

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Biochimie Appliquée

Thème

Vérification de deux méthodes de détermination quantitative du calcium sanguin

Réalisé par :

Abiza Douaa

Chihaoui Khouloud

Ghouli Khaled

Zembouaa Rahma

Devant le jury composé de :

Président : Dr Hayatte AYAD

Maitre de Conférence Classe B

Examinatrice : Dr Wissem ABDAOUI

Maitre de Conférence Classe B

Encadrant : Dr Asma BRAIK SERIDI

Maitre de Conférence Classe B

Jun 2022

Remerciement

Tout d'abord remercions Dieu tout puissant qui nous a éclairés vers le bon chemi [۞]

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

*Nous voudrions adresser toute notre gratitude à notre encadrant, **Docteur Asma Braik Seridi**, Maitre de conférences à l'université de Guelma, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Nous adressons nos vifs remerciements aux membres de jury, **Docteur Ayad Hayette**, Maitre de conférence à l'université de Guelma comme présidente du jury et **Docteur Abdaoui Wissem**, Maitre de Conférence à l'université de Guelma comme examinatrice de notre travail. Nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de sacrifier une partie de votre temps pour examiner notre humble travail.*

*Nous remercions les membres du laboratoire de Biochimie d'Annaba **Professeur Gouri** et **Docteur Laaskri** de nous avoir accueillis dans leur laboratoire, et nous avoir fourni les outils nécessaires à la réussite de nos recherches.*

*Nous remercions également les membres du laboratoire d'urgence de l'hôpital Hakim Okbi à Guelma **Madame Noura** et **Madame Imane** et **Monsieur Abd- allah**,
Merci pour tout ce que nous avons appris de vous.*

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU

Je dédie ce mémoire de fin d'études

A mes très chers parents : Nouredine et Fatima Zohra

*en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts
qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation et n'ont jamais cessé de
m'encourager tout au long de mes années d'études*

Que Dieu vous protège et vous donne bonne santé et longue vie.

A mes chères sœurs : Yamina & Nor El-Houda

pour leur affection, compréhension et patience

*A mes amis : Safa, Mayssa, Chaima, Taqwa, Bochra, Douaa, Riyane, Aya, Hind,
Imane, ...*

Pour m'avoir été d'un grand appui aux moments difficiles durant mes études supérieures.

*J'adresse mes remerciements à mon oncle Youcef et sa femme Samiha pour leur soutien,
et encouragement pour la réalisation de ce modeste travail.*

A tous mes professeurs et mes collègues

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance pour m'avoir apporté leur support moral et
intellectuel tout au long de ma démarche.*

A tous ceux que j'ai oublié de citer mes sincères excuses

Khouloud

Dédicace

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU***

De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail

Je tiens à dédier cet humble travail à :

*A ma mère **WARDA**, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices*

*A mon père **NOUR ELDINNE**, pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé*

*A mon cher mari **MOUHAMMED** pour la patience, le soutien et l'amour, pendant toute la durée de ce travail*

*Ames chers frères **ABD EL ALI et IYED***

*A ma belle sœur **AMOUNA***

*A mes chers **WAFa, ASSIA, MANAR et GHOFRANE** .*

A ma famille, mes proches et à tous ceux qui m'ont encouragé A tous ceux qui j'aime

A tous ceux qui, ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

*Sans oublier mes collègues de ce travail **DOUAA, KHOULOUd et KHALED**.*

Rahma

Dédicace

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU***

De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédie ce mémoire:

*à mes parents (**Said & Sonia**),*

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

*à mes petits frères (**Ayyoub, Youcef, Seif Eddine et Yaakoub**),*

*à mes tantes, oncles et cousins (**Heythem & Anis et Didou**),*

*à mes amis : **Med Zine, Youcef, Hamza.B** , Aziz , Coach **Merabti**,*

*Au personnel du Département de Biologie : **Mr.Chemmam, Mme.Gherib,**
Mme.Ayaichia et Mes amis Hamza.H et Sami*

*à mes professeurs à l'université pour les deux années du master en biochimie
appliquée :*

Mme.Grara, Mme.Souiki, Mme.Kirat, Mme.Merabet, Mr.Gueroui,
Mme.Yakhlef, Mme.Bouteldja, Mr.Adrar

*à **Mr.Khacha & Mme.Bensouilah** et tout l'équipe des informaticiens :
Mr.Chelaghmia & Mr.Zerdoudi.*

Merci beaucoup pour tout le soutien que vous m'avez apporté pendant mes études.

Khaled

Dédicace

Je dédie de modeste travail :

Ô DIEU créateur de l'univers ; sans ta protection et ton grand amour, nous ne parviendrons à rien. Merci pour ta miséricorde.

*A mon cher père **ABD ELOUAHAB**, reçois très cher père à travers ce document, mes remerciements pour tout ce que tu ne cesses de faire pour tes enfants en général et pour moi en particulier. Merci papa pour tout et que Dieu te prête longue vie afin que tu puisses bénéficier de nous.*

*A ma mère **FOUZIA**, merci très chère mère pour tes sacrifices à l'endroit de tes enfants ; nous ne saurons comment t'en remercier.*

*A mes chères sœurs **ASMA** et **CHAIMA** et ma nièce et ma petite princesse **LAYEN**, je vous souhaite à tous plein de joie et de bonheur.*

*Un grand merci du fond du cœur à mes collègues **Khaled, Khouloud, Rahma** pour les bons moments surtout cette année et pour vos efforts.*

*A mes chères amies **ROMAISSA, WALLA, CHIRAZ, CHAIMA, ASSALA, AYA, KHOULOU** merci pour tous les moments inoubliables, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.*

*A tous ceux qui m'ont soutenu moralement avec leurs présences et par leurs gentillesse.
En fin, à toute la promotion de la biochimie appliquée 2022.*

Douaa

Résumé

La détermination quantitative de la calcémie se fait par plusieurs méthodes analytiques faisant l'objet de protocole de vérification/validation de performance. La présente étude vise à vérifier et comparer les performances analytiques de deux automates COBAS INTEGRA Plus 400 et BIOSYSTEME A15. Le dosage de calcémie par méthode complexométrique (NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400) et par méthode colorimétrique (ARSENAZO- Biosystème A15) a été effectué sur 30 échantillons sanguins appartenant à des sujets anonymes. Des modules de fidélité (répétabilité, reproductibilité) et de justesse ont été effectués sur deux niveaux de contrôle (normal et pathologique). Les résultats présentent une forte corrélation positive ($R=0.73$) entre les deux systèmes avec des moyennes de calcémie statistiquement similaires. Les deux méthodes ne sont pas fidèles avec des coefficients de variation supérieurs aux normes. La méthode NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400 est d'une bonne justesse contrairement à la méthode Arsenazo- BIOSYSTEME A15 qui n'est pas juste comparée aux normes. En conclusion, l'automate COBAS INTERGA 400 PLUS est apte à doser la calcémie de manière plus fiable que le BIOSYSTEM A15.

