestations analytiques comprises dans sa portée d'accréditation (79).

Une ordonnance du 13 Janvier 2010 rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon un calendrier se déroulant initialement jusqu'en Novembre 2020, puis Avril 2021.

En 2004, paraît la première version de la norme ISO 15189 mettant à plat l'exigence qualité dans les laboratoires de biologie médicale pour en permettre l'accréditation. Depuis 2012 elle oblige l'organisation du laboratoire en différents processus (direction, qualité, métier et support). En France, l'organisme chargé de l'accréditation des laboratoires est le COFRAC (Comité Français d'Accréditation). Chaque laboratoire lors de son processus d'accréditation y a un responsable dédié, appelé le pilote. Celui-ci désigne une équipe d'évaluation qui émet un rapport sur l'ensemble des dossiers qui lui ont été transmis hors-site. Les évaluateurs se déplacent ensuite sur site où l'équipe du laboratoire apporte les réponses posées dans l'évaluation initiale. Un nouveau rapport est alors soumis au COFRAC qui délivre, ou non, l'accréditation. Des réévaluations ont lieu tous les ans avec des visites de contrôle puis de renouvellement organisées en cycle de quatre puis cinq ans (80).

Les analyses accréditées forment la portée d'accréditation du laboratoire qui s'organise en lignes de portée, regroupant les analyses en sous-familles par thématiques. Depuis peu, les analyses ne sont plus accréditées une à une mais par ligne de portée.

#### *b) Vérification et validation de méthode*

Il s'agit d'une démarche permettant de démontrer que la méthode analytique répond au besoin du laboratoire en termes de performance analytique. Il faut ainsi prouver que la méthode donne des résultats fiables dans les conditions opératoires du laboratoire. La vérification/validation est réalisée initialement avant l'entrée en routine de la technique puis de façon continue dans le temps.

En biologie médicale on peut définir deux grands types de méthode :

- Les méthodes quantitatives dont le résultat est basé sur des données numériques.
- Les méthodes qualitatives semi quantitatives, qui fournissent un résultat basé sur la conversion de données numériques (évaluation par rapport à un seuil).
- Les méthodes qualitatives qui fournissent des résultats issus de données non numériques (identification microscopique, présence ou absence d'un composé par exemple).

La vérification d'une méthode permet de confirmer que les performances annoncées sont bien atteintes et maîtrisées dans le contexte du laboratoire dans son domaine d'application avant mise en application en routine. Elle s'applique pour des méthodes

reconnues marquées Conformes aux Exigences, distribuées par des fournisseurs qui les ont déjà validées. On parle alors de portée A.

La validation d'une méthode permet de démontrer que les performances requises et les domaines d'application correspondent aux besoins de fiabilité analytique et qu'elles sont maîtrisées par le laboratoire. Elle s'applique pour des méthodes non reconnues, adaptées ou mises au point par le laboratoire. On parle de portée B.

La norme ISO 15189 stipule que « le laboratoire doit vérifier ou valider lui-même les méthodes qu'il emploie ». Le COFRAC a édité différents guides de vérification/validation, notamment le SH GTA-04. Il propose également le document type SH FORM 43, qui devra être rempli pour vérifier ou valider une méthode puis transmis au COFRAC avant un audit (79).

Une vérification/validation de méthode se compose de plusieurs étapes :

- Sélection de la méthode et définition des critères de performances et des limites d'acceptabilité.
- Analyse de risque, identifier les points critiques et mettre en place des moyens de contrôle.
- Définir et réaliser un plan d'expérimentations
- Formaliser le dossier et conclure sur l'aptitude à l'emploi de la méthode.

## **5) Objectifs**

Les objectifs de ce travail ont été de développer et mettre en place une méthode de dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR au sein du service de Biochimie du laboratoire du centre hospitalier universitaire de Caen. L'idée étant de remplacer une méthode de spectrofluorimétrie en cuve déjà en place mais nécessitant du matériel vieillissant ne pouvant être remplacé, ainsi qu'un temps technicien considérable. Mise en place en 2010, cette ancienne méthode n'avait pas été soumise à la validation de méthode exigée ici par le COFRAC. La technique retenue est la spectrofluorimétrie sur plaque 96 puits. Il s'agit ensuite de monter le dossier de validation de méthode et d'en évaluer les performances.

# MATERIEL ET METHODES

## 1) Matériel et réactifs

### a) Réactifs

La méthode retenue est la spectrofluorimétrie sur plaque en utilisant le kit calibrant et contrôles Bühlmann® avec un substrat Sigma-Aldrich® différent de celui prévu dans le kit Bühlmann®.

Le substrat est l'Abz-FRK(dnp)P-OH trifluoroacetate Sigma-Aldrich®. L'acide ortho-aminobenzoïque (ortho-aminobenzoic acid ou Abz) est un groupement fluorescent qui est séparé par 3 acides aminés (FRK : phenylalanine, arginine et lysine, site de coupure par l'ECA) du 2,4 dinitrophényl (Dnp), utilisé comme "quencher" de la fluorescence. Une fois séparé du Dnp, qui empêche l'émission de fluorescence, suite à l'action de l'ECA (Figure 16), l'Abz provoque une augmentation de la fluorescence détectée à 465 nm après excitation à 340 nm. Ce substrat a été sélectionné suite à la publication d'Alves et al (76).

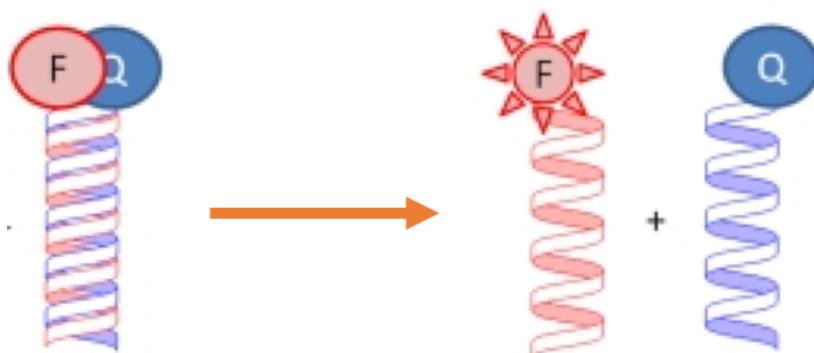


Figure 16 Schéma de l'interaction entre un agent fluorescent et son quencher, avant et après hydrolyse.

Un flacon de poudre contenant 1 mg de substrat est repris dans 1,2 mL de DMSO (diméthyl sulfoxyde) Sigma-Aldrich® puis aliquoté et congelé à -20°C.

Le kit Bühlmann® utilisé est le « ACE high sensitive » et comprend un calibrant B-ACE-CA et deux contrôles (haut et bas) B-ACE-CONSET. Tous trois sont à reconstituer dans 2 mL d'eau désionisée. Les solutions reconstituées sont conservées à +4°C.

Le tampon réactionnel à pH 7 est préparé en amont et congelé à -20°C. Sa formulation est issue de la publication d'Alvès et al (76). Pour 100 mL de tampon :

- 10 mL de solution Tris-HCL 1M INVITROGEN Ultra-Pure® (concentration finale : 0,1M)
- 100 µL d'une solution de ZnCl<sub>2</sub> 0,01M préalablement préparée et congelée à -20°C (ZnCl<sub>2</sub> Sigma-Aldrich®)(concentration finale : 10<sup>-5</sup>M)
- 292,2 mg de NaCl Sigma-Aldrich® (concentration finale : 0,05M)
- Eau désionisée

#### *b) Spectrofluorimétrie*

Le lecteur de plaque utilisé pour le développement et l'utilisation en routine de la méthode est un Infinite® F200 PRO de Tecan®, utilisable en absorbance, fluorescence ou luminescence. Il est réglé comme suit :

- Température : 37°C
- Gain : 85%
- Incubation : 10 minutes
- Lecture : 20 minutes
- Nombre de flashes : 1
- Longueur d'onde d'excitation : 340 nm
- Longueur d'onde d'émission : 465 nm
- Mesure toutes les 40 secondes

Les plaques utilisées sont les microplaques 96 puits OptiPlate® blanches de PerkinElmer®.

Le logiciel d'exploitation du lecteur est Magellan® v7.2.

Les données de fluorescence sont reportées et analysées avec Microsoft® Excel.

## 2) Mise au point de la méthode

### a) Principe de la mesure

Après 10 minutes d'incubation à 37°C dans le lecteur, la fluorescence est mesurée dans chaque puits de la plaque toutes les 40 secondes pendant 20 minutes. Chaque échantillon est déposé en triplicate. Cette mesure se fait dans l'intervalle de temps où l'activité de l'ECA est linéaire, la phase stationnaire. L'activité de l'enzyme est calculée dans cette phase avec la pente de la courbe de variation de la fluorescence en fonction du temps (Figure 17).

Temps	Echantillon 1			Echantillon 2		
0	20000	19411	19261	15640	15981	15926
40	20452	19891	19466	16180	16056	15710
80	20802	19800	19503	16031	15815	16015
120	20275	19993	19830	15654	15669	16107
160	20665	19656	19856	15785	15665	15934
200	20907	20092	19964	16224	15480	16312
240	20857	19950	20134	17999	15890	16178
280	21149	20354	20351	21416	15785	16533
320	21078	20341	20360	24194	15697	16792
360	21264	20328	20522	25697	15423	16361
400	21391	20499	20550	26986	15624	16580
440	21559	20728	20722	31979	15890	16702
480	21560	21013	20865	36559	16156	16916
520	21793	21427	21009	41377	15949	16547
560	22051	20993	21729	43464	15782	16197
600	22143	21349	21160	39164	16150	16340
640	22437	21442	21696	40111	15614	16449
680	22415	21519	21367	41203	15951	16658
720	22527	21879	21881	42834	16056	16454
760	22739	21791	22057	40953	15811	16462
800	22753	22148	22374	38276	15721	16613
840	22886	21839	22180	34548	16114	16511
880	23182	22326	22360	35845	16073	17013
920	23481	22295	22456	31833	16089	16919
960	23466	22092	22650	30019	16196	16957
1000	23497	22653	23082	29207	16037	16756
1040	24143	23009	22906	29024	16314	16607
1080	23938	22827	23033	36059	16088	17261
1120	23997	23297	23380	34282	16423	17462
1160	24111	23137	23368	34146	16526	16997
1200	24809	23327	23602	26802	16062	16956

	Echantillon 1			Echantillon 2		
R <sup>2</sup>	0,990960525	0,987368455	0,993350816	0,630026856	0,633320096	0,807250744
Moyenne R <sup>2</sup>	0,990559932			0,690199232		
Pente	3,585362903	3,2221875	3,577953629	0,4546875		
Moyenne	3,461834677			0,674969758		

Figure 17 Compilation des données de fluorescence

La linéarité de l'augmentation de la fluorescence est appréciée par le coefficient de Pearson ( $R^2$ ), plus il est proche de 1, plus les valeurs sont linéaires. Pour chaque triplicate on exclut un point si  $R^2 < 0,98$ , on accepte le triplicate lorsque les deux autres points ont un  $R^2$  supérieur à 0,98 (Figure 18). Si ce n'est pas le cas et que cela concerne les points de calibration ou les contrôles, on refait l'essai. Si cela concerne un échantillon patient, il est redéposé dans la série suivante.

Moyenne des $R^2$			Numéro de l'échantillon		
0,998216734	2063320 1/5	0,99831218	0,997222691	2151933 1/5	0,99558366
12,17883065	11,4993044	0,997917198	11,89275202	0,668528759	5,99517137
	11,85696237			5,73469758	5,864934476
				0,01282465	0,99717796

Moyenne des pentes

Figure 18 Calcul des données de qualification d'un échantillon

Pour chaque triplicate on calcule la pente de la droite de régression de chaque puits valide. On fait ensuite la moyenne des pentes pour n'en ressortir qu'une par triplicate (Figure 18). On considère qu'une valeur de pente correspond à une valeur d'activité de l'ECA qui sera déterminée grâce à la gamme de calibration.

### b) Gamme de calibration

Pour doser l'activité de l'ECA dans les échantillons de LCR on se base sur un calibrant d'activité connue utilisé à plusieurs dilutions, qui ont été définies afin de permettre de doser des patients avec des activités normales et pathologiques. On établit une courbe de calibration à partir des activités de ces différentes dilutions, celles-ci doivent être proportionnelles entre elles, le coefficient de variation (CV) accepté entre les différentes dilutions est de 20%. On calcule les moyennes des pentes de chaque triplicate (un triplicate par point de calibration), on établit ensuite une droite de calibration des pentes des points de calibrations en fonction de l'activité connue (Figure 19).

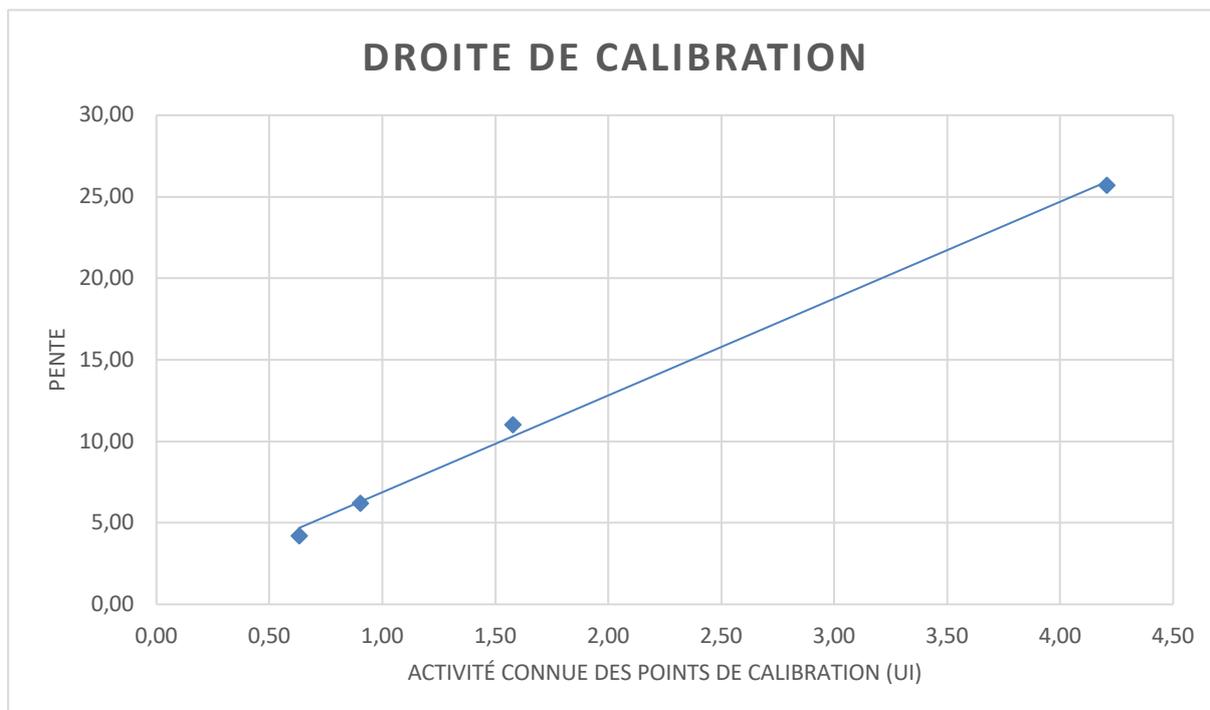


Figure 19 Exemple de droite de calibration.

Les activités de la plus forte et de la plus faible dilution représentent les bornes de calibration, valeurs entre lesquelles un résultat fiable peut être rendu.

La gamme de calibration retenue comporte quatre points, des dilutions à 1/15, 1/40, 1/70 et 1/100 du calibrant. Des dilutions inférieures à 1/15 donnant des signaux trop forts dépassant les capacités du lecteur. Des dilutions supérieures à 1/100 rendant trop souvent des  $R^2 < 0,98$ . L'activité de calibrant annoncée par le fournisseur varie en fonction du lot, un seul flacon est utilisé jusqu'à épuisement ou péremption, donc jamais plus d'une valeur d'activité n'est utilisée sur une même période. Cette activité se situe généralement autour de 11 UI/L, on peut donc approximer les points de calibration à 0,11, 0,16, 0,27 et 0,73 UI/L.

Une gamme de calibration est réalisée pour chaque série de mesure d'échantillons.

### c) Détermination de l'activité

L'activité ECA LCR de chaque patient (ALCR Patient) sera calculée à partir de l'activité du calibrant (ACalibrant), de la moyenne des pentes du calibrant (Pente Calibrant) et de la pente obtenue pour l'échantillon (Pente LCR Patient) à mesurer selon la formule suivante :

$$\frac{ACalibrant}{PenteCalibrant} = \frac{ALCRPatient}{PenteLCRPatient} \qquad \frac{ACalibrant \cdot Pente LCR Patient}{PenteCalibrant} = ALCRPatient$$

#### *d) Contrôles*

Le kit commercial Bühlmann® « ACE high sensitive » contient un contrôle bas et un contrôle haut. Un contrôle supplémentaire a été rajouté avec la constitution d'un pool de plusieurs LCRs analysés en biochimie pour les dosages classiques. Les critères utilisés pour l'inclusion d'un échantillon dans le pool sont :

- Aspect clair
- Examen cytologique normal (< 10 éléments par microlitre)
- Recherches microbiologiques et virologiques négatives
- Biochimie normale (protéinorachie, glycorachie, sodium, chlore et lactate déshydrogénase dans les valeurs usuelles)
- Patient d'un service autre que la neurologie ou la neurochirurgie

Chacun de ces trois contrôles est passé à chaque série.

### **3) Protocole**

L'intégralité de la fiche technique est disponible en annexe (Annexe 1).

#### *a) Phase pré-analytique*

Les échantillons de LCR sont centrifugés à 10 000 tours par minute pendant deux minutes puis aliquotés (deux fois 60µL) et peuvent être conservés à +4°C pendant 7 jours ou congelés à -20°C. Les échantillons hémorragiques ne sont pas traités du fait de la contamination sérique.

#### *b) Préparation des réactifs*

Préparation du tampon réactionnel :

On dilue le substrat au 1/80<sup>ème</sup> dans du tampon, ex : 1580µL de tampon + 20µL de substrat. Protéger le tube de la lumière en l'enveloppant avec du papier d'aluminium.

Préparation des dilutions du calibrant :

On prépare des dilutions du calibrant aux :

- 1/100<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 495µL de Tampon
- 1/70<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 345µL de Tampon

- 1/40<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 195µL de Tampon
- 1/15<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 70µL de Tampon

Préparation des dilutions de contrôles :

Les contrôles sont dilués au 1/15 :

- 5µL de contrôle bas Bühlmann + 70µL de Tampon
- 5µL de contrôle haut Bühlmann + 70µL de Tampon

Préparation du Pool LCR :

Le pool est dilué au 1/5<sup>ème</sup> : 15µL Pool LCR + 60µL de tampon

Préparation des échantillons de LCR :

Les LCR patients sont de base tous dilués au 1/5<sup>ème</sup>, dilution permettant un bon positionnement dans la gamme de la majorité d'entre eux et, le cas échéant d'augmenter la dilution dans un second temps pour les échantillons avec des activités élevées et hors gamme.

Si besoin de diluer l'échantillon de LCR :

- 1/7<sup>ème</sup> : 20µL de LCR + 120µL de tampon
- 1/10<sup>ème</sup> : 10µL de LCR + 90µL de tampon

Microcentrifuger les dilutions de calibrant/contrôles/LCR très brièvement pour récupérer tout le liquide au fond des tubes Eppendorf®.

### *c) Préparation de la plaque*

Un exemple de plan de plaque est représenté sur la Figure 20 (chaque condition est réalisée en triple).

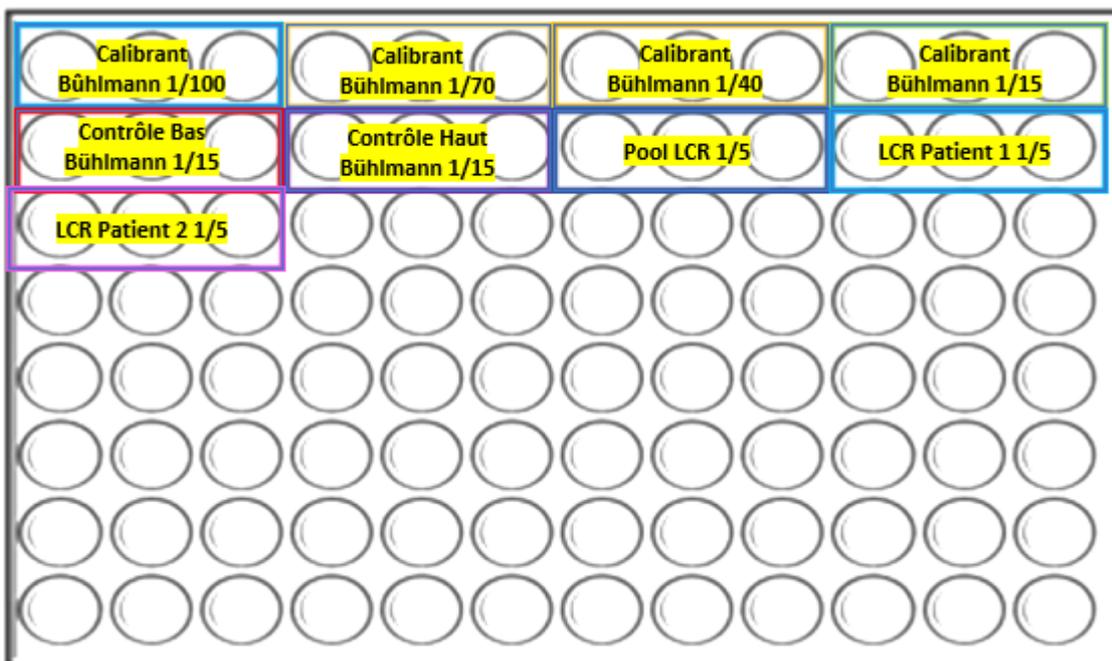


Figure 20 Plan de plaque

Déposer dans chaque puits 80µL de mélange tampon + substrat.

Ajouter les 20µL de calibrant/contrôle/LCR.

Il est déconseillé de passer plus de 10 échantillons dans une même série en raison d'un risque d'incapacité du lecteur à assurer la lecture de plus de 54 puits simultanés sur la durée nécessaire.

#### d) Lecture

Un point de mesure de la fluorescence est réalisé toutes les 40 secondes pendant 20 minutes sur chaque puits. Les résultats bruts de chaque mesure sont compilés et exportés sur un fichier Excel® depuis Magellan® pour analyse.

#### e) Analyse

Un fichier de calcul spécifique a été créé afin de déterminer le coefficient de Pearson ( $R^2$ ), la pente de la droite de régression pour chaque puits, ainsi que les moyennes de ces pentes correspondant à chaque triplicate. Il suffit d'y intégrer les résultats bruts précédemment obtenus.

Une représentation graphique regroupant par couleur les trois composantes d'un même triplicate est générée ainsi que la droite de calibration (Figure 21).

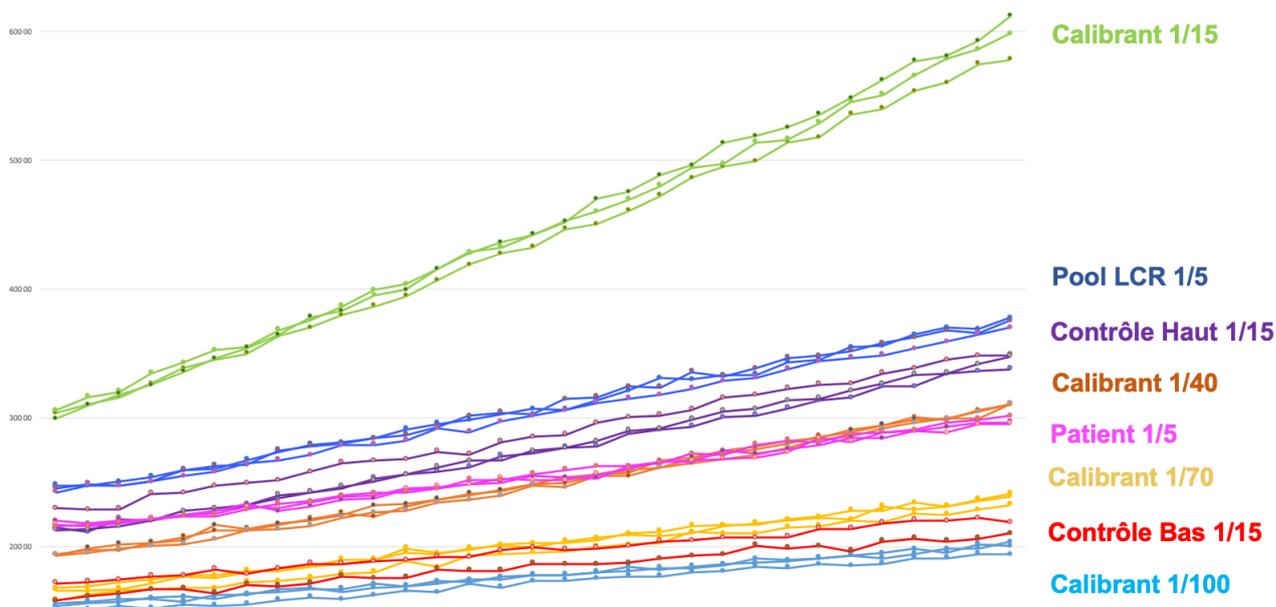


Figure 21 Exemple de représentation graphique de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps

Les résultats obtenus pour les contrôles et les patients sont calculés à partir des résultats obtenus sur la gamme de calibration et en fonction de l'activité du calibrant annoncée par le fournisseur.

La validation des résultats se fait après vérification de la validité de la gamme de calibration et des contrôles ( $R^2 < 0,98$  et valeurs concordantes avec celles annoncées par le fournisseur). Pour le pool LCR une période probatoire est instaurée à chaque nouvelle constitution d'un contrôle, afin d'établir une moyenne et un écart-type sur au moins 5 valeurs. La valeur du pool LCR sera considérée comme valide si elle se trouve dans la fourchette moyenne  $\pm 2$  écarts-type. Les échantillons sont considérés valides selon les mêmes règles ( $R^2 < 0,98$ ).

Un exemple de fichier de rendu de résultats complet est disponible en annexe avec le détail de la première page du fichier correspondant à la calibration et aux contrôles, puis un exemple des pages suivantes correspondant aux patients et reprenant les valeurs de calibration (Annexe 2).

## **4) Essais**

Les essais en vue de la validation de méthode ont été réalisés selon les recommandations du Guide technique d'accréditation de vérification/validation des méthodes en biologie médicale (SH GTA 04)(79). Afin d'établir un formulaire SH FORM 43 de validation de méthode, il a été mené des essais de répétabilité, reproductibilité, une détermination de valeurs usuelles, de linéarité, de comparaison de méthodes, de contamination, de variabilité inter-opérateurs, de spécificité et de robustesse. Une proposition de ce formulaire est disponible en annexe (Annexe 3).

## **RESULTATS**

### **1) Détermination de la phase stationnaire**

Toute mesure enzymatique s'effectue dans des conditions de vitesse initiale afin de garder une activité enzymatique constante pendant toute la durée de la lecture. Cette phase correspond à une concentration en excès de substrat par rapport à l'enzyme et reflète l'activité réelle de l'enzyme en fonction de sa concentration. Après cette phase, l'activité enzymatique diminue pour devenir nulle à la phase d'équilibre (Figure 22).

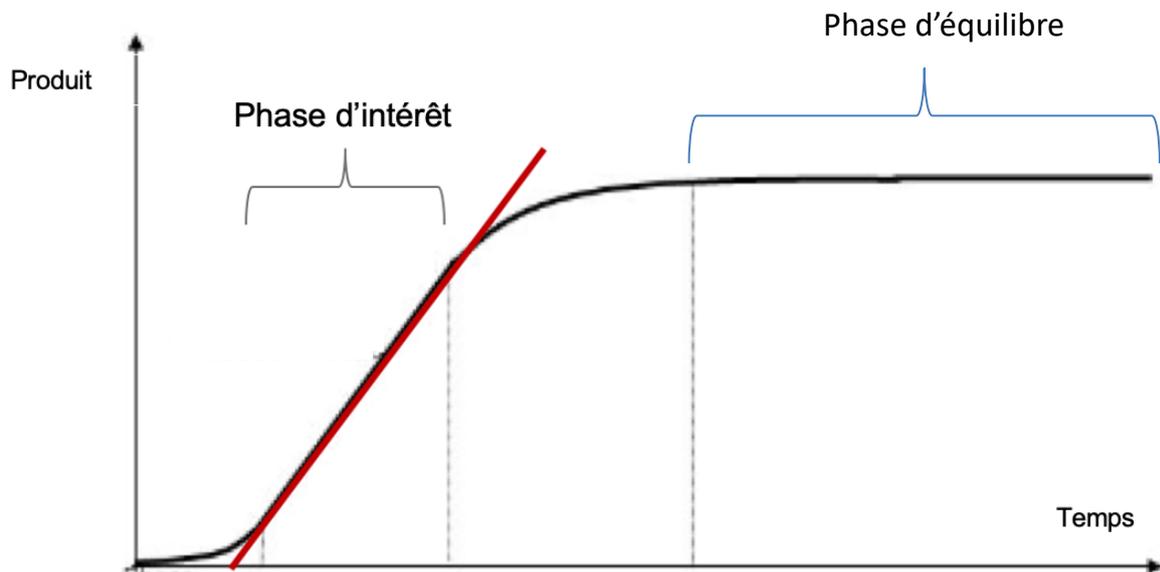


Figure 22 Cinétique enzymatique

Ici le principe est donc de mesurer l'augmentation de la fluorescence à 465 nm émise par le substrat après clivage par l'ECA. Au début de la réaction la fluorescence est donc à un niveau basal, puis augmente au fur et à mesure de l'action de l'enzyme. Afin de définir la période de vitesse initiale on réalise un essai sur une heure avec plusieurs dilutions du calibrant. On observe alors une linéarité de l'augmentation de la fluorescence, et donc de l'activité de l'enzyme à partir de 15 minutes de mesure et ce jusqu'au moins une heure (Figure 23).

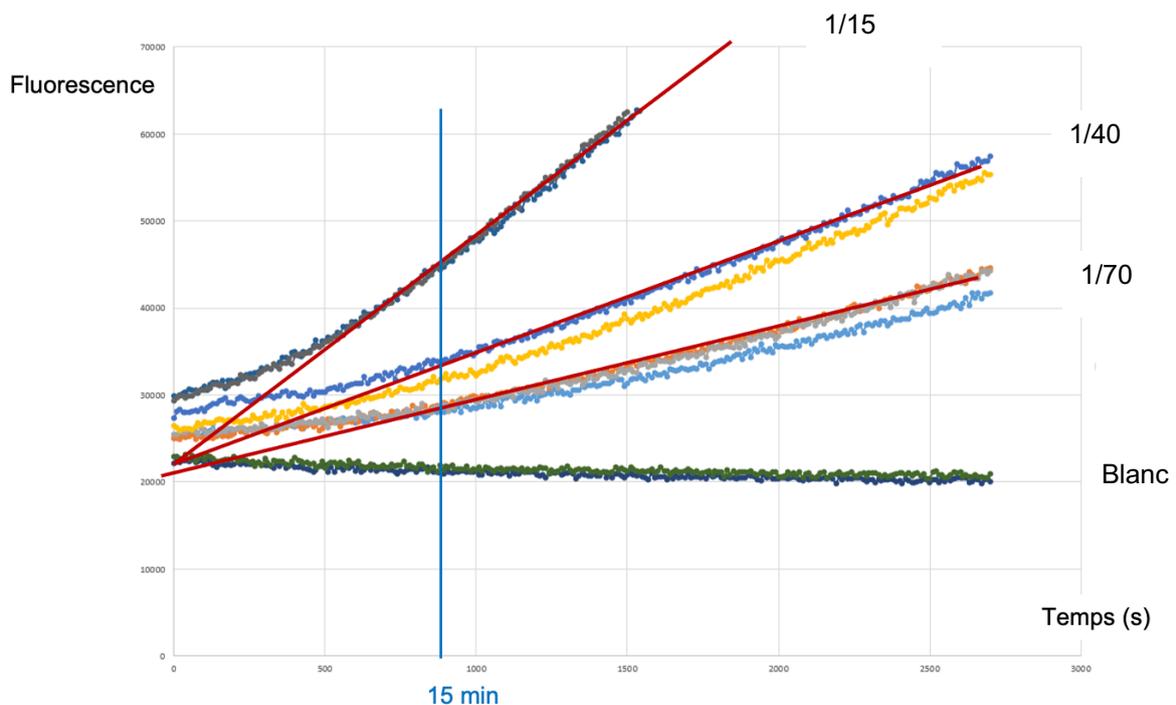


Figure 23 Détermination de la phase stationnaire

## 2) Répétabilité

Elle consiste à analyser plusieurs fois un même échantillon dans des conditions identiques dans un délai le plus court possible (81). Elle a été effectuée à partir d'un pool de LCR ainsi que des contrôles commerciaux haut et bas, chacun au sein d'une même série. Comme précisé précédemment le nombre d'échantillons pouvant être inclus dans une série est limité à 10. Afin d'avoir la meilleure visibilité possible sur la performance, l'approche en triplicate a été écartée et chaque puits a été considéré individuellement. Les CV obtenus sont tous inférieurs à 20%, limite généralement utilisée pour les techniques non automatisées (Tableau 6)(81).

Tableau 6 Détermination de la répétabilité

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Conclusion
Pool LCR	29	1,59	0,091	5,71	Valide
Contrôle Bas	28	2,27	0,139	6,12	Valide
Contrôle Haut	27	5,33	0,189	3,55	Valide

## 3) Reproductibilité

Aussi nommée fidélité intermédiaire, elle consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un paramètre (81). Elle a été effectuée sur les mêmes contrôles que la répétabilité mais chaque essai fait partie d'une série différente, toutes réalisées entre Mars et Avril 2020 (Tableau 7).

Tableau 7 Détermination de la reproductibilité

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Conclusion
Pool LCR	12	1,79	0,163	9,15	Valide
Contrôle Bas	26	2,46	0,199	8,11	Valide
Contrôle Haut	26	5,78	0,525	9,15	Valide

#### 4) Variabilité inter-opérateurs

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non-automatisées. Elle a été calculée pour quatre opérateurs, avec chacun cinq passages des contrôles commerciaux (même lot) et d'un même pool de LCR. La variabilité est estimée grâce au Z score exprimant, pour chaque opérateur sur chaque contrôle, le nombre de dérivations standards (DS) de la moyenne des cinq passages de l'opérateur vis-à-vis de la valeur cible, ici la moyenne globale. On considère que la variabilité est valide pour les opérateurs lorsque le Z Score est compris entre -2 et +2 (Tableau 8).

$$Z \text{ Score} = \frac{\text{MoyenneOpérateur} - \text{MoyenneGlobale}}{\text{ÉcarttypeGlobal}}$$

Tableau 8 Détermination de la variabilité inter-opérateurs

Opérateur	Échantillon	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Z Score	Conclusion
Opérateur 1	Pool LCR	1,75	0,198	11,3	0,42	Valide
	Contrôle Bas	1,99	0,418	21,1	-0,54	Valide
	Contrôle Haut	5,35	0,404	7,5	-2,07	Non valide
Opérateur 2	Pool LCR	1,63	0,382	23,4	-0,50	Valide
	Contrôle Bas	2,18	0,384	17,6	0,80	Valide
	Contrôle Haut	6,00	0,721	12,0	1,27	Valide
Opérateur 3	Pool LCR	1,68	0,334	19,9	-0,11	Valide
	Contrôle Bas	2,23	0,157	7,0	1,21	Valide
	Contrôle Haut	5,92	0,285	4,8	0,89	Valide
Opérateur 4	Pool LCR	1,72	0,101	5,9	0,19	Valide
	Contrôle Bas	1,86	0,157	8,4	-1,46	Valide
	Contrôle Haut	5,73	0,583	10,2	-0,10	Valide

<b>Pool LCR :</b>	Moyenne globale = 1,69	Écart-type global = 0,128
<b>Contrôle Bas :</b>	Moyenne globale = 2,06	Écart-type global = 0,142
<b>Contrôle Haut :</b>	Moyenne globale = 5,75	Écart-type global = 0,193

Trois opérateurs sur quatre sont dans les critères de validité, le dernier opérateur est non valide sur le contrôle haut qui est légèrement trop faible.