Mots-clés : Calcémie ; Vérification/Validation de méthodes ; NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400 ; Arsenazo III ; BIOSYSTEME A15.

Abstract

Quantitative determination of blood calcium is performed by several analytical methods that are subject to performance verification/validation protocols. The present study aims at verifying and comparing the analytical performances of two automated systems COBAS INTEGRA Plus 400 and BIOSYSTEME A15. Calcemia determination by completeometric method (NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400) and by colorimetric method (ARSENAZO- Biosystem A15) was performed on 30 blood samples from anonymous subjects. Fidelity (repeatability, reproducibility) and accuracy were performed on two control levels (normal and pathological). The results show a strong positive correlation ($R=0.73$) between the two systems with statistically similar mean blood calcium levels. Both methods are not accurate with coefficients of variation above the norms. The NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400 method is accurate, while the Arsenazo- BIOSYSTEME A15 method is not accurate compared to the standards. In conclusion, the COBAS INTERGA 400 PLUS is able to measure blood calcium more reliably than the BIOSYSTEM A15.

Keywords: Calcemia; Verification/Validation of methods; NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400; Arsenazo III; BIOSYSTEM A15.

ملخص

يتم التحديد الكمي للكالسيوم في الدم من خلال عدة طرق تحليلية تخضع لبروتوكولات التحقق / التحقق من الأداء. تهدف هذه الدراسة إلى التحقق ومقارنة الأداء التحليلي لجهازين آليين COBAS INTEGRA Plus 400 و BIOSYSTEME A15. تم تحديد نسبة الكالسيوم في الدم بطريقة القياس المركب (NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400) وطريقة القياس اللوني (ARSENAZO- Biosystem A15) على 30 عينة دم تنتمي إلى أشخاص مجهولين. تم إجراء وحدات الإخلاء والدقة على مستويين من التحكم (العادي والمرضي). أظهرت النتائج وجود ارتباط إيجابي قوي ($R=0.73$) بين النظامين بمتوسطات الكالسيوم في الدم المتشابهة إحصائياً. الطريقتان غير متوافقتان مع معاملات تباين أعلى من المعايير. تتميز طريقة (NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400) بدقة جيدة، على عكس طريقة (ARSENAZO- Biosystem A15)، وهي طريقة غير دقيقة مقارنة بالمعايير. في الختام، فإن محلل COBAS INTEGRA Plus 400 قادر على قياس الكالسيوم في الدم بشكل أكثر موثوقية من BIOSYSTEME A15 .

الكلمات المفتاحية: كالسيوم؛ التحقق من صحة الأساليب؛ NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus؛ Arsenazo III ; BIOSYSTEM A15

Liste des abréviations

PTH : la parathormone.

HPP : L'hyperparathyroïdie primaire.

HAM : l'hypercalcémie associée à une tumeur maligne.

ISO NF : Organisation internationale de normalisation selon norme française.

EDTA : l'acide éthylènediamine-N, N, N', N'-tétraacétique.

EGTA : l'acide éthylèneglycol bis-(2-aminoéthyl éther)-N, N, N', N'-tétraacétique.

LBM : Laboratoire de biologie médicale.

SFBC : la Société française de biologie clinique.

SAA : la spectrophotométrie d'absorption atomique.

TRPV : le canal cationique à potentiel de réception transitoire, sous-famille V.

pH: Potentiel hydrogène .

CaSR: The calcium-sensing receptor.

o-CPC : Orthocrélphtaleine Complexon.

FGF23 : fibroblastes-23.

Liste des Figures

Figure 1 : Localisation du calcium dans le tableau périodique (Weiss, 2006).-----	4
Figure 2: Représentation schématique des différentes protéines de transport du Ca ²⁺ de la membrane plasmique et des principales réserves intracellulaires (Brini et al., 2013). ----	10
Figure 3: Métabolisme du calcium dans l'organisme (Song, 2017a).-----	11
Figure 4: Régulation de la sécrétion et du métabolisme de l'hormone parathyroïdienne métabolisme (Moe, 2016).-----	13
Figure 5: Métabolisme de la vitamine D (Moe, 2016).-----	14
Figure 6: Équilibre normal du calcium dans le sang (Moe, 2016). -----	16
Figure 7: Structure du réactif colorimétrique bleu de méthylthymol (MTB) (Lin et al., 1999)-----	23
Figure 8: Vue schématique d'un spectromètre à double faisceau pour des mesures d'absorption atomique (Fernández et al., 2018b).-----	25
Figure 9: Diagramme schématique d'un spectrophotomètre de flamme (Fernández-Sánchez et al., 2018). -----	26
Figure 10: Structure de la molécule de calcium chélatée par l'EDTA (Tsai et al., 2015). 26	
Figure 11: Automate Roche COBAS INTEGRA R 400 plus w/o ISE -----	37
Figure 12: Automate BIOSYSTEME A 15 -----	38
Figure 13: Diagramme de corrélation BAPTA / ARSENAZO du dosage de la calcémie-45	
Figure 14: Comparaison entre les taux de calcémie dosée par deux méthodes analytiques. -----	46

Liste des Tableaux

Tableau/ 1 : Propriétés atomiques et physiques du calcium (Perrone et Monteiro, 2015).	5
Tableau/ 2 : Différence entre vérification et validation des méthodes d'analyse quantitatives(Jean Longtin, n.d.). -----	31
Tableau/ 3 : Résultats de l'étude de répétabilité-----	46
Tableau/ 4 : Résultats de l'étude de reproductibilité-----	49
Tableau/ 5 : Résultats de l'étude de justesse -----	50