## 5) Incertitudes de mesure

Elle caractérise la dispersion des valeurs attribuées à une analyse. Elle complète un résultat brut et constitue une aide à l'interprétation en permettant par exemple d'apprécier le risque par rapport à un seuil décisionnel (82). Elle peut être estimée via quatre méthodes différentes selon les recommandations du COFRAC dans le SH GTA 14, guide technique destiné à l'évaluation de l'incertitude en biologie médicale. La méthode de référence GUM (Guide of Uncertainty of Measurement) n'est pas applicable ici puisqu'elle nécessite de connaître précisément et de manière chiffrée les caractéristiques physico-chimiques du procédé. Deux autres méthodes proposées utilisent les données de justesse ou d'exactitude qui ne peuvent pas être estimées ici en raison de l'absence de laboratoires pairs pour un partage de CIQ externalisés ou de programme d'EEQ. La dernière méthode, celle utilisée ici, propose un calcul de l'incertitude pour une concentration donnée à partir des variances d'un CIQ à cette concentration et d'un étalon fournisseur (Tableau 9). L'étalon utilisé ici est le calibrant dont les données de test ont été fournies par le fournisseur (écart-type 0,078).

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(Etalon_{fournisseur})}$$

Avec :  $u$  l'incertitude,  $C$  l'activité

Tableau 9 Détermination des incertitudes de mesure

<b>Échantillon</b>	<b>Écart-type</b>	<b>Incertitude</b>
Pool LCR	0,163	0,18
Contrôle Bas	0,199	0,21
Contrôle Haut	0,525	0,53

## 6) Étendue de mesure

### a) Limite de détection

Elle est déterminée par le passage de 10 blancs dans une même série. Seul le substrat est déposé dans le tampon, l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. Le calcul de l'écart-type permet d'estimer la limite de détection (Tableau 10).

Tableau 10 Détermination de la limite de détection

Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Activité (UI/L)	-0,05	-0,06	0,04	-0,04	-0,05	-0,04	-0,05	-0,04	-0,06	-0,04

**Moyenne** = -0,04 UI/L

**Écart-type** = 0,03 UI/L

**Limite de détection** = 0,01 UI/L

Les valeurs négatives s'expliquent par la perte de fluorescence du substrat après excitation sans libération du fluorochrome au cours du temps. La limite de détection est calculée dans un intervalle de confiance de 95% :

$$LOD = Moyenne + 1,96.EcartType$$

### b) Limite de quantification et linéarité

Elle correspond à la valeur la plus faible mesurée, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable. Il s'agit de la plus petite valeur pouvant être rendue comme résultat pour un échantillon de patient. Elle s'obtient en multipliant par 10 l'écart-type de la série de blancs.

La limite de quantification correspond donc à la plus petite activité dosée et pouvant être rendue, à savoir 0,30 UI/L.

La linéarité se détermine grâce au passage de plusieurs dilutions d'un échantillon d'activité forte. Ici, on se base sur le calibrant d'activité 12,62 UI/L utilisé lors de la mise en place de la gamme de calibration. La dilution la plus forte permettant de qualifier le triplicate est de 1/100, et la dilution la plus faible ne dépassant pas les capacités du lecteur est 1/15. Un CV de moins de 20% est retrouvé de manière reproductible entre chacune des dilutions et les deux extrêmes, signifiant ainsi une linéarité entre 0,13 et 0,84 UI/L.

Un essai consistant à doser des séries comprenant plusieurs dilutions d'un pool de LCR d'activité connue a été mené afin de déterminer les limites haute et basse de la technique en termes de quantification. La dilution la plus forte était de 1/20 et la plus faible de 2/3. Cela a également permis de jauger la linéarité du résultat rendu pour les dilutions dont le résultat était acceptable.

Tableau 11 Essai de linéarité. Les résultats sont exprimés bruts et rapportés au facteur de dilution.

<b>Dilution</b>	<b>1/3</b>	<b>1/4</b>	<b>1/5</b>	<b>1/7</b>	<b>1/10</b>	<b>1/15</b>
<b>Activité brute (UI/L)</b>	0,53	0,43	0,33	0,27	0,16	0,10
	0,55	0,39	0,33	0,24	0,17	0,10
<b>Activité (UI/L)</b>	1,79	1,73	1,66	1,88	1,57	1,54
	1,84	1,58	1,67	1,72	1,68	1,57

**Moyenne** = 1,68 UI/L

**Écart-type** = 0,105 UI/L

**CV** = 6,2%

Les dilutions au 1/20, au 1/2 et au 2/3 ne peuvent être incluses, la première en raison d'une répétabilité trop faible pour un  $R^2 > 0,98$ , les deux autres en raison du dépassement de la capacité de lecture de l'appareil par la fluorescence émise. Chaque dilution a été passée en double, soit deux triplicate par niveau de dilution (Tableau 11).

## 7) Valeurs de référence

Elles ont été déterminées sur 50 échantillons de LCR conservés dans le laboratoire de Biochimie après réalisation des dosages usuels (protéinorachie, glycorachie ...). La sélection des échantillons s'est faite parmi ceux traités et congelés dans les six derniers mois au laboratoire. Les critères de sélection étaient les mêmes que ceux de réalisation du pool de LCR.

Les 50 échantillons ont été passés sur un total de sept séries différentes. Chaque échantillon correspond à un patient. Les résultats sont disponibles dans le Tableau 12.

Tableau 12 Activités des 50 échantillons de LCR « témoins » analysés (UI/L)

2,21	1,14	1,08	1,05	1,13
1,46	1,53	1,37	1,41	1,35
1,95	1,40	1,12	0,70	0,77
1,76	1,24	1,81	0,99	1,02
1,30	1,39	1,49	1,69	1,09
1,53	0,65	0,89	1,03	0,69
2,50	1,90	1,23	1,41	0,70
1,58	0,50	1,17	0,50	1,63
1,28	1,92	1,40	1,29	2,15
2,21	0,95	0,93	1,30	2,09

**Moyenne** = 1,33 UI/L

**Médiane** = 1,30 UI/L

**Écart-type** = 0,460 UI/L

D'un point de vue statistique, la répartition des valeurs suit une loi normale ( $p < 0,05$ ) et les valeurs de référence sont estimées dans un intervalle de confiance à 95%. Les bornes basse et haute sont respectivement calculées en soustrayant et en ajoutant deux écarts-type à la moyenne.

On obtient comme valeurs 0,44 et 2,19 UI/L. Pour en faciliter l'usage l'intervalle de référence retenu sera **0,40 à 2,20 UI/L**.

## 8) Comparaison de méthodes

La comparaison de méthode a été réalisée rétrospectivement sur 30 échantillons de LCR pour lesquels le dosage de l'activité de l'ECA avait été fait dans le service de Biochimie, avec une technique de spectrofluorimétrie se basant sur les mêmes principes physiques que celle développée ici. Le substrat était identique mais le calibrant et les contrôles n'étaient pas les mêmes, la mesure était effectuée en cuve donc chaque calibrant, contrôle et échantillon était passé individuellement. Le tampon réactionnel était identique mais le mode opératoire différait dans les volumes nécessaires : 200  $\mu$ L de prise d'essai d'échantillon (versus 15  $\mu$ L actuellement) pour un volume réactionnel total de 1 mL (versus 100  $\mu$ L actuellement).

Il n'a pas été possible de passer des échantillons en parallèle sur les deux méthodes en raison d'une défaillance de l'ancien lecteur et de son système d'exploitation, le rendant définitivement inutilisable alors que seuls les premiers tests avaient été menés avec la méthode mise en place.

Les échantillons de LCR sélectionnés ont été prélevés 8 à 6 mois avant l'essai et congelés à -20°C. Ils sont passés en méthode sur plaque sur quatre séries différentes. La sélection s'est faite sur la base de l'activité dosée initialement afin de couvrir une gamme de résultats la plus large possible (Tableau 13).

Tableau 13 Comparaison de méthode sur 30 échantillons. L'interprétation des résultats s'est faite à partir des valeurs usuelles définies pour chaque méthode et l'absence de concordance correspond à un résultat rendu normal par une technique et pathologique avec l'autre

Patient	Cuve	Plaque	Concordance
1	0,8	0,92	Oui
2	1,6	2,50	Oui
3	1,2	1,75	Oui
4	1,6	2,43	Oui
5	0,5	0,52	Oui
6	1,8	2,74	Oui
7	0,9	2,16	Oui
8	1,6	1,18	<b>Non</b>
9	0,9	1,55	Oui
10	0,9	1,05	Oui
11	1,4	2,00	Oui
12	0,8	1,02	Oui
13	0,9	1,65	Oui
14	1,4	0,85	<b>Non</b>
15	0,8	1,44	Oui
16	0,7	1,16	Oui
17	1,3	1,50	Oui
18	1,5	0,13	<b>Non</b>
19	1	0,45	Oui
20	1,3	1,84	Oui
21	0,8	0,86	Oui
22	1	1,34	Oui
23	1,3	1,49	Oui
24	1,3	0,90	Oui
25	0,3	0,24	Oui
26	1,3	1,77	Oui
27	1,1	4,75	<b>Non</b>
28	0,3	0,50	Oui
29	0,5	1,45	Oui
30	0,7	1,21	Oui

Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0,41 (16 patients sur 30 non corrélés), montrant une corrélation faible, mais statistiquement significative avec un  $p=0,024$ . Le diagramme de comparaison (Figure 24) montre une pente de 0,93 et une ordonnée de 0,45 alors que celles-ci sont censées se rapprocher de 1 et 0.

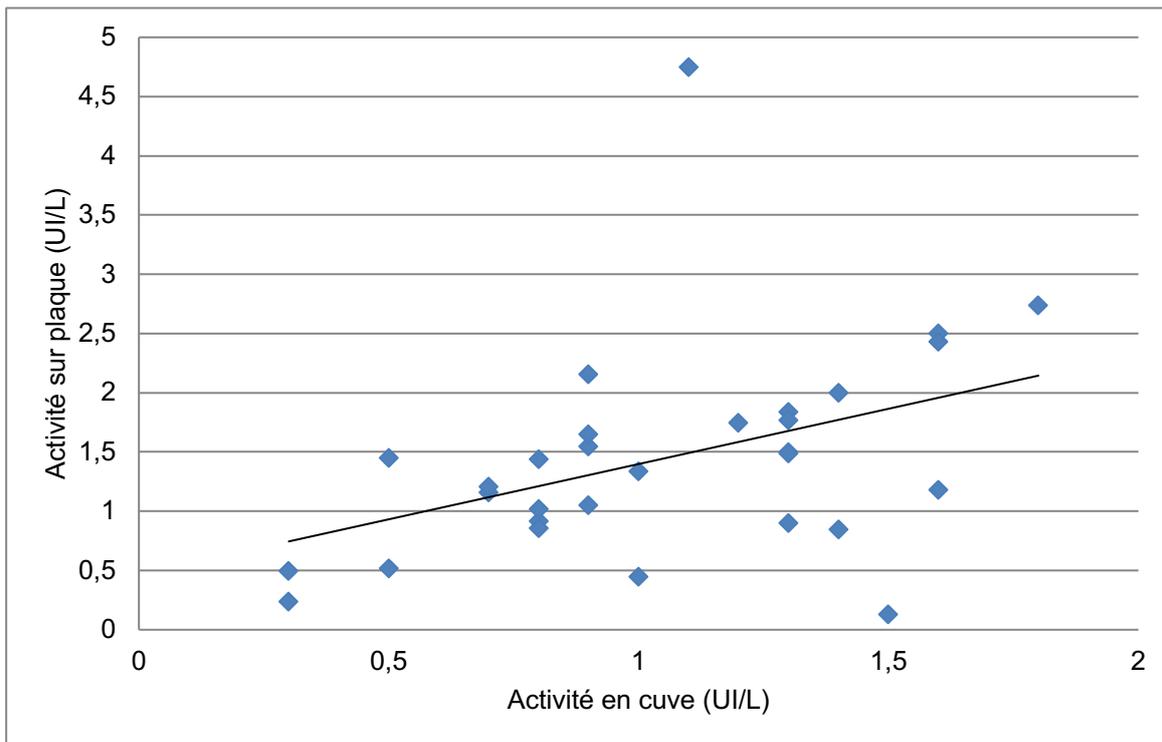


Figure 24 Corrélation entre les 2 méthodes de mesure

On observe quatre discordances d'interprétation des résultats (pathologique ou non) entre les deux méthodes.

## 9) Interférences et spécificité analytique

Deux sources de biais –ont été envisagées : la contamination sanguine du LCR par brèche vasculaire ou hémorragie méningée, et la prise d'IEC par le patient pouvant diffuser dans le LCR et potentiellement fausser le dosage.

Il est clair que la contamination sanguine du prélèvement fait très largement augmenter l'activité de l'ECA étant donnée la différence de concentrations entre les deux secteurs, un LCR hémorragique, macroscopiquement sanguinolent ou présentant un culot hématique après centrifugation, ne pourra donc pas être testé.

L'essai sur les IEC a été réalisé en ajoutant des concentrations croissantes de captopril ( $10^{-5}$  à  $10^{-11}$  M), un IEC bien connu, dans le milieu réactionnel afin d'en déterminer l'effet sur les résultats rendus sur le pool de LCR. L'essai a été réalisé à trois reprises, le premier n'ayant pu être qualifié en raison d'une non-validation des contrôles à tout

de même permis de constater l'absence totale d'activité lorsque le captopril est concentré à  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ou  $10^{-7}$  M. Les deux autres essais ont donc été menés à partir de  $10^{-7}$  M (Figure 25).

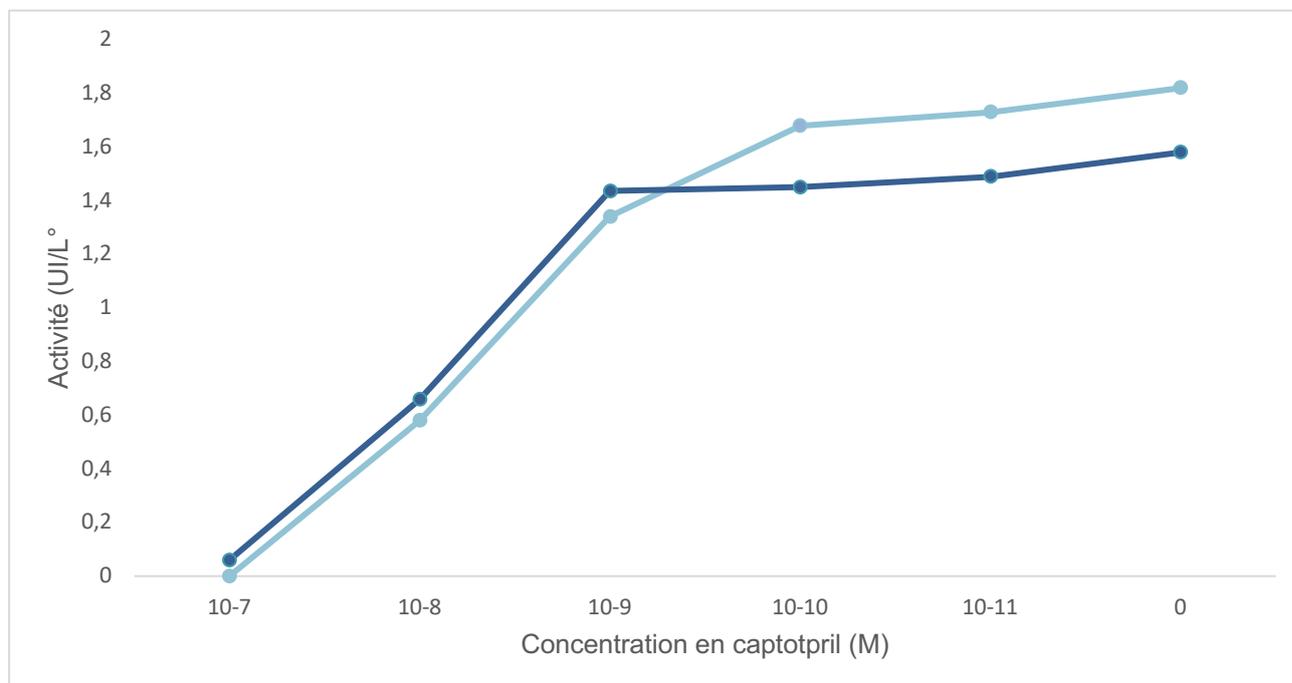


Figure 25 Essai d'interférence du captopril sur le dosage du pool LCR

Une détermination précise de la  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice à 50%) du captopril nécessiterait plus d'essais, mais on peut la situer ici entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M.

Afin de déterminer la spécificité analytique, le dosage a été réalisé à partir d'une solution d'ECA purifiée de poumon de lapin annoncée à 1 000 UI/L par le fournisseur (Sigma-Aldrich®). Après une dilution à 1/4 000 de cette solution (dilution la plus pertinente après plusieurs essais), le même essai que sur le pool LCR a été réalisé avec le captopril (Figure 26).