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	
<i>Remerciements</i>	
<i>Résumés</i>	
Liste des abréviations	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Table des matières	
Introduction	1
Volet théorique	3
I. <i>Calcium et calcémie : Notions générales</i>	4
1. Définition et structure du calcium	4
2. Localisation et rôles du calcium	6
2.1. Localisation	6
2.2. Rôle du calcium.....	6
3. Sources du calcium	7
4. Stockage et transport du calcium	8
4.1. Stockage du calcium	8
4.1.1. Stockage du calcium par le réticulum sarcoplasmique	8
4.1.2. Stockage du calcium par le réticulum endoplasmique.....	9
4.2. Système de transport du calcium.....	9
4.2.1. Canaux de Ca^{2+}	9
4.2.2. Pompes à Ca^{2+}	9
4.2.3. Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique.....	10
5. Mécanismes de l'homéostasie du calcium	11
5.1. Métabolisme de calcium sanguin	11
5.2. Régulation du calcium	12
5.2.1. Régulation par l'hormone parathyroïdienne	12
5.2.2. Vitamine D.....	13
5.2.3. Calcitonine.....	15
6. Valeur de référence de la calcémie	15
6.1. Hypocalcémie	16
6.2. Hypercalcémie	17
7. Facteurs modifiant la calcémie.....	18
7.1. Facteurs endogènes.....	18
7.1.1. Microbiote	18
7.1.2. Sérotonine.....	18
7.2. Facteurs exogènes	19
7.2.1. Régimes alimentaires.....	19

7.2.2.	Graisses-----	19
7.2.3.	Produits laitiers-----	19
7.2.4.	Fibres -----	19
7.2.5.	Peptides liant le calcium -----	19
7.2.6.	Caséine -----	20
7.2.7.	Eléments minéraux -----	20
7.2.8.	Caféine -----	21
II.	Méthodes de dosages du calcium sanguin -----	22
1.	Historique -----	22
2.	Méthodes analytiques de calcium sanguin -----	23
2.1.	Méthodes colorimétriques-----	23
2.1.1.	Colorimétrie au bleu de méthylthymol -----	23
2.1.2.	L'O-crésolphtaléine complexon -----	24
2.2.	Méthodes physiques-----	24
2.2.1.	Spectroscopie d'absorption atomique-----	24
2.2.2.	Méthodes photométriques par émission de flamme -----	25
2.3.	Méthodes complexométrique -----	26
III.	Vérification/validation des performances de méthodes analytiques -----	28
1.	Définition de protocole de Vérification/validation de méthodes d'analyse -----	28
2.	Terminologie -----	28
3.	Démarche à suivre pour la Validation / vérification des méthodes quantitatives. 30	
3.1.	Etapes de la validation / vérification des méthodes quantitatives -----	30
3.2.	Différence entre vérification et validation des méthodes analytiques -----	30
3.3.	Modules de vérification/validation des méthodes d'analyse quantitatives---	31
3.3.1.	Fidélité (Répétabilité) -----	31
3.3.2.	Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)-----	32
3.3.3.	Justesse -----	33
3.3.4.	Limites de linéarité -----	34
3.3.5.	Comparaison avec une autre méthode -----	34
	Volet pratique -----	36
1.	Lieu et période de travail -----	37
2.	Equipements et réactifs -----	37
3.	Phase pré-analytique -----	38
3.1.	Prélèvement sanguin -----	38
3.2.	Prétraitement des échantillons-----	38
4.	Méthodes analytiques -----	39
4.1.	Dosage du calcium sérique par méthode colorimétrique Arsénazo III-----	39
4.1.1.	Principe du dosage-----	39
4.1.2.	Mode opératoire -----	39
4.1.3.	Expression des résultats -----	39
4.2.	Dosage du calcium sérique par méthode complexométrique BAPTA -----	39
4.2.1.	Principe du dosage-----	40
4.2.2.	Mode opératoire -----	40
4.2.3.	Expression des résultats -----	40

5. <i>Protocole de vérification/ validation des méthodes Arsenazo-Bapta.</i> -----	40
5.1. Etude de la comparaison de méthodes analytiques -----	41
5.2. Etude de la répétabilité -----	41
5.3. Etude de la reproductibilité (fidélité intra-laboratoire) -----	41
5.4. Approche de la justesse (Module 3) -----	42
6. <i>Analyse statistique</i> -----	42
<i>Résultats et Interprétation</i> -----	44
1. <i>Résultats de corrélation entre la calcémie dosée par deux méthodes analytiques</i> --	45
2. <i>Résultat de la répétabilité</i> -----	46
3. <i>Résultat de la reproductibilité</i> -----	48
4. <i>Résultat de la justesse</i> -----	49
<i>Conclusion</i> -----	54
<i>Références bibliographique</i> -----	Error! Bookmark not defined.
<i>Annexes</i> -----	64

Introduction

Dans l'organisme, le calcium joue un rôle structurel majeur dans la formation des os, dans la coagulation sanguine, la fonction neurologique et neuromusculaire et la signalisation intracellulaire. La majorité du calcium dans l'organisme est localisée dans les os 99%. L'os est un organe cible endocrinien étendu, car de nombreuses hormones régulent la dynamique osseuse à des degrés divers, notamment la parathormone (PTH), la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-OH₂D), la calcitonine, les hormones thyroïdiennes, les stéroïdes sexuels, les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance et le facteur de croissance I analogue à l'insuline (*Winter et al., 2020*).

La seule source de calcium provient de l'alimentation qui doit être fournie quotidiennement pour supprimer la résorption osseuse et remplacer les pertes obligatoires. L'insuffisance calcique (une hypocalcémie) se manifeste par une diminution de la masse osseuse et une fracture ostéoporotique (*Weaver et Peacock, 2019*). Par contre, une hypercalcémie non contrôlée peut provoquer une insuffisance rénale, ainsi que des maladies osseuses graves et des lésions cardiaques (*Lumachi, 2012*).

Vue l'importance de la calcémie dans la physiologie humaine, il est nécessaire qu'il soit dosé avec la plus grande précision possible afin de fournir au médecin des résultats fiables et ainsi lui donner une bonne orientation dans son diagnostic (*Omoro, 2018*).

La mesure quantitative du calcium total dans le sérum a commencé, comme pour de nombreuses procédures analytiques, par la gravimétrie. La première mesure du calcium par des méthodes physiques au cours des années 1860, et ont été appliquées 70 ans plus tard (*MacIntyre, 1961a*). En 1921, une autre méthode pour mesurer le calcium a été utilisée, il s'agissait de l'oxydoréduction (*Kramer et Tisdall, 1921*). Dans les années 1940-1950, grâce au développement des indicateurs métallo-chromiques, une nouvelle méthode qui est la complexométrie a été introduite (*Robertson et al., 1979b*). Plus tard, en 1964 le calcium a été mesuré par une autre méthode qui est la colorimétrie (*Willis, 2006*).

Le dosage du calcium se fait dans des laboratoires par plusieurs méthodes dont les plus utilisées sont les méthodes colorimétriques (Arsénazo III et Orthocréplptaleine Complexon (o-CPC) (*Omoro, 2018*).