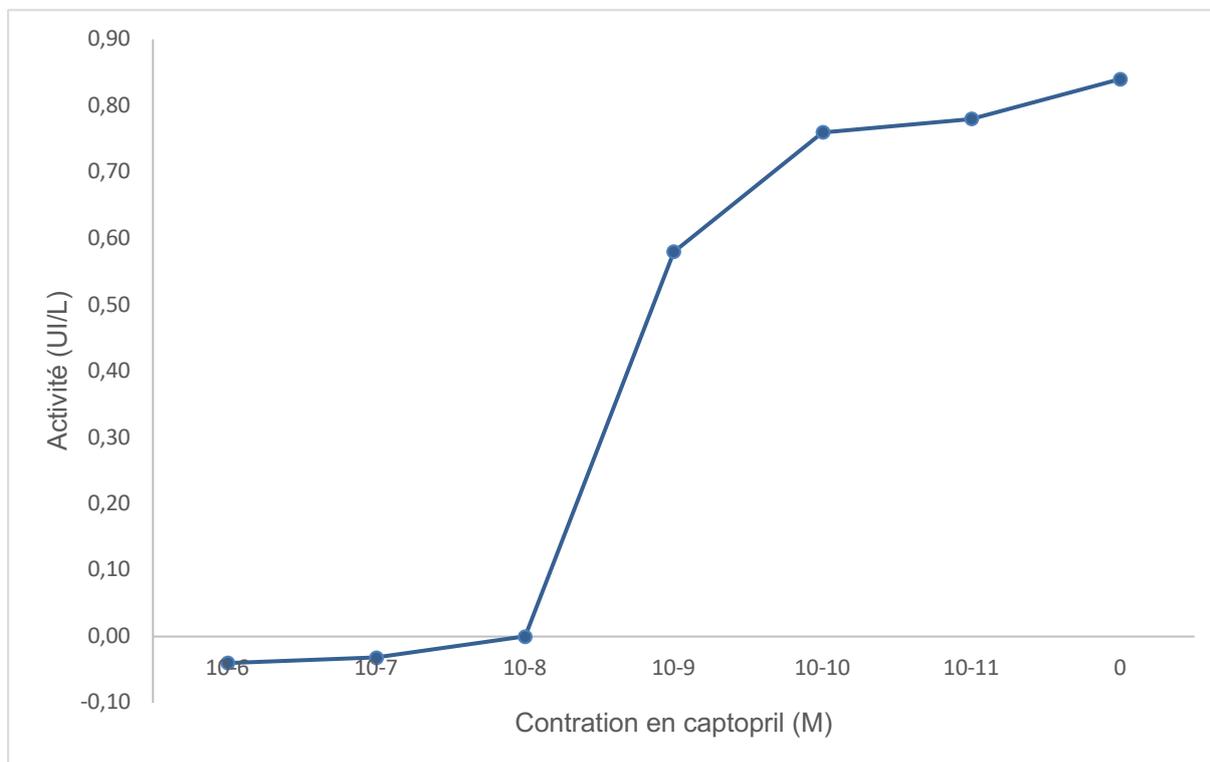


Figure 26 Essai de spécificité analytique avec de l'ECA purifiée et du captopril

À nouveau, il paraît difficile de chiffrer la CI50 du captopril sur ce seul essai mais elle s'avère également se situer entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M.

## 10) Contamination

Selon les recommandations du SH GTA-04 (81), un test de contamination inter-échantillon a été réalisé afin de vérifier l'absence d'interférence lorsque deux échantillons à activité élevée et basse sont à proximité sur la plaque. Pour cela une alternance de triplicates de blancs et du contrôle haut a été faite sur une même série selon le plan ci-dessous (Figure 27). Au total le contrôle haut et le blanc ont été dosés six fois chacun (Tableau 14).

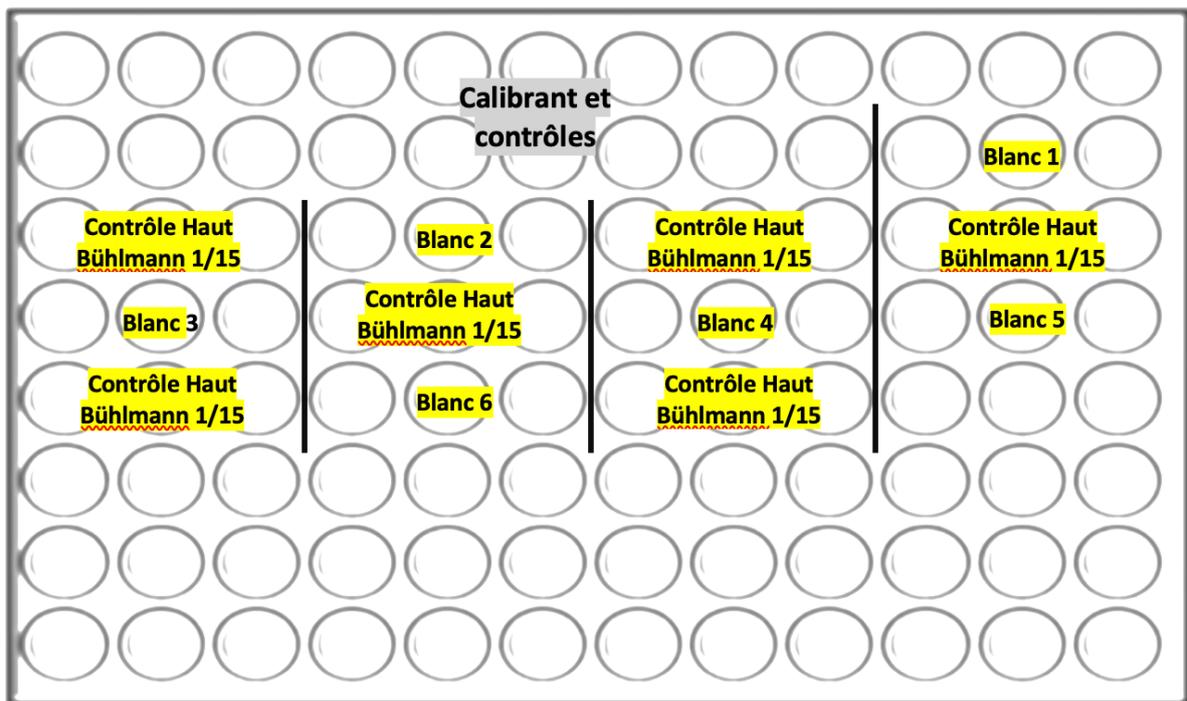


Figure 27 Plan de plaque pour l'essai de contamination

On applique ici une formule dérivée du guide technique et adaptée à la méthode. Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon l'équation :

$$C = \frac{(b1 - b2)}{(m - b2)} \times 100$$

Avec : C le pourcentage de contamination, b1 la moyenne des premiers blancs, b2 la moyenne des derniers blancs et m la moyenne du contrôle haut.

Tableau 14 Essai de contamination

<b>Blanc</b>	<b>Activité (UI/L)</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Activité (UI/L)</b>
<b>1</b>	0,00	<b>1</b>	5,33
<b>2</b>	0,01	<b>2</b>	5,96
<b>3</b>	0,00	<b>3</b>	5,12
<b>4</b>	0,00	<b>4</b>	5,47
<b>5</b>	0,00	<b>5</b>	5,02
<b>6</b>	0,00	<b>6</b>	5,46
<b>Moyenne</b>	<b>0,00</b>	<b>Moyenne</b>	<b>5,39</b>

On obtient ainsi un pourcentage de contamination égal à 0,06%.

## 11) Robustesse et stabilité des réactifs

L'évaluation de la robustesse nécessite d'identifier les paramètres ayant un effet significatif sur les performances de la méthode. La stabilité des réactifs n'a été testée que pour ceux ne disposant d'une date limite d'utilisation, à savoir le pool de LCR, le substrat et le tampon réactionnel. La durée d'essai a été fixée à six mois.

Un essai a également été mené pour s'assurer de la stabilité de l'activité ECA dans un LCR non congelé immédiatement. Il s'est étalé sur sept jours, durée maximum qu'un LCR peut passer à +4°C dans le laboratoire avant d'être congelé.

La robustesse n'a pas été étudiée de manière classique, c'est à dire en faisant varier plusieurs paramètres physiques indépendamment. Les paramètres qui ont été pris en compte sont le pH et la température d'incubation.

### a) Tampon

Un volume de tampon suffisant a été conservé pour pouvoir passer une gamme et des contrôles à quatre et six mois (Tableau 15).

Tableau 15 Stabilité du tampon et valeurs de reproductibilité

Mois	Contrôle	Activité (UI/L)	Conformité
<b>T0</b>	Pool LCR 1	1,79	-
	Pool LCR 2	1,19	-
	Contrôle bas	2,2	-
	Contrôle haut	5,2	-
<b>M4</b>	Pool LCR 1	1,86	Conforme
	Contrôle bas	2,1	Conforme
	Contrôle haut	6,6	Conforme
<b>M6</b>	Pool LCR 2	1,04	Conforme
	Contrôle bas	2,2	Conforme
	Contrôle haut	5,2	Conforme
<b>M6</b>	Pool LCR 2	1,04	Conforme
	Contrôle bas	2,2	Conforme
	Contrôle haut	5,2	Conforme

#### Reproductibilité

Contrôle	Moyenne	Écart-type
Pool LCR 1	1,79	0,163
Pool LCR 2	1,19	0,101
Contrôle Bas	2,46	0,199
Contrôle Haut	5,78	0,525

Le critère de conformité appliqué est  $m \pm 2s$  où  $m$  est la moyenne du contrôle concerné et  $s$  son écart-type vis à vis des valeurs de reproductibilité. Tous les contrôles se trouvent dans cet intervalle à quatre et six mois.

Le pH du tampon a également été mesuré à quatre et six mois, avec comme valeur de départ 7,00, les mesures étaient respectivement de 6,73 et 6,86.

*b) Substrat*

De la même manière, des aliquots de substrat reconstitué au même moment ont été conservés pour évaluer leur stabilité à quatre et six mois sur le passage de contrôles (Tableau 16).

*Tableau 16 Résultats de stabilité du substrat*

<b>Mois</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Activité (UI/L)</b>	<b>Conformité</b>
<b>T0</b>	Pool LCR 2	1,19	-
	Contrôle bas	2,46	-
	Contrôle haut	5,79	-
<b>M4</b>	Pool LCR 2	1,30	Conforme
	Contrôle bas	2,1	Conforme
	Contrôle haut	6,6	Conforme
<b>M6</b>	Pool LCR 2	1,20	Conforme
	Contrôle bas	2,8	Conforme
	Contrôle haut	6,1	Conforme

Comme pour le tampon le critère de conformité est  $m \pm 2s$  sur les données de reproductibilité et tous les contrôles sont conformes à six mois.

*c) Stabilité des échantillons de LCR congelés à -20°C*

Étant donné que nous avons aliquoté et congelé à -20°C le pool LCR et qu'il est compris dans chaque série, nous avons pu en déduire la stabilité des échantillons de LCR.

Selon les recommandations du COFRAC (81), une valeur cible et une limite de stabilité ont été fixées, ici on utilisera le pool n°2, sa moyenne de reproductibilité et deux fois l'écart-type en limite, à savoir  $1,19 \pm 0,20$  UI/L.

Une valeur du pool par mois a été incluse (Tableau 17), en prenant la même période du mois. La période de stabilité est définie comme étant l'écart de temps entre le T0 et la première valeur sortant de l'intervalle  $1,19 \pm 0,20$  UI/L.

Tableau 17 Détermination de la stabilité du pool LCR

Date	Activité (UI/L)
08/09/2020	1,29
08/10/2020	1,29
12/11/2020	1,15
10/12/2020	1,12
12/01/2021	1,20
11/02/2021	<b>1,59</b>
18/03/2021	<b>1,46</b>

Après estimation sur six mois, la durée de stabilité est de 5 mois pour le pool LCR.

## DISCUSSION

### 1) Dossier de validation de méthode

Le formulaire SH-FORM 43 visant à soumettre la méthode à validation auprès du COFRAC a été rempli avec les résultats expérimentaux ci-dessus, il est disponible en annexe (Annexe 3). Il est à noter que la justesse n'a pu être évaluée en raison d'absence d'un groupe de laboratoires pairs utilisant la même technique. De même pour l'exactitude qui n'a pu être étudiée en raison de l'inexistence d'un programme d'évaluation externe de la qualité sur l'analyse.

L'évaluation de la maîtrise des risques ne fait état que de la gravité et non de la criticité qui prend en compte la gravité et la fréquence des événements. Celle-ci n'ayant pas

été estimée pour certains événements, il n'a été renseigné que la gravité par souci de cohérence.

Le dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR est une analyse très spécialisée qui n'est réalisée que dans quelques CHU en France, chacun avec sa propre technique. De fait, il n'existe pour le moment aucun programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ). En raison du manque de standardisation, que ce soit au niveau industriel, technique, analytique ou biologique, il est à ce jour difficile, voire impossible, de se procurer l'ensemble des données demandées par le COFRAC pour compléter de manière exhaustive un dossier de validation pour une analyse de portée B. Ainsi, outre l'impossibilité de déterminer la justesse ou l'exactitude, les études de l'incertitude de mesure et de comparaison de méthodes sont incomplètes.

#### *a) Répétabilité*

Avec tous les CV des CIQ inférieurs au seuil de 20%, les résultats sont considérés valides et le test de répétabilité est concluant.

#### *b) Reproductibilité*

Les valeurs de CV de tous les CIQ sont également inférieures à 20%, la fidélité intermédiaire est donc acceptable.

#### *c) Variabilité inter-opérateurs*

L'approche en Z Score permet d'évaluer en nombre d'écart-type la déviation de chaque opérateur vis à vis de l'ensemble d'entre eux. Un opérateur ne remplit pas le critère de validité pour le contrôle haut (Z Score < -2). Néanmoins, il est à noter que le niveau très élevé d'activité de ce contrôle atteint globalement un niveau de performance moins satisfaisant que les niveaux inférieurs (écart-type de répétabilité et reproductibilité plus élevés, incertitude plus importante). La fourchette cible donnée par le fournisseur est également peu précise et donne une tolérance plus importante sur ce niveau de contrôle, ainsi bien que le Z Score de l'opérateur en question sur ce contrôle soit de 2,07 pour une limite fixée, l'ensemble des séries concernées ont été considérées valides.

Avec trois opérateurs totalement conformes et un dernier dont la déviation sur un niveau de contrôle est explicable, la variabilité inter-opérateurs est considérée comme acceptable.

#### *d) Incertitudes de mesure*

La méthode de référence n'ayant pu être appliquée en raison d'un manque de données, le calcul de l'incertitude à des activités données passe par la somme quadratique des écarts-type du CIQ et de l'étalon fournisseur (82).

Ainsi, pour un résultat de pool LCR estimé à 1,79 UI/L (fidélité intermédiaire) avec une incertitude de 0,18, la valeur rendue est donc à considérer entre 1,61 et 1,97 UI/L.

Pour le contrôle bas une incertitude de 0,21 pour une valeur attendue de 2,46 UI/L situe le résultat entre 2,25 et 2,67 UI/L, pour le contrôle haut une valeur cible de 5,78 et une incertitude de 0,52 pour un intervalle entre 5,26 et 6,30 UI/L.

Sur ces trois niveaux d'activité on obtient donc une incertitude moyenne de 9,2% par rapport aux valeurs attendues. En l'absence de base de comparaison pour ce dosage, il paraît tout de même raisonnable de conclure qu'une incertitude globale inférieure à 10% est satisfaisante pour une technique manuelle telle que celle-ci.

#### *e) Étendue de mesure*

##### Limite de détection

Estimée à 0,01 UI/L dans un intervalle de confiance de 95%, elle permet de conclure à l'absence de « bruit de fond » dans les résultats rendus et indique une bonne sensibilité analytique.

##### Limite de quantification

Évaluée à 0,3 UI/L, elle correspond à la valeur minimale pouvant être rendue pour un échantillon patient. Faible en comparaison de la tranche basse des résultats retrouvés chez des patients sains (valeurs de référence), elle assure un rendu précis des résultats pour les activités les plus faibles et constitue un avantage par rapport à la technique fournisseur originelle (substrat et mode opératoire différents) qui annonce une limite de quantification <1,5 UI/L pour une valeur moyenne de 0,3 UI/L dans sa population.

##### Limite de linéarité

Elle a été évaluée grâce aux dilutions testées du calibrant lors de l'élaboration de la calibration et se situe entre 0,13 et 0,84 UI/L. Elle permet de couvrir la très grande majorité des valeurs normales et pathologiques retrouvées chez les patients.

Concernant le LCR, nous avons testé plusieurs dilutions afin de trouver celle qui pourrait être la plus appropriée pour la majorité des patients analysés avec à la fois des valeurs normales et pathologiques. La dilution d'un cinquième nous apparaissait comme un bon compromis. Nous avons également, lors de cette expérience, vérifié que quelle que soit la dilution employée, cela ne modifiait pas les résultats indiquant l'absence d'effet de matrice. En effet, des résultats similaires étaient obtenus pour les dilutions du LCR de 1/15, 1/10, 1/7, 1/5, 1/4 et 1/3.

#### *f) Valeurs de référence*

De 0,40 à 2,20 UI/L, les valeurs inférieures pourront être rendues jusque 0,3 UI/L, les valeurs supérieures à 2,20 UI/L devront faire suspecter une contamination sanguine et seront à reconstrôler et confrontées au contexte clinique avant de conclure à un résultat pathologique.

#### *g) Comparaison de méthode*

Les valeurs de référence de la technique en cuve étaient de 0,1 à 1,3 UI/L, pour rappel, elles sont de 0,40 à 2,20 UI/L pour la technique sur plaque. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation d'un calibrant différent et de l'absence de standardisation entre les industriels.

Du point de vue quantitatif il paraît donc compliqué de comparer des résultats n'ayant pas les mêmes valeurs de référence, d'autant que pour que la comparaison suive les recommandations du COFRAC (81), il aurait fallu passer les mêmes contrôles sur les deux méthodes.

Le niveau de corrélation entre les deux techniques est faible, mais statistiquement significatif ( $p=0,024$ ), cela se traduit par une corrélation des résultats pour 14 patients sur 30. De multiples biais peuvent entrer en compte, notamment le temps de conservation des échantillons de LCR supérieur à six mois alors que la stabilité d'un pool de LCR n'a été estimée qu'à 5 mois dans l'essai consacré.

Du point de vue qualitatif, à savoir si les résultats seraient rendus ou non dans les valeurs normales, il y a une concordance des deux techniques sur 26 patients sur 30 (86,7%). Pour les quatre patients dont le résultat diffère :

- Deux sont élevés en cuve et normaux sur plaque (n°8 et 14),
- Un dont l'activité était élevée sur cuve et quasiment nulle sur plaque (n°18),

- Un dont l'activité était normale sur cuve et très élevée sur plaque (n°27),

Chacun d'entre eux a été vérifié et les résultats étaient identiques. Dans les deux premiers cas de figure on peut se poser la question de la conservation. Pour le dernier la discordance est inverse.

#### *h) Interférences et spécificités pré-analytique et analytique*

La principale interférence pré-analytique à prendre en compte serait un passage d'ECA sérique dans le LCR suite à une brèche de la BHE. Les prélèvements sanguinolents sont d'emblée écartés. Une intégration du quotient albumine permet d'appréhender la possibilité d'une contamination sérique lors d'un résultat élevé. Il n'a pas été réalisé d'essai afin de connaître précisément l'impact d'une contamination sanguine du prélèvement. Des ajouts séquentiels d'hémoglobine auraient pu être menés mais l'intérêt en est limité puisque la neurosarcoïdose ne s'accompagne pas d'hémorragie méningée.

Des ajouts de captopril au pool de LCR ont permis d'évaluer la spécificité analytique. Comme attendu, le captopril inhibe l'activité de l'ECA à partir d'une concentration de  $10^{-11}$  M et l'inhibe totalement à  $10^{-7}$  M. La CI50 se situe entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M, en accord avec la valeur de 23 nM retrouvée dans la littérature (83). Bien qu'on sache qu'ils pénètrent la BHE, la pharmacocinétique des IEC dans le LCR est mal connue. On peut en revanche affirmer qu'ils ont un rôle certain sur l'activité de l'ECA dans le LCR après une prise orale (84), il paraît donc cohérent de contre-indiquer le dosage chez un patient sous IEC, l'interprétation du résultat étant rendue impossible.

L'essai sur ECA purifiée va dans le sens d'une bonne spécificité analytique puisque l'activité se comporte sensiblement de la même manière en présence de captopril dans le LCR et avec une solution purifiée d'ECA.

#### *i) Contamination*

Aucune contamination n'est à signaler étant donné que tous les blancs conservent une activité proche de 0 UI/L alors que les contrôles forts disposés tout autour sur la plaque ont une activité d'intensité inchangée. On peut donc conclure à l'absence de contamination directe entre les puits (passage de produit entre les puits à cause d'une mauvaise manipulation) ou d'une contamination indirecte lors de la lecture (la fluorescence élevée d'un puits voisin interfère sur la lecture d'une fluorescence faible).

### *j) Robustesse et stabilité des réactifs*

Dès le début des expérimentations il a été clair que la faiblesse principale de la méthode était la maîtrise technique, Il faut plusieurs essais à un opérateur avant de qualifier une gamme et des contrôles pour la première fois, même lorsqu'il s'agit d'un technicien expérimenté. Pour cela il est nécessaire d'harmoniser la technique de pipetage et que les pipettes soient les mêmes tout au long d'une même série.

Les durées d'évaluation du tampon et du substrat se limitent à six mois étant donné qu'il s'agit de l'estimation faite de la durée de vie d'un flacon de substrat une fois reconstitué à raison de une à deux séries par semaine.

#### Tampon

Tous les contrôles étant conformes à quatre et six mois on peut convenir d'une stabilité de six mois pour le tampon.

La variation du pH étant inférieure à 5%, on peut conclure qu'il ne s'agit pas d'un paramètre fluctuant en fonction du temps (sur les six mois de vie du tampon) et qu'il peut se dispenser d'une étude plus poussée.

#### Substrat

Étudiée de la même manière que le tampon, la stabilité du substrat est aussi assurée sur six mois, cette durée de vie étant suffisante et les aliquots conservés épuisés, l'essai n'a pas été recommencé afin de déterminer la stabilité maximale.

#### LCR

Calculée selon les recommandations du COFRAC (81) grâce aux nombreuses valeurs disponibles, la stabilité du pool est établie à 5 mois. Si on extrapole ce résultat à tous les échantillons de LCR, cela rend discutables les résultats obtenus sur des échantillons plus anciens, notamment la comparaison de méthode, mais aucune autre solution n'était possible. Il faudra également prendre en compte ce résultat en cas d'expérimentations ultérieures et veiller à n'utiliser que des échantillons datant de moins de 20 semaines, ou réévaluer la stabilité à plus long terme.

## 2) Application en routine

Suite à la défaillance du système en cuve la technique est rentrée en routine en Mai 2020 après que les premiers essais de qualification aient été rendus conformes.

### *a) Technique*

Une série est réalisée chaque semaine dans le service de Biochimie. Les techniciens participants sont habilités après avoir suivi en double un technicien déjà habilité et réussi la qualification d'une gamme et de contrôles seul sous supervision. L'habilitation est effective après rendu et correction d'un quizz dédié (Annexe 4).

### *b) Validation biologique*

Elle est réalisée par les biologistes du secteur de Biochimie après explication et validation en double d'un autre biologiste. Elle consiste d'abord à s'assurer de la validité de la gamme de calibration, des contrôles et de la cohérence intrinsèque de chaque triplicate selon les critères d'acceptabilité décrits dans la section Matériel et Méthode ( $R^2$ , CV, pentes et cohérence graphique). La saisie des résultats étant manuelle dans le SIL, il appartient au biologiste de la vérifier ainsi que la bonne saisie des valeurs de contrôles dans un fichier Excel dédié.

Le quotient albumine est intégré au résultat en tant que marqueur des échanges hémato-méningés. La synthèse de l'albumine n'étant qu'hépatique, une augmentation du taux d'albumine dans le LCR indique une altération plus ou moins importante de la BHE. S'il est élevé, on peut supposer un passage de l'ECA sérique vers le compartiment méningé, sans rapport avec une neurosarcoïdose.

Il rend donc indispensable un dosage sérique de l'albumine et le prélèvement d'un tube de sang périphérique simultanément ou peu de temps avant la ponction lombaire.

### *c) Interprétation des résultats*

Il revient également au biologiste d'interpréter les résultats en fonction de l'état actuel des connaissances.

Pour rappel le dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR n'a qu'une faible valeur diagnostique du fait de sa spécificité moyenne et un résultat élevé n'est pas pathognomonique de la neurosarcoïdose alors qu'un résultat normal ne l'exclut pas. Il

s'agit donc d'une analyse d'orientation entrant dans un cadre diagnostique clinique, radiologique et biologique large.

### **3) Échanges inter-laboratoires**

Le groupe de travail sur l'ECA de la SFBC dont le CHU de Caen fait partie met en place des échanges d'échantillons test sur une base bi-annuelle. Cinq laboratoires participent, dont l'hôpital Saint-Antoine utilisant la méthode radio-isotopique développée par le Pr Baudin et son équipe (41). Participent aussi les CHU de Lille, Marseille et Lyon, deux laboratoires utilisent la méthode de Bühlmann® et un autre une technique adaptée en interne à partir de réactifs Trinity®.

À l'heure actuelle ces essais ne permettent pas de conclure à une bonne homogénéité sur la quantification de l'activité puisque chaque laboratoire a défini des valeurs de référence différentes. Il est à noter que les deux laboratoires utilisant la même technique non modifiée ne trouvent pas de résultats comparables sur les mêmes échantillons lors des deux derniers échanges.

Le rendu des résultats quant à lui semble plus homogène avec une analyse qualitative plus cohérente sans pour autant s'approcher de la perfection.

### **4) Perspectives**

Du point de vue analytique, même si la technique provient de la littérature (76), des essais complémentaires portant sur la robustesse pourraient être menés, bien que cela représentait un nombre important de séries à réaliser pour chaque paramètre pouvant être étudié.

Par exemple la température d'incubation, étant fixée au niveau du lecteur de plaque, se doit d'être constante sur le temps de la lecture et homogène sur l'ensemble de la plaque. Cette qualification du lecteur n'a pas pu être réalisée ici mais l'a été précédemment par le laboratoire d'Hémostase qui partage son utilisation.

La mise en place du groupe de travail de la SFBC représente un effort important quant à la standardisation du dosage et son développement futur. Il paraît essentiel de continuer les échanges inter-laboratoires qui pourraient, à terme, mener à la mise en place d'un programme de CIQ externalisés permettant de qualifier de manière plus exhaustive les différentes méthodes.

Il serait également intéressant de se pencher sur les résultats obtenus chez les patients depuis la mise en place de la méthode et de confronter les résultats dépassant la valeur de référence supérieure à la clinique. Ainsi, une comparaison avec les étiologies décrites dans la littérature (41) serait possible et un recensement sur plusieurs mois ou années augmenterait la visibilité du biologiste et du clinicien sur les résultats anormaux. Les diagnostics avérés de neurosarcoïdose étant rares, la découverte d'un cas serait une chance de confronter la réalité de la méthode à la théorie. Un tel recensement permettrait également de déterminer la proportion de prélèvements affectés par une contamination sérique afin de mener une action de prévention dans principaux services prescripteurs quant à la possibilité d'un résultat faussement positif en cas d'altération de la BHE.

## **CONCLUSION**

S'agissant d'une technique de dosage enzymatique manuelle avec peu ou pas de modèle de mise en place dans la littérature, les principaux éléments de performances analytiques testés ici montrent des résultats satisfaisants. On retiendra notamment la répétabilité, la reproductibilité, la variabilité inter-opérateurs, l'étendue de mesure, les valeurs de référence et la contamination comme acceptables.

En raison des méthodes de calcul adaptées des recommandations du COFRAC, les résultats d'incertitude de mesure, la comparaison de méthodes et de robustesse peuvent être discutés. Néanmoins, la méthode la plus pertinente possible a été adoptée pour chacun de ces essais et les résultats exprimés de manière cohérente. Seule la robustesse mériterait une étude plus large, cela représenterait un nombre considérable de séries à réaliser si on souhaite augmenter la diversité des paramètres analytiques étudiés et que chacun soit investigué de manière complète quant à ses limites d'acceptabilité.

La technique de dosage développée ici est entrée en routine depuis plusieurs mois au sein du laboratoire de Biochimie et plusieurs techniciens ont été formés. Il paraît préférable de limiter leur nombre à cinq maximum afin de garder suffisamment de personnel pour exécuter la technique pendant les périodes de vacances ou suppléer des absences, tout en conservant une rotation suffisante à la pratique courante de la technique. Le but est de permettre à chaque opérateur de passer sur le poste assez fréquemment pour ne pas perdre les automatismes acquis et nécessaires à la bonne performance de la méthode.

Cette mise en place en routine peut permettre de se pencher sur l'aspect clinico-biologique de manière rétrospective en étudiant les dossiers des patients dont l'activité ECA dépasse la borne supérieure des valeurs de référence.

## BIBLIOGRAPHIE

1. MULTIPLE BENIGN SARCOIDS OF THE SKIN. JAMA J Am Med Assoc. 23 déc 1899;XXXIII(26):1620.
2. Collège des enseignants de pneumologie. Référentiel collège de Pneumologie. 7ème édition. S EDITIONS; 2021. 360 p.
3. Izbicki G, Chavko R, Banauch GI, Weiden MD, Berger KI, Aldrich TK, et al. World Trade Center "Sarcoid-Like" Granulomatous Pulmonary Disease in New York City Fire Department Rescue Workers. Chest. mai 2007;131(5):1414-23.
4. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. N Engl J Med. 22 nov 2007;357(21):2153-65.
5. Terwiel M, Moorsel CHM van. Clinical epidemiology of familial sarcoidosis: A systematic literature review. Respir Med. 1 mars 2019;149:36-41.
6. Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. Immunology. juill 2000;100(3):352-8.
7. Bart DP-A, Zuber J-P. J.-P. Zuber F. Spertini A. Leimgruber P.-A. Bart. Rev Médicale Suisse. 2005;10.
8. item\_211\_SARCOIDOSE\_2021\_ex\_item\_207.pdf [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: [http://cep.splf.fr/wp-content/uploads/2020/11/item\\_211\\_SARCOIDOSE\\_2021\\_ex\\_item\\_207.pdf](http://cep.splf.fr/wp-content/uploads/2020/11/item_211_SARCOIDOSE_2021_ex_item_207.pdf)
9. Lieberman J, Schleissner LA, Nosal A, Sastre A, Mishkin FS. Clinical correlations of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) in sarcoidosis. A longitudinal study of serum ACE, 67gallium scans, chest roentgenograms, and pulmonary function. Chest. nov 1983;84(5):522-8.
10. Ainslie GM, Benatar SR. Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis: sensitivity and specificity in diagnosis: correlations with disease activity, duration, extra-thoracic involvement, radiographic type and therapy. Q J Med. juin 1985;55(218):253-70.
11. Lahtela E, Wennerström A, Pietinalho A, Petrek M, Kolek V, Lokki M-L, et al.

ACE gene variants and sarcoidosis in a Finnish population. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG*. 2017;34(2):104-14.

12. Kieszko R, Krawczyk P, Powrózek T, Szudy-Szczyrek A, Szczyrek M, Homa I, et al. The impact of ACE gene polymorphism on the incidence and phenotype of sarcoidosis in rural and urban settings. *Arch Med Sci AMS*. 1 déc 2016;12(6):1263-72.

13. Baudin B. [Angiotensin I-converting enzyme (ACE) for sarcoidosis diagnosis]. *Pathol Biol (Paris)*. avr 2005;53(3):183-8.

14. Studdy P, Bird null, James DG, Sherlock S. Serum angiotensin--converting enzyme (SACE) in sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Trans Med Soc Lond*. 1979 1978;95:54-9.

15. Bénéteau-Burnat B, Baudin B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1991;28(5-6):337-56.

16. Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med*. mars 2002;40(3):256-65.

17. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. oct 1990;86(4):1343-6.

18. The Measurement of Angiotensin-Converting Enzyme in Subjects Receiving Captopril. *N Engl J Med*. 14 août 1980;303(7):397-397.

19. Selroos OB. Biochemical markers in sarcoidosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1986;24(3):185-216.

20. Bergantini L, Bianchi F, Cameli P, Mazzei MA, Fui A, Sestini P, et al. Prognostic Biomarkers of Sarcoidosis: A Comparative Study of Serum Chitotriosidase, ACE, Lysozyme, and KL-6. *Dis Markers*. 2019;2019:8565423.

21. PRIME PubMed | Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases [Internet]. [cité 22 mars 2021]. Disponible sur: [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/22554854/Utility\\_of\\_KL\\_6/MUC1\\_in\\_the\\_clinical\\_management\\_of\\_interstitial\\_lung\\_diseases\\_](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/22554854/Utility_of_KL_6/MUC1_in_the_clinical_management_of_interstitial_lung_diseases_)

22. Bargagli E, Maggiorelli C, Rottoli P. Human Chitotriosidase: A Potential New Marker of Sarcoidosis Severity. *Respiration*. 2008;76(2):234-8.
23. Nishino M, Sholl LM, Awad MM, Hatabu H, Armand P, Hodi FS. Sarcoid-Like Granulomatosis of the Lung Related to Immune-Checkpoint Inhibitors: Distinct Clinical and Imaging Features of a Unique Immune-Related Adverse Event. *Cancer Immunol Res*. juin 2018;6(6):630-5.
24. Ungprasert P, Ryu JH, Matteson EL. Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. 2 août 2019;3(3):358-75.
25. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. août 1999;160(2):736-55.
26. Heerfordt CF. Über eine „Febris uveo-parotidea subchronica“, an der Glandula parotis und der Uvea des Auges lokalisiert und häufig mit Paresen cerebrospinaler Nerven kompliziert. *Albrecht Von Graefes Arch Für Ophthalmol*. 1 avr 1909;70(2):254-73.
27. Cohen Aubart F, Galanaud D, Haroche J, Psimaras D, Mathian A, Hié M, et al. [Neurosarcoidosis: Diagnosis and therapeutic issues]. *Rev Med Interne*. juin 2017;38(6):393-401.
28. Krumholz A, Stern BJ. Neurologic manifestations of sarcoidosis. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 27 janv 2021]. p. 305-33. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702040863000217>
29. Stern BJ, Krumholz A, Johns C, Scott P, Nissim J. Sarcoidosis and its neurological manifestations. *Arch Neurol*. sept 1985;42(9):909-17.
30. Osenbach RK, Blumenkopf B, Ramirez H, Gutierrez J. Meningeal neurosarcoidosis mimicking convexity en-plaque meningioma. *Surg Neurol*. oct 1986;26(4):387-90.
31. Bihan H, Christozova V, Dumas J-L, Jomaa R, Valeyre D, Tazi A, et al. Sarcoidosis: clinical, hormonal, and magnetic resonance imaging (MRI) manifestations

of hypothalamic-pituitary disease in 9 patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. sept 2007;86(5):259-68.

32. Meyer JS. GRANULOMATOUS ANGIITIS OF THE MENINGES IN SARCOIDOSIS. *Arch Neurol Psychiatry*. 1 mai 1953;69(5):587.

33. Olugemo K, Stern BJ. Stroke and neurosarcoidosis. *Uncommon Causes Stroke 2nd Ed*. 1 janv 2008;75-80.

34. Krumholz A, Stern BJ, Stern EG. Clinical implications of seizures in neurosarcoidosis. *Arch Neurol*. août 1991;48(8):842-4.