La détermination quantitative du calcium sanguin par différentes méthodes nécessite une vérification et une validation, afin de simplifier et d'optimiser le travail d'évaluation, de standardiser la présentation des données et de permettre un jugement comparatif des résultats obtenus par différents évaluateurs ou laboratoires (*Vassault, et al., 2010*).

La vérification et la validation des méthodes exige les référentiels de qualité par des normes qui sont : « la norme ISO NF 9001 Version 2008 », « la norme ISO NF 15189 » et « la norme ISO NF 22870 », qui est beaucoup plus spécifique comme son nom l'indique : « *Laboratoires d'analyses de biologie médicale. Exigences particulières concernant la Qualité et la Compétence* » (*Yaya, 2015*).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de vérifications des méthodes de quantification quantitative du calcium dans le sang. La méthodologie de travail suivie est basée sur l'application de quelques modules de vérification sur deux méthodes de dosage du calcium sérique réalisées par deux systèmes analytiques différents Roche COBAS INTEGRA 400 W/ O ISE et Biosystème A15.

Notre mémoire est structurée en 2 parties. La première est divisée en 3 chapitres portant sur quelques notions de base sur le calcium et la calcémie, suivi des méthodes de dosage de ce dernier, nous terminons cette partie par les différents modules de vérification et validation des méthodes d'analyse.

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus, leur interprétation et leur discussion, cette partie est achevée par une conclusion.

Volet théorique

I. Calcium et calcémie : Notions générales

1. Définition et structure du calcium

Le nom de calcium est dérivé du mot latin « *calas* » qui signifie chaud. Il était connu dès les premiers siècles (*Pravina et al., 2013*).

Le calcium, ayant le symbole de Ca, est un élément chimique de nombre atomique 20 (Tableau 1). C'est un métal alcalino-terreux blanc cassé et assez dur qui n'existe jamais sous forme pure dans la nature. C'est le cinquième élément le plus abondant de la croûte terrestre (plus de 3%) et c'est un élément essentiel de la matière organique (*Omoro, 2018*). Il est présent dans de nombreux composés, le plus important étant le carbonate de calcium (CaCO₃) (*Budesínský, 1969*).

Le groupe IIA du tableau périodique (Figure 1) contient les métaux alcalino-terreux tels que Ca, Sr, Ba et Ra. Toutes les substances non métalliques sont insolubles dans l'eau (*Pravina et al., 2013*).

Le tableau périodique des éléments chimiques est présenté ci-dessous. Le calcium (Ca) est situé dans le groupe IIA, la deuxième colonne à gauche du tableau principal, à la quatrième ligne. Les autres éléments du groupe IIA sont le strontium (Sr), le baryum (Ba) et le radium (Ra). Les éléments du groupe IIA sont colorés en rose dans l'image.

1 H																	2 He
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
		* lanthanides	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
		** actinides	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Figure 1 : Localisation du calcium dans le tableau périodique (*Weiss, 2006*).

Le calcium a 24 isotopes connus avec des nombres de masse allant de 34 à 57, mais aucun isomère nucléaire connu. Cinq de ces isotopes sont stables, ⁴⁰Ca, ⁴²Ca, ⁴³Ca, ⁴⁴Ca et ⁴⁶Ca, mais ⁴⁰Ca et ⁴⁶Ca sont soupçonnés d'être des radio-isotopes à durée de vie extrêmement longue, mais aucune désintégration n'a été observée. Le ⁴⁸Ca est un radio-isotope avec une demi-vie si longue (43 × 10¹⁸ ans, soit près de 3 milliards de fois l'âge de l'univers) qu'il est considéré comme stable dans les applications pratiques. Le ⁴⁰Ca représente 97% du calcium naturel (*Bishop et al., 2005*).

Tableau 1 : Propriétés atomiques et physiques du calcium (Perrone et Monteiro, 2015).

Numéro atomique	20
Masse atomique	40.078(4) Da [Ar]
Configuration électronique	[Ar] 4s ²
Rayon atomique	197 pm
Rayon covalent	231 pm
Rayon de Van der Waals	176 ± 22 h
États d'oxydation	+2, +1, 0
Potentiel d'ionisation	1er : 589,8 kJ mol ⁻¹ 2ème : 1145,4 kJ mol ⁻¹ 3ème : 4912,4 kJ mol ⁻¹
Affinité électronique	- 0,02455 eV
Électronégativité	1.00
Point d'ébullition	1757 K, 1484 °C
Point de fusion	1115 842 °C

2. Localisation et rôles du calcium

2.1. Localisation

Un adulte en bonne santé contient environ 1 à 1,3 kg de calcium, et 99 % du calcium se trouve sous forme d'hydroxyapatite de calcium $\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ dans les os. Le 1 % de calcium restant se trouve dans les tissus mous et le liquide extracellulaire (*Klemm et Klein, 2011 ; Goldstein, 1990*).

Le squelette est un réservoir majeur de calcium pour les pools extracellulaires et intracellulaires.

Dans le plasma, environ 50 % du calcium est libre ou ionisé, 40 % est lié aux protéines plasmatiques et 10 % est complexé à des anions tels que le bicarbonate, le phosphate, le lactate et le citrate.

L'albumine est la protéine prédominante dans la fixation du calcium, 1 g/dL d'albumine fixant environ 0,8 mg/dl de calcium. La fixation du calcium par l'albumine dépend du pH. À un pH plus faible, l'albumine a moins de sites de liaison pour le calcium, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de calcium libre. Lorsque le pH est plus élevé, la concentration de calcium libre est plus faible. L'apport et l'absorption alimentaires sont essentiels pour fournir suffisamment de calcium afin de maintenir des réserves corporelles saines (*Song, 2017a*). Il a été démontré que l'absorption moyenne de calcium (absorption fractionnelle de calcium) chez les hommes et les femmes non enceintes dans une large tranche d'âge est d'environ 25% de l'apport en calcium. La perte urinaire moyenne est de 22% et la perte fécale de 75% du calcium absorbé, avec des pertes mineures par la sueur, la peau, les cheveux, etc (*Hunt et Johnson, 2007*).