35. Galassi G, Gibertoni M, Mancini A, Nemni R, Volpi G, Merelli E, et al. Sarcoidosis of the peripheral nerve: clinical, electrophysiological and histological study of two cases. *Eur Neurol*. 1984;23(6):459-65.

36. Zuniga G, Ropper AH, Frank J. Sarcoid peripheral neuropathy. *Neurology*. oct 1991;41(10):1558-61.

37. Zajicek JP, Scolding NJ, Foster O, Rovaris M, Evanson J, Moseley IF, et al. Central nervous system sarcoidosis--diagnosis and management. *QJM Mon J Assoc Physicians*. févr 1999;92(2):103-17.

38. Oksanen V, Grönhagen-Riska C, Fyhrquist F, Somer H. Systemic Manifestations and Enzyme Studies in Sarcoidosis with Neurologic Involvement. *Acta Med Scand*. 1985;218(1):123-7.

39. Bridel C, Courvoisier DS, Vuilleumier N, Lalive PH. Cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme for diagnosis of neurosarcoidosis. *J Neuroimmunol*. 15 août 2015;285:1-3.

40. Chan Seem CP, Norfolk G, Spokes EG. CSF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN NEUROSARCOIDOSIS. *The Lancet*. févr 1985;325(8426):456-7.

41. Baudin B, Bénétteau-Burnat B, Vaubourdolle M. [Angiotensin I-converting enzyme in cerebrospinal fluid and neurosarcoidosis]. *Ann Biol Clin (Paris)*. oct 2005;63(5):475-80.

42. Jones DB, Mitchell D, Horn DB, Edwards CR. Cerebrospinal fluid angiotensin converting enzyme levels in the diagnosis of neurosarcoidosis. *Scott Med J*. oct 1991;36(5):144-5.

43. Khoury J, Wellik KE, Demaerschalk BM, Wingerchuk DM. Cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme for diagnosis of central nervous system sarcoidosis. *The Neurologist*. mars 2009;15(2):108-11.
44. Dale JC, O'Brien JF. Determination of angiotensin-converting enzyme levels in cerebrospinal fluid is not a useful test for the diagnosis of neurosarcoidosis. *Mayo Clin Proc*. mai 1999;74(5):535.
45. Oksanen V, Fyhrquist F, Grönhagen-Riska C, Somer H. CSF angiotensin-converting enzyme in neurosarcoidosis. *Lancet Lond Engl*. 4 mai 1985;1(8436):1050-1.
46. Sherman JL, Stern BJ. Sarcoidosis of the CNS: comparison of unenhanced and enhanced MR images. *AJNR Am J Neuroradiol*. oct 1990;11(5):915-23.
47. Terushkin V, Stern BJ, Judson MA, Hagiwara M, Pramanik B, Sanchez M, et al. Neurosarcoidosis: presentations and management. *The Neurologist*. janv 2010;16(1):2-15.
48. imagerie par résonance magnétique (IRM) [Internet]. [cité 30 mai 2021]. Disponible sur: [https://www.info-radiologie.ch/resonance\\_magnetique.php](https://www.info-radiologie.ch/resonance_magnetique.php)
49. FLAIR [Internet]. [cité 30 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.info-radiologie.ch/flair.php>
50. Lower EE, Broderick JP, Brott TG, Baughman RP. Diagnosis and management of neurological sarcoidosis. *Arch Intern Med*. 8 sept 1997;157(16):1864-8.
51. Doty JD, Mazur JE, Judson MA. Treatment of corticosteroid-resistant neurosarcoidosis with a short-course cyclophosphamide regimen. *Chest*. nov 2003;124(5):2023-6.
52. Sharma OP. Effectiveness of chloroquine and hydroxychloroquine in treating selected patients with sarcoidosis with neurological involvement. *Arch Neurol*. sept 1998;55(9):1248-54.
53. Damy T, Guellich A, Vermes E, Deswarte G, Hittinger L. Physiologie et physiopathologie du système rénine-angiotensine-aldostérone. *MT Cardio*. 1 juill 2007;3(4):257-62.
54. Collège universitaire des enseignants de néphrologie. Référentiel Collège de

Néphrologie. 9ème édition. ELLIPSES; 2020. 430 p. (Réussir l'ECN).

55. Inagami T. The renin-angiotensin system. *Essays Biochem.* 1994;28:147-64.
56. Spyroulias GA, Galanis A, Pairas G, Manessi-Zoupa E, Cordopatis P. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. *Curr Top Med Chem.* 1 févr 2004;4:403-29.
57. Mercadier J-J. Une seconde enzyme de conversion de l'angiotensine juste pour le cœur ? *médecine/sciences.* févr 2003;19(2):141-3.
58. Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct.* 21 août 1970;214(2):374-6.
59. Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem.* 11 nov 2005;280(45):37644-50.
60. Barreto-Chaves ML, Heimann A, Krieger JE. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* juin 2000;33(6):661-4.
61. Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.* avr 1996;27(3):463-5.
62. Saijonmaa O, Fyhrquist F. Upregulation of angiotensin converting enzyme by atrial natriuretic peptide and cyclic GMP in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* oct 1998;40(1):206-10.
63. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol.* 2003;4(8):225.
64. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1 mars 1956;103(3):295-9.
65. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 20 juin 2002;417(6891):822-8.

66. Masuyer G, Yates CJ, Sturrock ED, Acharya KR. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. *Biol Chem*. 1 oct 2014;395(10):1135-49.
67. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*. 5 mai 1993;268(13):9496-503.
68. Ng KK, Vane JR. Fate of angiotensin I in the circulation. *Nature*. 13 avr 1968;218(5137):144-50.
69. Kircheva N, Dobrev S, Yakimova B, Stoineva I, Angelova S. Molecular insights into the interaction of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors and HEXXH motif. *Biophys Chem*. 1 sept 2021;276:106626.
70. Sturrock ED, Natesh R, van Rooyen JM, Acharya KR. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell Mol Life Sci CMLS*. nov 2004;61(21):2677-86.
71. Holmquist B, Bünning P, Riordan JF. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem*. juin 1979;95(2):540-8.
72. Harjanne A. Automated kinetic determination of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clin Chem*. juin 1984;30(6):901-2.
73. Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*. août 1976;66(2):416-24.
74. Rohrbach MS. [Glycine-1-14C]hippuryl-L-histidyl-L-leucine: a substrate for the radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem*. 1 janv 1978;84(1):272-6.
75. Alhenc-Gelas F, Weare JA, Johnson RL, Erdös EG. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J Lab Clin Med*. 1 janv 1983;101(1):83-96.
76. Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. juin 2005;38(6):861-8.

77. Schweisfurth H, Schiöberg-Schiegnitz S. Assay and biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid. *Enzyme*. 1984;32(1):12-9.
78. ISO - Organisation internationale de normalisation [Internet]. ISO. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/home.html>
79. Accueil | COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/>
80. ISO 15189:2012(fr), Laboratoires de biologie médicale — Exigences concernant la qualité et la compétence [Internet]. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-3:v2:fr>
81. SH-GTA-04.pdf [Internet]. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
82. SH-GTA-14.pdf [Internet]. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14>
83. Ondetti MA. Structural relationships of angiotensin converting-enzyme inhibitors to pharmacologic activity. *Circulation*. juin 1988;77(6 Pt 2):174-78.
84. Geppetti P, Spillantini MG, Frilli S, Pietrini U, Fanciullacci M, Sicuteri F. Acute oral captopril inhibits angiotensin converting enzyme activity in human cerebrospinal fluid. *J Hypertens*. avr 1987;5(2):151-4.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Fiche technique

	FICHE TECHNIQUE	PB-BIOCH-FT-264
	<b>DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'ECA DANS LE LCR</b>	Version 4 Date d'application 2020-12-23 Page 1/7
Entité émettrice : LBM du CHU de CAEN		édité le 22 juillet 2021

### OBJET

Mode opératoire pour déterminer l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I dans le liquide céphalorachidien dans le cadre du diagnostic de la neurosarcoïdose.

### DOMAINE D'APPLICATION – PERSONNEL CONCERNE

Personnel concerné : Technicien de laboratoire au poste IMAGE.

Dès réception, faire 2 aliquots de 60 µL (1 seul si faible volume). Ils peuvent être conservés à +4°C pendant 7 jours avant d'être congelés à -20°C dans le congélateur CNG9-BIOCH. Analyse réalisée une fois par semaine.

#### Principe de la détermination et intérêt clinique :

La détermination est réalisée pour établir le diagnostic de la neurosarcoïdose.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) est un marqueur biologique utile au diagnostic de la sarcoïdose. La détermination de l'activité de l'ECA est faite par spectrofluorimétrie en utilisant l'Abz-FRK(dnp)P-OH comme substrat.

L'acide ortho-aminobenzoïque (ortho-aminobenzoic acid ou ABz) est un groupement fluorescent qui est séparés par 3 acides aminés (FRK : phénylalanine, arginine et lysine, site de coupure par l'ECA) du 2,4 dinitrophényl (Dnp), utilisé comme « quencher » de la fluorescence.

Lors de l'hydrolyse par l'ECA, il y a libération de l'Abz qui provoque une augmentation de la fluorescence détectée à 465 nm après excitation à 340 nm.

## DESCRIPTION DE L'OBJET

### MATERIEL ET REACTIFS

#### Prélèvement du patient :

Pièce « IMAGE » 03-224 à 4°C dans le frigo, 15 µL de LCR, Il peut être congelé également (congélateur CNG9).

#### Matériel

Pièce « Mito » 03-139

- Microcentrifugeuse
- Eppendorf de 1,5mL
- Pipettes de 10µL, 50µL, 200µL, 1000µL
- Cônes stériles de 0.5-10µL, de 1-50µL, de 50-200µL, de 100-1000µL
- Plaques de culture blanche de 96 puits à fond rond Optiplat<sup>TM</sup> PerkinElmer ,réf commerciale 6005290.

Pièce « Hémato spé » 03-851

- Spectrophotomètre UV TECAN Infinite F200 PRO

#### Réactifs :

Pièce de l'IMAGE 03-224, congélateur CNG9-BIOCH

- Tampon réactionnel : aliquot de 10mL
- Substrat : aliquot de 80µL

Pièce de l'IMAGE, réfrigérateur REF6-BIOCH-LABO224

- Calibrant ECA Bühlmann à 4°C, réf B-ACF-CA
- Contrôles Bühlman, à 4°C, réf B-ACF-CONSET
- Pool LCR à -20°C. Penser à aliquoter du nouveau pool à l'avance, afin de doser en parallèle celui en cours d'utilisation et le nouveau.
- LCRs patients.

## RECONSTITUTION DU TAMPON REACTIONNEL :

### REACTIFS :

- Poudre de ZnCl<sub>2</sub> Sigma, référence 229997-10G.(stockage dessiccateur paillasse mito T° ambiante)
- Solution Tris-HCL 1M Gibco, référence 15567-027
- NaCL en poudre, VWR , référence 27810.295

### PREPARATION : POUR 100ML.

Peser 13,63mg de ZnCl<sub>2</sub> et rajouter 10ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,01M (conservation 12 mois).

Dans une fiole jaugée de 100ml mettre :

- 10mL de Tris-HCL 1M
- 100µL de la solution de ZnCl<sub>2</sub> à 0,01M
- 292,2mg de NaCL.

Ajuster le pH à 7 et compléter à 100mL avec de l'eau distillée.

A conserver au congélateur CNG9-BIOCH LABO214.

## RECONSTITUTION DU SUBSTRAT :

### REACTIFS :

Le substrat est préparé à base de poudre d'Abz-FRK(Dnp)P-OH (Sigma-Aldrich® référence A4980-1MG) et de DMSO (VWR référence 23500.297).

### PREPARATION :

Ajouter 1,2mL de DMSO (placard Mito T° Ambiante) dans le flacon de substrat.

Faire 15 aliquots de 80µL à conserver dans le congélateur CNG9-BIOCH LABO214, à l'abri de la lumière.

## QUANTITE DE REACTIFS NECESSAIRE PAR PUIITS

79µL de tampon

1µL de substrat

20µL de LCR/Calibrant/Contrôle dilué

## PREPARATION DES REACTIFS

### Préparation du mix tampon/substrat :

On dilue le substrat au 1/80<sup>ème</sup> dans du tampon, ex : 1580µL de tampon + 20µL de substrat ou 1975µL de tampon +25µL de substrat, ou 987µL de tampon +13µL substrat. **Protéger le tube de la lumière.**

Préparation des dilutions du calibrant : Attention l'activité du calibrant change d'un N° lot à un autre.

On prépare des dilutions du calibrant aux :

1/100<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 495µL de Tampon

1/70<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 345µL de Tampon

1/40<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 195µL de Tampon

1/15<sup>ème</sup> : 5µL de Calibrant + 70µL de Tampon

### Préparation des dilutions de contrôles :

1/15<sup>ème</sup> : 5µL de contrôle bas Bühlmann + 70µL de Tampon

1/15<sup>ème</sup> : 5µL de contrôle haut Bühlmann + 70µL de Tampon

### Préparation du Pool LCR :

- 1/5 : 15µL Pool LCR + 60µL de tampon



## REGLAGE DU SPECTROFLUORIMETRE

1. Allumer le spectrofluorimètre Tecan
2. Ouvrir le logiciel Magellan 7.2 et insérer la plaque (après avoir retiré le film) dans le lecteur lorsque la trappe s'ouvre, refermer la trappe.
3. Sélectionner « Créer/éditer une méthode », puis continuer, puis trouver la méthode « ECA LCR » (double clic).
4. Cliquer sur détails dans la section « Partie de la plaque » puis sélectionner la plage de puits à analyser et faire OK.
5. Cliquer sur « choisir les paramètres de la mesure » (en bas à droite).
6. Sélectionner les puits déjà remplis et « Supprimer sélection » (sur le petit tableau).
7. Sélectionner les puits souhaités (ils apparaissent en gris clair) et double cliquer sur le bouton bleu « SM ».
8. Mettre « numéro fixe » à 3, cliquer sur « Remplir la sélection » et OK.
9. Sélectionner les puits utilisés puis double cliquer sur « SM ».
10. Cliquer sur suivant (en bas à droite).
11. Enregistrer la méthode dans « ECA LCR » (en bas à droite).
12. Enregistrer et terminer.
13. Démarrer (attendre que la température soit atteinte).

## DOSAGE

1. Si l'écran de lancement de la mesure n'apparaît pas automatiquement sélectionner « démarrer mesure » dans le menu principal du Tecan, puis continuer, puis « ECA LCR ».
2. Dans « Contrôle température », modifier la température cible à 37°C, cliquer sur « actif ».
3. Lancer la mesure et vérifier que la lecture est bien lancée au bout de quelques minutes d'incubation (environ 15 min).
4. A la fin du run, cliquer sur « Editer méthode » puis dans le menu de gauche sur « Exportation des données ».
5. Double cliquer sur « Données brutes ».
6. Cliquer sur « Options d'exportations » puis sur « Table (données des puits en colonnes) ».
7. Cliquer sur Exporter dans Excel, sélectionner « nouveau classeur » puis OK.
8. Cliquer sur « Fichier » puis « Exportation dans Excel » : un fichier excel s'ouvre.
9. Enregistrer le fichier Excel sur une clé USB et fermer.
10. Cliquer sur suivant et enregistrer les résultats en indiquant la date, puis terminer.
11. Sur l'écran d'accueil cliquer sur « Quitter Magellan ».

12. Ouvrir la trappe du lecteur, récupérer la plaque et l'éteindre.

## ANALYSE

Copier les données du fichier Excel de la clé usb et les coller à la cellule indiquée dans le masque de calcul dans Commun- ECA- ECA LCR plaque- Masque ECA LCR plaque.

Répéter l'opération pour la gamme de calibration, les contrôles, pool et les échantillons. Le premier onglet du fichier est réservé à la calibration et aux contrôles. Les données brutes des échantillons patients sont à coller sur les onglets suivants. Les calculs d'activités sont générés automatiquement en utilisant les données de calibration du premier onglet.

Retirer les pentes des puits dont les  $R^2$  sont aberrants ( $R^2 < 0,98$ ). On doit avoir  $R^2 > 0,98$  pour au moins deux puits sur trois d'un triplicate et avoir un aspect graphique cohérent.

Vérifier que les CV entre les dilutions de calibrant sont  $< 0,20$ .

## VALIDATION

### Validation technique

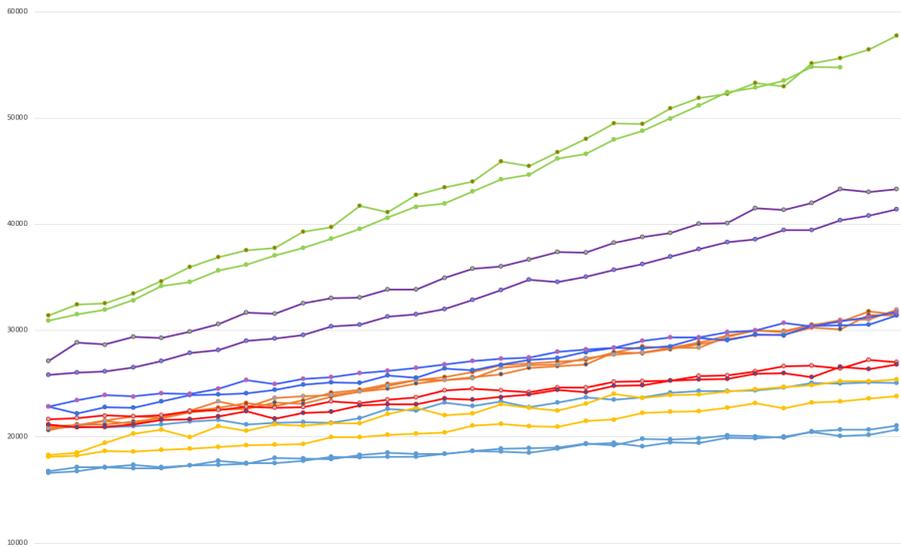
- CV inter-dilutions de calibration  $< 0,15$ , sauf pour la dilution 1/100 du calibrant où on accepte CV  $< 20\%$ .
- $R^2 > 0,98$  pour au moins deux puits sur trois d'un triplicate.
- Aspect graphique cohérent.
- Reporter les valeurs des contrôles, pool, et la pente dans commun- suivi contrôles ECA LCR.  
(période pré-probatoire indispensable pour nouveau lot).
- Donner la feuille de travail à valider.