2.2. Rôle du calcium

Le calcium joue un rôle structural au niveau du squelette et des dents. Grâce à sa solidification (formation de cristaux), il assure la résistance mécanique de ces tissus. Il joue aussi un rôle majeur au niveau neuromusculaire. Il est essentiel à la contraction musculaire, à l'activation des ovocytes, à la formation d'os et de dents solides, à la coagulation du sang, à l'influx nerveux, à la transmission, à la régulation du rythme cardiaque et à l'équilibre des fluides dans les cellules. Le calcium participe notamment au processus d'activation de la prothrombine en thrombine. Il stimule au niveau intracellulaire l'activité

sécrétoire des cellules glandulaires, notamment en activant le mécanisme d'exocytose, le calcium joue aussi un rôle d'activateur enzymatique.

Il participe à la formation du potentiel d'action *via* des canaux calciques au niveau du tissu musculaire cardiaque et lisse. Il permet le contrôle de la contraction musculaire : en sortant du réticulum sarcoplasmique le calcium se fixe sur les myofilaments minces (précisément sur la troponine) et amorce le mécanisme de la contraction de la cellule musculaire striée. Sa réintégration dans le réticulum sarcoplasmique, grâce à une pompe calcique, provoque l'arrêt de la contraction musculaire (*Pravina et al., 2013*).

3. Sources du calcium

Selon le ministère britannique de la santé, l'apport nutritionnel de référence recommandé pour le Ca est fonction de l'âge. Les nourrissons et les enfants ont besoin de 350 - 550 mg/jour ; Adolescents et garçons : 800 - 1000 mg/jour ; Hommes et femmes adultes : 700 mg/jour (*Pravina et al., 2013*).

Il est bien connu qu'une nutrition adéquate dépend d'un équilibre entre la quantité de nutriment absorbée par l'organisme à partir des aliments et la quantité de nutriment perdue par l'organisme (*Titchenal et Dobbs, 2007*).

Comme la biodisponibilité du Ca varie considérablement d'un aliment à l'autre, les informations nutritionnelles indiquant la quantité totale de Ca sont trompeuses (*Yang et al., 2012*). Pour qu'un aliment soit une bonne source de Ca, deux critères doivent être remplis : une portion standard doit contenir au moins 30 mg de Ca absorbable et moins de 418 kJ (100 kcal) de l'aliment doit fournir 30 mg de Ca absorbable (*Fleming et Heimbach, 1994*).

Les aliments contenant du calcium sont divisés en :

- **Bonnes sources de calcium** (les deux critères sont remplis) : Yaourt, lait, lait de soja, Fromage mozzarella et Cheddar, jus d'orange enrichi en calcium, tofu, feuilles de chou-fleur, feuilles de moutarde chinoise, feuilles de navet, chou chinois, sardines en conserve dans l'huile, saumon en conserve

- **Sources de calcium potentielles** (un seul critère est rempli) : crème glacée, Rutabaga (type de navet), chou-frisé, brocoli, chou de Bruxelles, chou-fleur, épinards

- **Mauvaises sources de calcium** (aliments qui ne répondent à aucun des deux critères d'une bonne source de calcium) : fromage blanc, haricots blancs et rouges cuits,

soja cuit, amandes grillées à sec, graines de sésame non décortiquées (*Titchenal et Dobbs, 2007*).

4. Stockage et transport du calcium

4.1. Stockage du calcium

Compte tenu du rôle vital joué par les ions calcium dans une grande variété de processus cellulaires, la capacité de stocker le calcium dans les organelles membranaires intracellulaires doit être considérée comme l'un des développements majeurs de l'évolution cellulaire. Avec l'évolution des systèmes de stockage intracellulaire, l'excès de calcium cytoplasmique a pu être absorbé par les systèmes de stockage, ce qui a permis de protéger les cellules contre les variations excessives du calcium cellulaire. Parallèlement à ce pouvoir tampon accru, les cellules ont acquis la capacité d'utiliser des niveaux accrus de calcium intracellulaire comme mécanisme général de signalisation (*Koch, 1990*).

4.1.1. Stockage du calcium par le réticulum sarcoplasmique

Le réticulum sarcoplasmique (RS) a été largement utilisé comme modèle de stockage du calcium dans les systèmes non musculaires, car il est généralement considéré comme le prototype de l'organe de stockage du calcium (*Carafoli, 1987 ; MacLennan et Holland, 1975*). La capacité de pomper le calcium du myoplasme vers l'espace luminal est réalisée par la présence de concentrations élevées de calcium ATPase. En plus, il y a la présence d'une concentration élevée de calséquestrine, une protéine majeure de liaison au calcium de faible affinité et de grande capacité dans la lumière qui permet l'accumulation de concentrations élevées de calcium dans le RS. En outre, le RS contient une autre protéine de liaison au calcium (HACBP/calréticuline) qui exprime à la fois des sites de liaison au calcium de haute et de basse affinité. Bien que la calséquestrine et la calréticuline soient solubles lorsqu'elles sont isolées, elles semblent faire partie d'une matrice insoluble dans la lumière du RE (*Meissner, 1975*). Cette matrice peut être importante pour localiser la capacité de stockage du calcium dans des parties spécifiques du RS (*Jorgensen et al., 1985*).

Cependant, il faut également considérer que la séquestration du calcium dans la matrice est importante pour la performance de l'organe dans la signalisation du calcium (*Anthony Lai et al., 1988*).

4.1.2. Stockage du calcium par le réticulum endoplasmique

L'idée que le réticulum endoplasmique (RE) remplit une fonction de stockage du calcium repose sur un certain nombre d'observations expérimentales, notamment l'accumulation de calcium dans le RE de cellules vivantes et de microsomes isolés, ainsi que la mesure directe des distributions cellulaires par analyse à la microsonde électronique (*Somlyo, 1984*).

Il est maintenant bien établi que la calréticuline est une protéine liant fortement le Ca^{2+} de même qu'un important réservoir de Ca^{2+} dans la lumière des membranes du RE de plusieurs tissus, sauf les muscles squelettiques et le muscle cardiaque (*Opas et Michalak, 1992*).

4.2. Système de transport du calcium

La complexité d'un tel système semble être due à l'affinité de plusieurs sites cellulaires pour le calcium (*Godfraind-De Becker et Godfraind, 1980*).

4.2.1. Canaux de Ca^{2+}

Plusieurs canaux Ca^{2+} de la membrane plasmique ont été identifiés et, au cours des dernières années, l'attention s'est portée sur l'identification de leur fonction distincte. Les canaux ont été divisés en trois groupes principaux : les canaux voltage-dépendants (VOC), les canaux opérés par les récepteurs (ROC) et les canaux d'entrée du Ca^{2+} opérés par le stockage (SOCE) (Figure 2) (*Brini et al., 2013*).