### Validation biologique

Réalisée par le biologiste habilité.

Les biologistes rentrent les résultats par ERM et valident la feuille de travail.

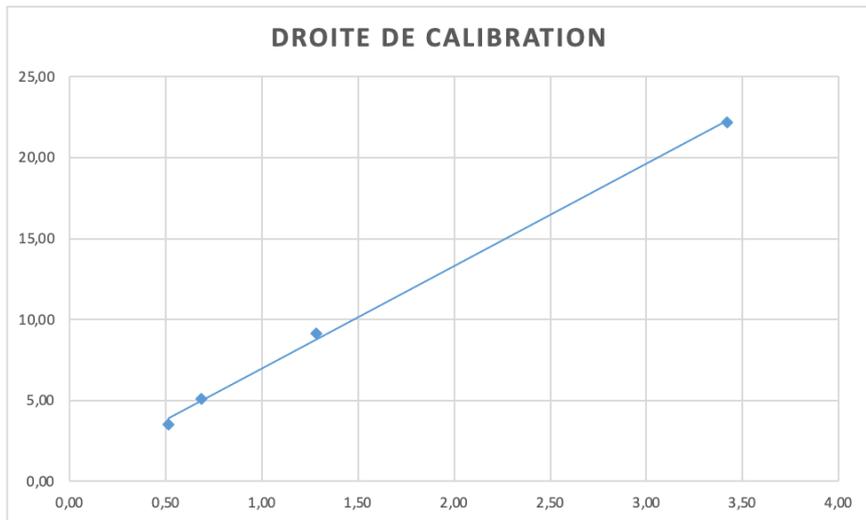




	cal 1/100	cal 1/70	cal 1/40	cal 1/15
Activité	0,1026	0,146571429	0,2565	0,684
Activité/pente	0,029002845	0,028646578	0,028059919	0,030802552
Moy			0,029127973	

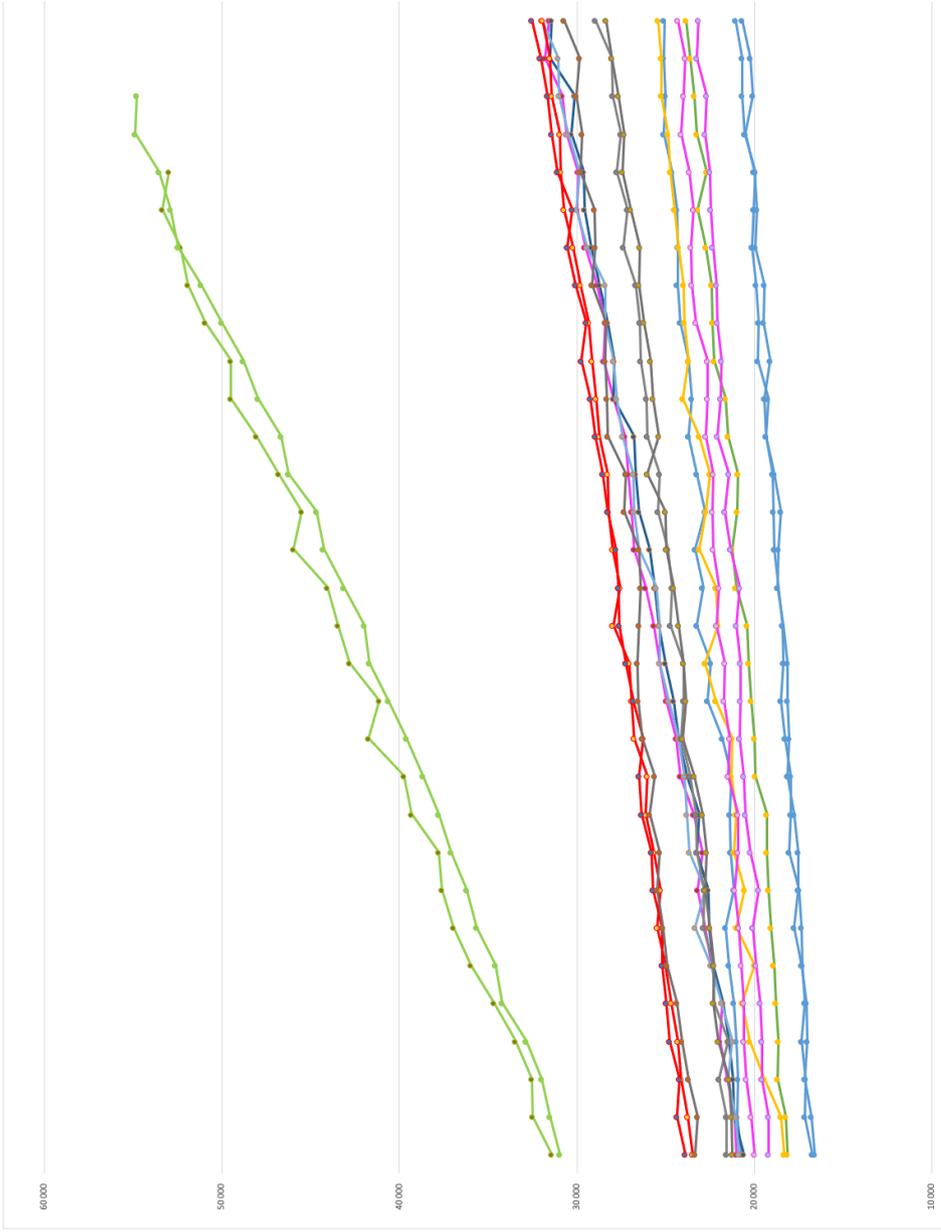
	Activité	Pente calibrant
1/100	0,51	3,54
1/70	0,68	5,12
1/40	1,28	9,14
1/15	3,42	22,21

Pente	6,32736189
Ord; origine	0,66824001



Résultats	
1/15 Contrôle B	2,1
1/15 Contrôle H	5,9
Pool LCR	1,06

	Patient 1			Patient 2			Patient 3		
0	29399	23493	23914	23318	21561	21236	19199	29986	19985
40	34573	23769	24352	23203	21587	21308	19196	29658	20178
80	51906	24109	24211	23695	21974	21430	19576	28928	20441
120	Dépassement	24305	24760	24090	21471	22051	19587	28317	20574
160	Dépassement	24670	24947	24364	22254	22320	19653	27934	20597
200	Dépassement	25015	25178	24933	22327	22280	19881	26937	20742
240	Dépassement	25473	25180	24913	22821	22520	20082	25672	20872
280	Dépassement	25299	25684	25462	22831	22782	19775	25401	21090
320	Dépassement	25654	25797	25319	23231	22681	20203	25254	20933
360	Dépassement	26111	26336	25891	23270	22905	20511	25726	20920
400	Dépassement	26020	26483	25613	23612	23361	20596	25819	21484
440	Dépassement	26794	26240	26305	24130	24032	20834	25663	21384
480	Dépassement	26896	26827	26523	23979	23843	20785	25732	21711
520	Dépassement	27040	27238	26607	24000	23993	20798	26116	21654
560	Dépassement	27957	27628	26488	24737	24262	21018	25717	22123
600	Dépassement	27553	27637	26401	24626	24555	20818	26158	21993
640	Dépassement	27974	27790	26513	24889	24979	21352	26228	22315
680	Dépassement	28214	28257	27310	25408	25014	21680	26193	22379
720	Dépassement	28248	28516	27234	25352	26047	21445	26524	22314
760	Dépassement	28747	28967	28244	26031	26373	22074	26985	22714
800	Dépassement	28926	29215	28309	26054	25717	21909	27794	22616
840	Dépassement	29153	29745	28378	26403	25860	21827	28294	22657
880	Dépassement	29336	29482	28373	26469	26226	22099	28698	23267
920	Dépassement	29776	30058	29163	26677	26490	22147	29578	23511
960	Dépassement	30212	30544	28966	27362	26428	22336	29476	23549
1000	Dépassement	30736	30259	29000	27164	26948	22464	29357	23411
1040	Dépassement	30891	31107	29779	27728	27439	22482	29392	23645
1080	Dépassement	30946	31419	29710	27503	27322	22796	30716	24119
1120	Dépassement	31441	31658	30006	27962	27660	22667	30324	23991
1160	Dépassement	31509	32046	29860	28043	28017	23226	30537	23903
1200	Dépassement	31933	32552	30725	28974	28330	23148	30746	24315



	Patient 1	Patient 2	Patient 3
enne R <sup>2</sup>	0,954642079	0,994914555	0,991724929
e	0,98259592	0,99344478	0,464107895
enne	6,924042339	6,046905242	0,815971441
	6,959637097	5,861522177	3,299677419
		5,915178091	3,417278226

Patient 1	1.01
Patient 2	0.86
Patient 3	0.50

### Annexe 3 : Formulaire SH-Form 43

	SUPPORT D'ENREGISTREMENT	PB-BIOCH-SE-223
	<b>SH FORM 43</b>	
	<b>Version 5</b> <b>Date d'application</b> <b>2019-11-05</b>	
Page 98/12		
Entité émettrice : LBM du CHU de CAEN		

Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une  
méthode de biologie médicale  
ECA LCR

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE	
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : ECA	
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/>	Processus complexe <input type="checkbox"/>

DESCRIPTION DU PROCESSUS DE VERIFICATION / VALIDATION			
	Etapes et éléments à vérifier (argumentation)	N/A Biblio Essai	Modalité de vérification/validation
ECA		E	<input checked="" type="checkbox"/> Répétabilité
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Fidélité intermédiaire
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Variabilité inter-opérateurs
	Pas de groupe de pairs existant	N/A	<input type="checkbox"/> Justesse
	Pas d'EEQ existant	N/A	<input type="checkbox"/> Exactitude
	Méthode quantitative, spécificité analytique	N/A	<input checked="" type="checkbox"/> Sensibilité et Spécificité
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Incertitudes
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Etendue de mesure
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Comparaison de méthodes
	Essai avec le captopril	E	<input checked="" type="checkbox"/> Interférences
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Contamination
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Robustesse et fiabilité des réactifs
		E	<input checked="" type="checkbox"/> Intervalle de référence

ECA	
<input type="checkbox"/> Portée A	<input checked="" type="checkbox"/> Portée B Mise en place d'un dosage de l'ECA dans le LCR en utilisant un substrat de dosage sérique.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	ECA/Activité de l'ECA dans le LCR
Principe de la Méthode :	Dosage spectrofluorimétrique sur plaque de l'activité de l'ECA dans le LCR dans le cadre du diagnostic de neurosarcoïdose.
Type d'échantillon primaire :	LCR
Type de récipient, additifs :	Flacon stérile.
Prétraitement de l'échantillon :	Congélation -20°C. Aliquotage et centrifugation.
Unité :	UI/L
Critères d'interprétation :	N 0.4-2.2 UI/L (Données expérimentales)
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	
Équipement (Instrument, analyseur, etc.) :	Lecteur de microplaque TECAN Infinite F200 PRO
Référence du réactif :	Substrat : A4980-1MG Abz-FRK(Dnp)P-OH trifluoroacétate salt SIGMA
Matériau d'étalonnage (références) :	ACE high sensitive KK-ACF B-ACF-CA BUHLMANN
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Calibration en 4 points : dilution du calibrant au 1/100, 1/70, 1/40 et 1/15.

MISE EN OEUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Stéphane ALLOUCHE (Biologiste) Julien SERRIER (Interne) Jean-Noël GOGUET (Interne)
Procédure de validation/mode opératoire :	PB-TRANS-PC-014 V8 D Procédure de vérification / validation de méthode  GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A)/VALIDATION (PORTEE B) DES METHODESEN BIOLOGIE MEDICALE Document SH GTA 04 Révision 01
Procédure de gestion de la portée flexible :	BM BB01  Portées-types d'accréditation SH INF 50 - Révision 07
Période d'étude :	Aout 2019 - Décembre 2020
Date de 1ère utilisation :	Mai 2020

## MAITRISE DES RISQUES

5M	Points critiques	Echelle de gravité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	5	Identification univoque de l'échantillon et du bon de demande	<b>Documents d'information pour les préleveurs :</b> <b>Manuel de prélèvement</b> consultable sur le portail intranet et internet du CHU de CAEN Procédure d'acceptation des échantillons : PB-TRANS-PC-005 Gestion des non-conformités pré-analytiques : PB-TRANS-PC-
	Type de contenants	3	Flacon stérile	<b>Documents d'information pour les préleveurs :</b> <b>Manuel de prélèvement et Répertoire des Analyses</b> consultables sur le portail intranet et internet du CHU de CAEN Procédure d'acceptation des échantillons : PB-TRANS-PC-005 Gestion des non-conformités pré-analytiques : PB-TRANS-PC-06  Formation des coursiers du CHU assurée par le RAQ ou l'AQ Véhicule de transport des échantillons inter sites équipé d'une enceinte thermostatée dont la température est suivie par une sonde reliée à Sirius
	Nature et volume de l'échantillon	4	LCR, au moins 50 microlitres	<b>Documents d'information pour les préleveurs :</b> <b>Manuel de prélèvement et Répertoire des Analyses</b> consultables sur le portail intranet et internet du CHU de CAEN Procédure d'acceptation des échantillons : PB-TRANS-PC-005
	Délai et température avant traitement analytique	3	<4h température ambiante	Gestion des non-conformités pré-analytiques : PB-TRANS-PC-06 et
	Prétraitement	2	Centrifugation à 10 000rpm pendant 2 minutes et aliquotage (2x60µL)	Formation des coursiers du CHU assurée par le RAQ ou l'AQ Véhicule de transport des échantillons inter sites équipé d'une enceinte thermostatée dont la température est suivie par une sonde reliée à Sirius Gestion des équipements : PB-TRANS-PC-018 Entretien du petit matériel : PB-TRANS-FT-078 Traçabilité de l'entretien du petit matériel sur Armure Vérification annuelle des centrifugeuses dans leurs conditions d'utilisation : température, vitesse et temps

MAITRISE DES RISQUES				
5M	Points critiques	Echelle de gravité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
				avec délivrance d'un certificat de conformité intégré dans ARMURE
	Interférences	4	Vérification de l'aspect du LCR	Contrôle visuel avant technique et après si résultat aberrant
	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	4	Conservation congelé à -20°C	Notices fournisseurs intégrées dans ARMURE  PB-TRANS-PC-028 : Gestion métrologique des EDT et des sondes

## MAITRISE DES RISQUES

5M	Points critiques	Echelle de gravité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Milieu</b>	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	4	Contrôles et calibrant : conservés à +4°C	Notices fournisseurs intégrées dans ARMURE
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	3	Substrat : aliquoté et congelé à -20°C  Respect par le personnel des règles d'hygiène et de sécurité	PB-TRANS-PC-028 : Gestion métrologique des EDT et des sondes Manuel d'utilisation intégré dans ARMURE Eventuellement : climatisation de la pièce avec suivi de la température par une sonde COFRAC raccordée à une centrale de gestion des températures : SIRUS Gestion métrologique des EDT et des sondes : PB-TRANS-PC-028 Elimination des déchets : PB-TRANS-PC-32 Hygiène et sécurité : PB-TRANS-PC-011
	Surveillance des dérives	2	Maintenances réalisées selon les recommandations du fournisseur  Suivi métrologique des équipements critiques  Suivi des CIQ	Notices intégrées dans ARMURE PB-TRANS-FT026 Contrôle des pipettes, PB-TRANS-PC-028 Gestion métrologique, PB-BIOCH-SE-234 tableau métrologie biochimie Gestion des CIQ transversale : PB-TRANS-PC-027
<b>Matériel (équipements)</b>	Contamination	1		Contamination inter-échantillon : cf plan d'expériences
	Utilisation du lecteur Tecan Magellan	2	Maîtrise de l'automate	PB-HEMATO-DE-317 Manuel utilisation lecteur Tecan, Fiche technique
	Utilisation de Magelan	2	Maîtrise du logiciel	PB-HEMATO-FT-256 Utilisation logiciel Magelan
	Maintenance lecteur Tecan	1		PB-HEMATO-FT-254 Maintenance lecteur Tecan

## MAITRISE DES RISQUES

5M	Points critiques	Echelle de gravité	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conservation et conditions d'utilisation	4	Contrôles et calibrant : conservés à +4°C  Substrat : aliquoté et congelé à -20°C	Fiches fournisseur intégrées dans ARMURE PB-TRANS-PC-028 : Gestion métrologique des EDT et des sondes Tableau métrologiques : PB-TRANS-SE-074 PB-BIOCH-FT-264 Détermination de l'activité de l'ECA dans le LCR
	Gestion des stocks	2	Gestion des stocks	Gestion des commandes et des stocks : PB-TRANS-PC-019
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	3	Contrôles et calibrant à reconstituer dans 2mL d'eau distillée Substrat à reconstituer dans 1,2mL de DMSO Pipettes COFRAC	PB-TRANS-PC-029 : Gestion métrologique des pipettes PB-BIOCH-FT-264 Détermination de l'activité de l'ECA dans le LCR
<b>Méthode</b>	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	3	Plan d'expérience selon SH-GTA 04	Procédure de vérification/validation de méthode ; PB-TRANS-PC-014  <i>Voir SH GTA 04 §9.6.1.7</i>
	Causes d'incertitude de mesure	5		Estimation des incertitudes de mesure : PB-TRANS-PC-025 Table de calcul d'incertitude/validation de méthodes quantitatives : PB-TRANS-SE-104  <i>Voir SH GTA 04 §9.6.1.5</i>
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	3	Techniciens de laboratoires habilités aux postes : BARROCHE Dominique, CASSAULT MEYER Estelle, LEMARIE Dorothée, RAVIER Valérie  Suivi du maintien d'habilitation	PB-TRANS-PC-015 Gestion du personnel PB-TRANS-PC-008 Habilitation du personnel PB-TRANS-SE-Traçabilité du suivi du maintien des habilitations PB-BIOCH-SE-407 Quizz d'habilitation technicien ECA LCR et PB-BIOCH-SE-408 avec réponse Traçabilité des plannings

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### REPETABILITE

<input checked="" type="checkbox"/> Applicable					<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)			
Unité	UI/L							
Date	14/05/2020							
Echantillons / Niveaux	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Sources	Conclusion
LCR	29	1,59	0,091	5,71	20			VALIDE

Argumentaire de la conclusion : Répétabilité effectuée avec un pool de LCR de patients considérés comme sains avec examens de biochimie et microbiologie normaux.