4.2.2. Pompes à Ca^{2+}

Les cellules animales expriment trois Ca^{2+} ATPases (pompes) dans le PM (PMCA), dans l'ER/SR (SERCA), et dans les membranes de Golgi (SPCA). Elles abaissent la concentration de Ca^{2+} cytosolique en l'exportant vers le milieu extérieur, ou vers l'espace interne des vésicules du réticulum et du système de Golgi. Les trois pompes, appartiennent à la superfamille des ATPases de type P (*Pedersen et Carafoli, 1987*), qui conservent temporairement l'énergie libérée par la scission de l'ATP sous forme d'un phosphate d'aspartyle dans leur centre réactionnel (*Brini et al., 2013*).

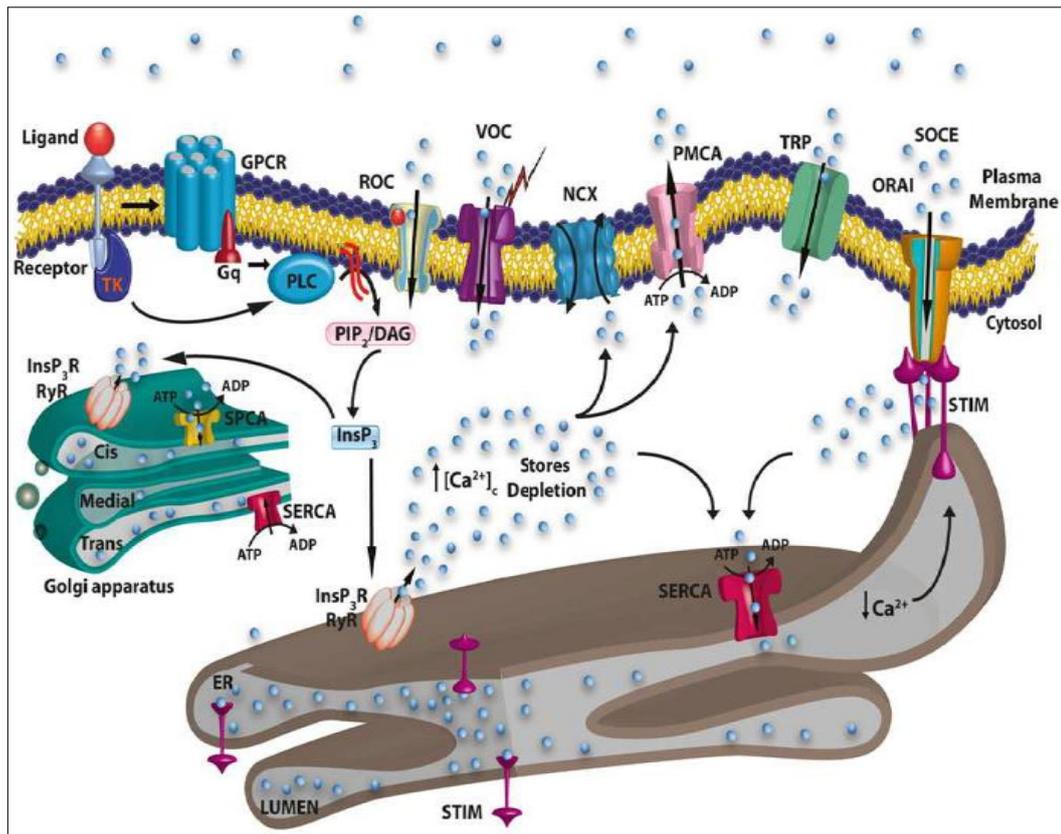


Figure 2: Représentation schématique des différentes protéines de transport du Ca^{2+} de la membrane plasmique et des principales réserves intracellulaires (Brini et al., 2013).

TK, récepteur couplé à la tyrosine kinase ; RCPG, récepteur couplé à la protéine G ; PLC, phospholipase C, PIP_2 , phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate, DAG, diacylglycérol

4.2.3. Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique

La membrane plasmique de la plupart des cellules animales contient un système ayant une affinité pour le Ca^{2+} inférieure à celle de la pompe PMCA, qui éjecte le Ca^{2+} en échange avec le Na^+ (NCX). Ce système appartient à la superfamille SLC8 (*solute carrier family 8*) des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Brini et al., 2013). Le NCX a une capacité de transport beaucoup plus grande que le PMCA, transportant des milliers d'ions Ca^{2+} par seconde (Carafoli et al., 2001), une propriété qui, couplée à sa faible affinité en Ca^{2+} , lui permet de ramener la concentration de Ca^{2+} cytosolique à son niveau normal de repos après de fortes augmentations physiologiques (Brini et al., 2013).

5. Mécanismes de l'homéostasie du calcium

5.1. Métabolisme de calcium sanguin

Le métabolisme du calcium implique les os, les reins et l'intestin, et dépend principalement de l'activité de l'hormone parathyroïdienne (PTH), de la vitamine D3 1,25(OH)₂ [1,25(OH)₂D₃] et de la calcitonine, par le biais d'interactions mutuelles sur les organes cibles (Figure 3).

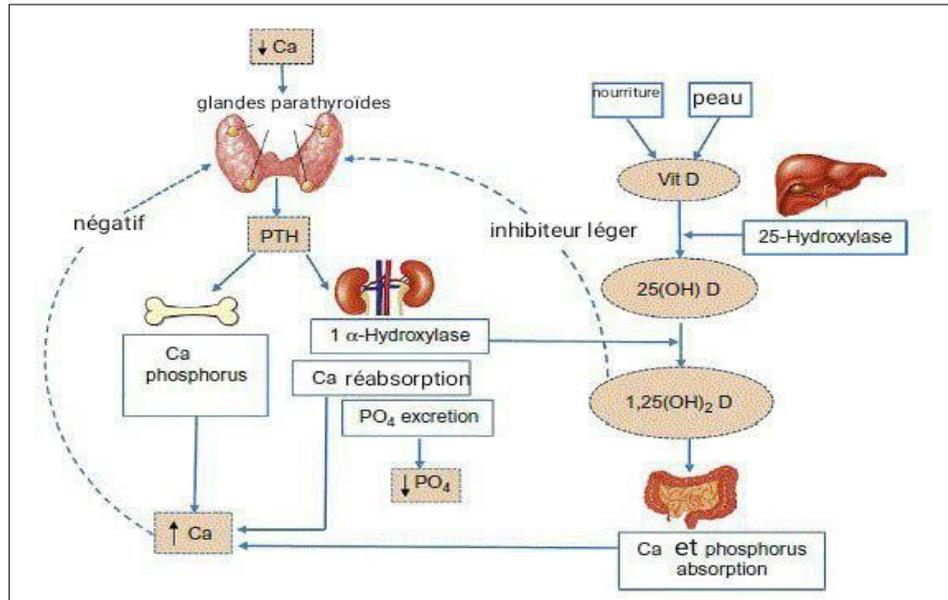


Figure 3: Métabolisme du calcium dans l'organisme (Song, 2017a).

La liaison de la 1,25(OH)₂D₃ à son récepteur entraîne l'activation de seconds messagers, notamment les récepteurs couplés aux protéines G, la phospholipase C et la phosphatidylinositol-3-kinase (Norman, 2008). Les récepteurs sensibles au calcium (CASR) sont les principaux médiateurs des actions du Ca²⁺ sur les glandes parathyroïdes et les reins, régulant les réponses homéostatiques qui rétablissent les niveaux normaux de Ca²⁺ (Sharan et al., 2008).

Cependant, il faut tenir compte de la fonction d'autres acteurs, tels que le facteur de croissance des fibroblastes-23 (FGF23), Klotho et le canal cationique à potentiel de réception transitoire, sous-famille V (TRPV), qui sont essentiels au maintien de l'homéostasie calcium-phosphate et à la régulation du métabolisme calcique (Medici et al., 2008).

Le FGF23 est impliqué dans le mécanisme moléculaire de la réabsorption rénale du phosphate, augmente l'excrétion urinaire du phosphore et inhibe à la fois le transport tubulaire rénal du phosphate et la production rénale de 1,25(OH)2D3, diminuant ainsi les taux sériques de PTH et sa sécrétion (*Fukagawa et Kazama, 2005*).

Klotho est une protéine transmembranaire qui régule le transport transépithélial du Ca^{2+} , la sécrétion de PTH et l'augmentation subséquente du Ca^{2+} sérique, la transduction du signal du FGF23 et la régulation négative de la production de 1,25(OH)2D3 (*Nabeshima et Imura, 2008*).

L'entrée apicale de Ca^{2+} via les canaux calciques TRPV, induite par la 1,25(OH)2D3, représente la première étape des mécanismes de transport de Ca^{2+} des épithéliums intestinal et rénal (*Suzuki et al., 2008*). D'autres facteurs externes, tels que l'alimentation, les médicaments et l'activité physique, peuvent interférer, dans une moindre mesure, avec le métabolisme du calcium.

5.2. Régulation du calcium

Le calcium libre est la forme biologique active, sa concentration dans le plasma est étroitement régulée par l'action concertée de la réabsorption du calcium dans les reins, de l'échange osseux et de l'absorption dans l'intestin. Toutes ces fonctions sont sous le contrôle de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et de la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)2D) (*Song, 2017a*).

5.2.1. Régulation par l'hormone parathyroïdienne

L'hormone parathyroïdienne biologiquement active (PTH 1-84) est dérivée d'un polypeptide de 115 acides aminés appelé pré-pro-PTH dans les cellules parathyroïdiennes.

Le calcium régule non seulement la libération, mais aussi la synthèse et la dégradation de la PTH (Figure 4) (*D'Amour et al., 2006*). Lorsque le Récepteur de détection du calcium (CaSR) est activé par un taux élevé de calcium plasmatique, plus de molécules de PTH sont dégradées, ce qui entraîne la sécrétion de fragments carboxyles-terminaux de la PTH (<PTH-C), pour la plupart biologiquement inactifs (*D'Amour et al., 2006 ; Buckley et Russell, 1988*). Lorsque le CaSR est inactivé par un faible taux de calcium plasmatique, la dégradation intracellulaire de la PTH diminue, ce qui entraîne la sécrétion de la PTH 1-84 biologiquement active (*Murray et al., 2005 ; Habener et al., 1977*).

La PTH peut être sécrétée par exocytose dans les secondes qui suivent l'induction d'un état hypocalcémique. Une fois sécrétée, la PTH est rapidement éliminée du plasma par absorption, principalement par le foie et les reins, où la PTH 1-84 est clivée en fragments amino- et carboxyle-terminaux qui sont ensuite éliminés par le rein. La PTH 1-84 intacte a une demi-vie plasmatique de 2 à 4 minutes

Un fragment de PTH long, amino-terminal tronqué (7-84) peut agir pour diminuer la concentration de calcium, réduire l'excrétion de phosphate urinaire et inhiber la résorption osseuse par le biais d'un récepteur différent. Il exerce des effets qui sont opposés à ceux de la PTH 1-84 et contribue à la résistance à la PTH souvent observée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale et de patients urémiques. Les fragments C-terminaux sont éliminés principalement par le rein avec des demi-vies 5 à 10 fois supérieures à celles de la PTH intacte (*Carnevale et al., 2004 ; Divieti et al., 2002*).

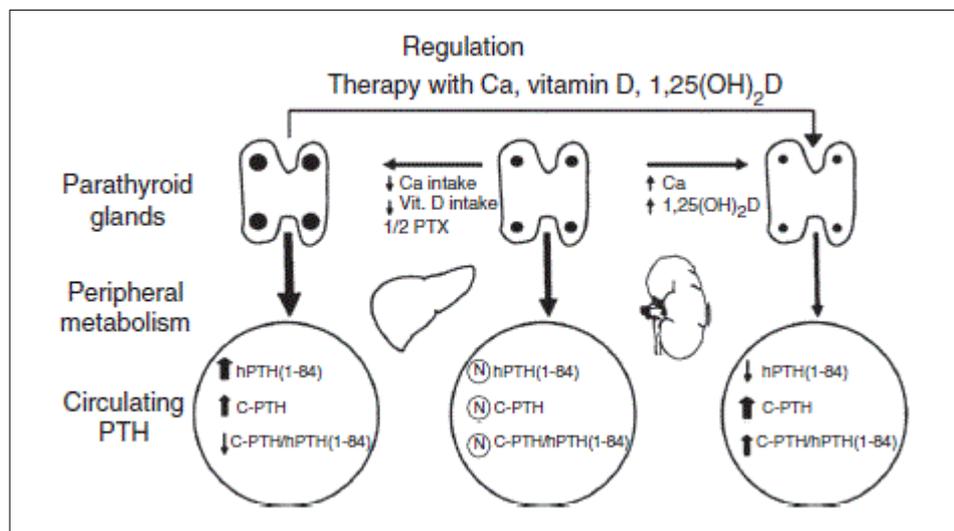


Figure 4: Régulation de la sécrétion et du métabolisme de l'hormone parathyroïdienne métabolisme (*Moe, 2016*).