### FIDELITE INTERMEDIAIRE

<input checked="" type="checkbox"/> Applicable					<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)			
Unité	UI/L							
Période	02/04/2020-19/05/2020							
Echantillons / Niveaux	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) retenu par le laboratoire	CV (%) fournisseur	Sources	Conclusion
LCR Contrôle Bas	27	2,46	0,196	7,97	20	N/A		VALIDE
LCR Contrôle Haut	26	5,79	0,525	9,08	20	N/A		VALIDE
LCR Pool	11	1,78	0,131	7,40	20	N/A		VALIDE

### VARIABILITE INTER-OPERATEURS

<input checked="" type="checkbox"/> Applicable		<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)	
Opérateurs	Résultats de la variabilité		
Opérateur 1	2/3 contrôles conformes		
Opérateur 2	Tous les contrôles conformes		
Opérateur 3	Tous les contrôles conformes		
Opérateur 4	Tous les contrôles conformes		

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateurs est un point critique de la méthode. Le seuil d'acceptabilité a été fixé à un Z-score de 2, seul l'opérateur 1 atteint un Z score de 2,07 pour un niveau de contrôle. Trois opérateurs atteignent un niveau total de conformité ce qui rend la variabilité acceptable.

### JUSTESSE

<input type="checkbox"/> Applicable		<input checked="" type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)	
-------------------------------------	--	--	--

Argumentaire de la conclusion : Pas de groupe de pairs existant

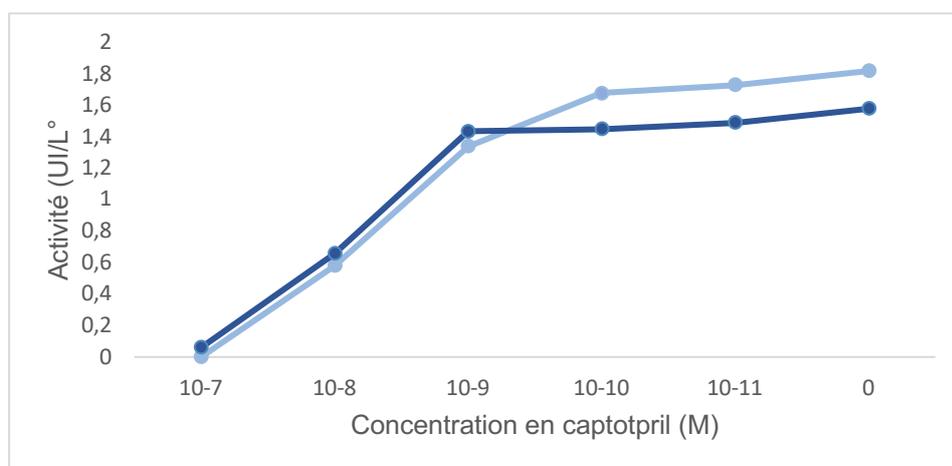
EXACTITUDE	
<input type="checkbox"/> Contr quantitatif	<input type="checkbox"/> Contr qualitatif

Argumentaire de la conclusion : Pas d'EEQ existant

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE	
<input type="checkbox"/> Applicable	<input checked="" type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)

Les sensibilité et spécificité de ce biomarqueur (détermination de VPP et VPN) n'ont pas été évaluées car il aurait fallu disposer de sujets témoins et de sujets atteints de neurosarcoïdose.

Un essai sur la spécificité analytique a été réalisé en ajoutant des concentrations croissantes de captopril ( $10^{-5}$  à  $10^{-11}$  M), un IEC bien connu, dans le milieu réactionnel afin d'en déterminer l'effet sur les résultats rendus sur le pool de LCR. L'essai a été réalisé à trois reprises, le premier n'ayant pu être qualifié en raison d'une non-validation des contrôles a tout de même permis de constater l'absence totale d'activité lorsque le captopril est utilisé à  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ou  $10^{-7}$  M. Les deux autres essais ont donc été menés à partir de  $10^{-7}$  M.



Argumentaire de la conclusion : Le captopril inhibe l'activité de l'ECA dès  $10^{-11}$  M et l'inhibe totalement à  $10^{-7}$  M. La CI50 se situe entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M, en accord avec la valeur de 23 nM retrouvée dans la littérature (Ondetti, 1988).

INCERTITUDE DE MESURE	
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)
Unité	UI/L
Période d'évaluation CIQ	Idem reproductibilité

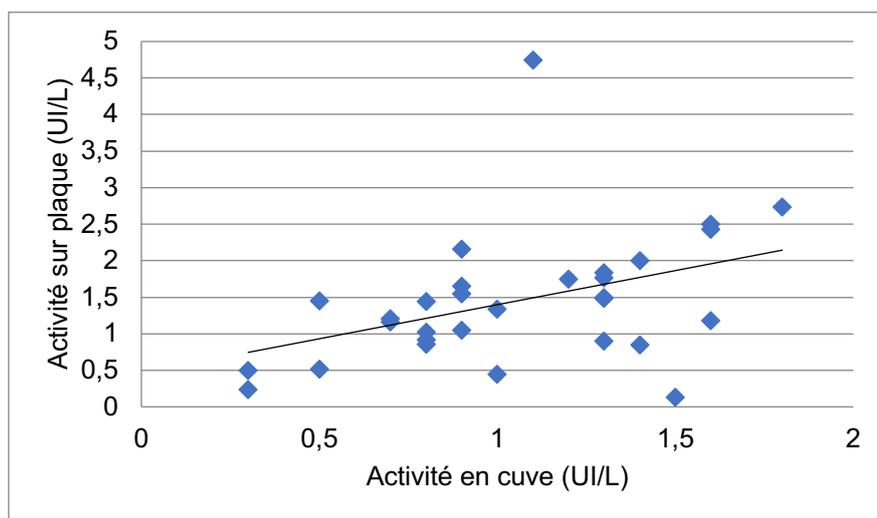
<input type="checkbox"/> Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle)		<input type="checkbox"/> Calcul
		Exigence de performances
Mode de calcul	Méthode CIQ-Etalon fournisseur	
Quantification de l'incertitude (Pool LCR) :	0,18 (10%)	20%
Quantification de l'incertitude (Contrôle Bas) :	0,21 (8,6%)	20%
Quantification de l'incertitude (Contrôle Haut) :	0,53 (9,2%)	20%

Argumentaire de la conclusion : L'étalon utilisé est le calibrant dont les données de performance ont été fournies par le fournisseur, les valeurs cibles des contrôles sont celles de reproductibilité.

ETENDUE DE MESURE				
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable		<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)		
	Etude bibliographique	Etude expérimentale		
Limite de détection (UI/L) :	N	Moyenne	Ecart-type	LDD Laboratoire
	10	-0,04	0,028	0,01
Limite de quantification (UI/L) :	0,28			
Limite supérieure de linéarité (UI/L) :	0,84 (sans dilution)			

COMPARAISON DE METHODES	
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)
Unité	UI/L
Date	09/10/2020
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Spectrofluorimétrie en Cuve
Nombre de mesures :	30

La comparaison de méthode a été réalisée rétrospectivement sur 30 échantillons de LCR pour lesquels le dosage de l'activité de l'ECA avait été réalisé dans le service de Biochimie, avec une technique de spectrofluorimétrie se basant sur les mêmes principes physiques que celle développée ici. Il n'a pas été possible de passer des échantillons en parallèle sur les deux méthodes en raison d'une défaillance de l'ancien lecteur et de son système d'exploitation, le rendant définitivement inutilisable alors seuls les premiers tests avaient été menés avec la méthode mise en place. Les valeurs de référence de la technique en cuve étaient de 0,1 à 1,3 UI/L, pour rappel, elles sont de 0,40 à 2,20 UI/L pour la technique sur plaque. Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0,41 (16 patients sur 30 non corrélés), montrant une corrélation faible, mais statistiquement significative avec un  $p=0,024$ . Le diagramme de comparaison montre une pente de 0,93 et une ordonnée de 0,45.



Argumentaire de la conclusion : D'un point de vue interprétatif, concordance des deux techniques sur 26 patients sur 30 (86,7%).

INTERFERENCES	
<input type="checkbox"/> Applicable	<input checked="" type="checkbox"/> Non applicable à justifier)

Aucun essai spécifique n'a été mené sur la contamination sérique du LCR. Les LCR sanguinolents sont écartés d'emblée et le quotient albumine permet de rapprocher les résultats élevés d'une éventuelle brèche de la BHE. L'essai de spécificité analytique avec le captopril permet de confirmer l'interférence d'un traitement par IEC.

CONTAMINATION	
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable à justifier)
Unité	UI/L
Date	04/09/2020

	Moyennes
B1	0,003
B2	0,000
H	5,39

Echantillon valeur haute utilisé	Controle haut 1/15
Echantillon valeur basse utilisé	Blanc
Nombre de séquence(s)	2
Contamination Laboratoire selon la formule $(mB1 - mB2) * 100 / (mH - mB2)$	0,06 %
Biais calculé (B1 - B2)	0,003
Biais toléré	0,28

Conclusion	Conforme
------------	----------

Argumentaire de la conclusion : Pas de contamination

ROBUSTESSE ET STABILITE DES REACTIFS	
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)
Stabilité 3024,00 heures soit 126,00 jours	

Argumentaire de la conclusion : L'essai concerne le pool LCR. Le substrat et le tampon réactionnel ont également été évalués et ont été déclarés stables sur 6 mois.

INTERVALLE DE REFERENCE		
<input checked="" type="checkbox"/> Applicable	<input type="checkbox"/> Non applicable (à justifier)	
Valeurs de référence		Plage 1
	1.	2,21
	2.	1,46
	3.	1,95
	4.	1,76
	5.	1,30
	6.	1,53
	7.	2,50
	8.	1,58
	9.	1,28
	10.	2,21
	11.	1,14

12.	1,53
13.	1,40
14.	1,24
15.	1,39
16.	0,65
17.	1,90
18.	0,50
19.	1,92
20.	0,95
21.	1,08
22.	1,37
23.	1,12
24.	1,81
25.	1,49
26.	0,89
27.	1,23
28.	1,17
29.	1,40
30.	0,93
31.	1,05
32.	1,41
33.	0,7
34.	0,99
35.	1,69
36.	1,03
37.	1,41
38.	0,5
39.	1,29
40.	1,30
41.	1,13
42.	1,35
43.	0,77
44.	1,02
45.	1,09
46.	0,69
47.	0,70
48.	1,63
49.	2,15
50.	2,09
Valeur de référence	De 0,44 à 2,19 UI/L

Argumentaire de la conclusion : 50 échantillons de LCR conservés dans le laboratoire de Biochimie après réalisation des dosages usuels (protéinorachie, glycorachie). La sélection des échantillons est faite parmi ceux traités et congelés dans les six derniers mois au laboratoire. Les critères de sélection étaient les mêmes que ceux de réalisation du pool de LCR.

## Annexe 4 : Quizz d'habilitation technicien

	SUPPORT D'ENREGISTREMENT	PB-BIOCH-SE-408
	<b>QUIZZ HABILITATION TECHNICIEN ECA LCR (AVEC REPONSES)</b>	Version V1 Date d'application
		Page 1/2
Entité émettrice : LBM du CHU de CAEN		édité le 15 septembre 2021

**Objet :** questionnaire d'habilitation technique

**Destinataire :** personnel à habilitier

NOM-Prénom :

Date :

<b>Question n°1</b>
Quelles sont les modalités de conservation d'un échantillon de LCR pour le dosage de l'activité de l'ECA ?
<i>Réponse : jusqu'à 7 jours à +4°C, puis congelé à -20°C.</i>
<i>Avis du responsable de la formation :</i>

<b>Question n°2</b>
Comment est réalisée la calibration ? Comment est-elle contrôlée ?
<i>Réponse : Utilisation d'un calibrant avec une activité donnée (Bühlmann, attention activité peut varier selon le N° de lot) à diluer au 1/100, 1/70, 1/40 et 1/15 et à analyser en triplicate Validation de la calibration avec un contrôle haut 1/15, contrôle bas 1/15, et un pool LCR 1/5</i>
<i>Avis du responsable de la formation :</i>

<b>Question n°3</b>
Décrire brièvement le principe du dosage. A quelle température est réalisée la lecture ?
<i>Réponse : dosage en spectrofluorimétrie en utilisant un substrat de l'ECA qui possède une partie fluorescente libérée lors de l'hydrolyse du substrat par l'ECA, faisant alors augmenter la fluorescence du milieu La réaction se déroule à 37°C</i>
<i>Avis du responsable de la formation :</i>

<b>Question n°4</b>
Que faites-vous pour les résultats de calibration ci-dessous ? La calibration est-elle valide ?

	1/100 Bühlmann			1/70 Bühlmann			1/40 Bühlmann			1/15 Bühlmann	
R <sup>2</sup>	0,4573906	0,9883454	0,9868825	0,99610649	0,996035787	0,9959103	0,9985178	0,9814225	0,9984306	0,9978445	0,998573
Moyenne R <sup>2</sup>		0,810872831			0,996017522			0,992790286			0,9984878
Pente	1,9516028	3,903125	4,0296573	5,7865625	5,89859879	5,8644859	10,346905	11,602046	10,645192	26,701087	26,74397
Moyenne		3,294795027			5,849882392			10,86471438			26,548397
CV				0,195394074			0,05774843		0,091311488		
				Entre 100 et 15 :			0,1726318				

Réponse : La pente du premier puits 1/100 est à supprimer ( $R^2 < 0.98$ ), on peut également supprimer celle du 2<sup>e</sup> puits 1/40 (discordance avec les deux autres). Toutes les dilutions du calibrant ont au moins 2/3 puits acceptables, si les CV restent  $< 20\%$ , alors la calibration est valide.

Avis du responsable de la formation :

### Question n°5

Dans une série où la calibration est valide, vous obtenez les résultats patients suivants. Que faut-il faire pour chaque patient et y a-t-il des résultats ne pouvant être rendus ?

	Patient 1			Patient 2			Patient 3			Patient 4	
R <sup>2</sup>	0,993476	0,961665	0,994672	0,9987479	0,9986379	0,998576	0,990228	0,965495	0,852858	0,995775	0,997964
Moyenne R <sup>2</sup>		0,983271175			0,998653972			0,936193681			0,96174830
Pente	4,808196	4,471069	5,105917	14,674294	13,97666331	13,77416	3,576462	7,609234	20,55483	10,37164	9,976018
Moyenne		4,795060484			14,14170699			10,58017473			12,1190121

Réponse : - Patient 1 : 2<sup>e</sup> puits à supprimer, 2/3 puits valides = OK

- Patient 2 : OK

- Patient 3 : 2/3 corrélations  $< 0.98$ , valeurs de pentes discordantes, à redoser

- Patient 4 : 3<sup>e</sup> puits à supprimer, 2/3 puits valides = OK

Avis du responsable de la formation :

### Conclusion sur le quizz

Nombre de réponses erronées / insuffisantes au questionnaire :

$\geq 1 \Rightarrow$  Formation à approfondir

Points à revoir :

0  $\Rightarrow$  Habilitation OK



**Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE



## **Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

## **TITRE**

Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR dans le cadre du diagnostic de neurosarcoïdose

---

## **Résumé**

L'ECA est un marqueur biologique prenant part au diagnostic de neurosarcoïdose. Le dosage de son activité dans le LCR est une analyse très spécialisée réalisée dans quelques laboratoires en France. L'absence de standardisation oblige les laboratoires voulant proposer ce dosage à développer leurs propres méthodes adaptées de la littérature ou de kits commerciaux, peu performants en l'état. En France, le développement complet d'une technique s'inscrit dans le cadre de la validation de méthode imposé par le COFRAC et nécessite la réalisation de plusieurs tests de performance. Ce travail reprend donc le développement d'une technique de dosage de l'activité de l'ECA dans le LCR au sein du laboratoire de Biochimie du CHU de Caen, et la réalisation des essais nécessaires à sa validation.

---

## **TITLE**

Development and validation of a method for assaying ACE activity in CSF for the diagnosis of neurosarcoidosis

---

## **Summary**

ACE is a biomarker involved in the diagnosis of neurosarcoidosis. The determination of its activity in CSF is a very specialized analysis realized in few laboratories in France. Due to the lack of standardization, laboratories have to develop their own methods adapted from the literature or use commercial kits with poor performance. In France, the full development of a technique is part of the method validation process imposed by COFRAC and requires the realization of several performance tests. This work therefore resumes the development of a technique for assaying the activity of ACE in CSF in the Biochemistry laboratory of the University Hospital of Caen, and the execution of the tests necessary to its validation.

---

## **Mots-clés**

ECA, neurosarcoïdose, LCR, spectrofluorimétrie, validation

---