5.2.2. Vitamine D

La vitamine D et ses métabolites sont des vitamines liposolubles et peuvent être considérés comme des hormones et des pro-hormones en raison de leur rôle régulateur dans l'homéostasie du calcium et le métabolisme osseux. Il existe deux formes principales de vitamine D : la vitamine D₂ (ergocalciférol) et la vitamine D₃ (cholécalférol) (Figure 5) (*Risteli et al., 2012*).

La vitamine D est convertie par l'intervention des enzymatique dans le foie en 25(OH)D, la principale forme circulante de la vitamine D, puis par la 1 α -hydroxylase dans les reins en 1,25 (OH)₂D, la forme biologiquement active de la vitamine D (*Song, 2017a*).

L'action principale de la 1,25(OH)₂D est de favoriser l'absorption intestinale du calcium en stimulant la formation de protéines liant le calcium au sein des cellules épithéliales intestinales. À des concentrations élevées, la 1,25(OH)₂D augmente la résorption osseuse en incitant les cellules souches monocytaires de la moelle osseuse à se différencier en ostéoclastes et en stimulant les ostéoblastes à produire des cytokines et d'autres facteurs qui influencent l'activité des ostéoclastes (*Risteli et al., 2012*).

Par rapport à la PTH, la vitamine D exerce un effet régulateur beaucoup plus lent sur l'équilibre du calcium. Une action déficiente de la vitamine D peut résulter d'un apport alimentaire insuffisant en vitamine D, d'une malabsorption, d'une altération de la 25-hydroxylation de la vitamine D, d'une altération de la 1 α -hydroxylation de la 25(OH)D et d'une résistance des organes cibles à la 1,25(OH)₂D (*Risteli et al., 2012*).

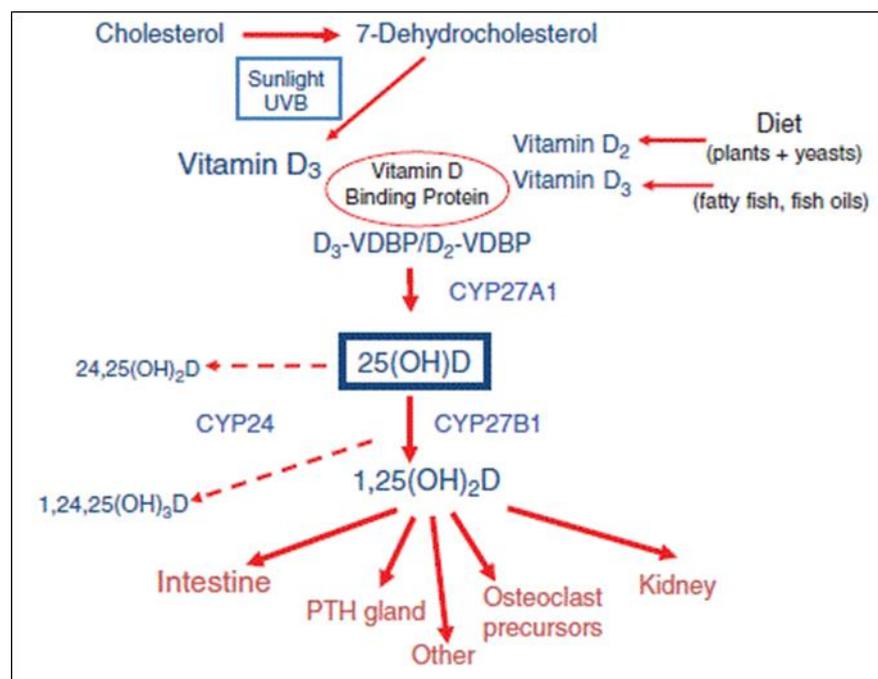


Figure 5: Métabolisme de la vitamine D (*Moe, 2016*).

5.2.3. Calcitonine

Les calcitonines sont un groupe de peptides hypocalcémiques dérivés des cellules de la crête neurale qui ont migré vers la dernière poche branchiale au cours de l'embryogenèse précoce (*Harold Copp, 1972*). Chez les mammifères, les cellules sécrétant de la calcitonine se trouvent dans les glandes parathyroïdes, le thymus et la thyroïde, où elles sont identifiées comme des cellules parafolliculaires ou "C". Il s'agit de grandes cellules à noyau clair et vésiculaire, situées à la fois en position parafolliculaire et intra folliculaire ; les séquences d'acides aminés ont été déterminées et synthétisées. Chaque calcitonine contient 32 acides aminés ; la structure entière est nécessaire à l'activité biologique.

Le principal effet biologique de la calcitonine est d'abaisser les concentrations de calcium total, lié aux protéines et ionisé dans le sérum par l'inhibition de la résorption osseuse induite par la PTH et la vitamine D1 (*Root et Harrison, 1976*).

6. Valeur de référence de la calcémie

La calcémie consiste à mesurer le taux de calcium dans le plasma sanguin à partir d'une prise de sang. Le calcium total dans le sérum est un indicateur fiable du calcium ionisé et ainsi du calcium métaboliquement actif. La détermination du calcium ionisé est réservée à des situations exceptionnelles (*Bove-Fenderson et Mannstadt, 2018*).

La quantité de calcium biologiquement actif varie en fonction du taux d'albumine sérique, une protéine à laquelle le calcium est lié. Par conséquent, les taux de calcium ionisé sont de meilleures mesures que le calcium total ; toutefois, on peut corriger le calcium total si le taux d'albumine est connu (Figure 6).

De nombreuses études ont contribué à la définition de la valeur normale supérieure. Elle varie d'un auteur à l'autre entre 2,51 (*Katayev et al., 2010*) et 2,6 mmol/L (*Cusano et al., 2013*). La valeur normale inférieure varie d'un auteur à l'autre entre 2,05 et 2,15 mmol/L (*Burckhardt, 2021*).

- Un calcium ionisé normal est de 1,12 -1,45 mmol/L (4,54-5,61 mg/dL)
- Un calcium total normal est de 2,05-2,6 mmol/L (9-10,5 mg/dL).
- Un taux de calcium total inférieur à 8,0 mg/dL est une hypocalcémie, les taux inférieurs à 1,59 mmol/L (6 mg/dL) étant généralement mortels.

- Un taux de calcium total supérieur à 10,6 mg/dl est une hypercalcémie, les taux supérieurs à 3,753 mmol/l (15,12 mg/dl) étant généralement mortels (*Pravina et al., 2013*).

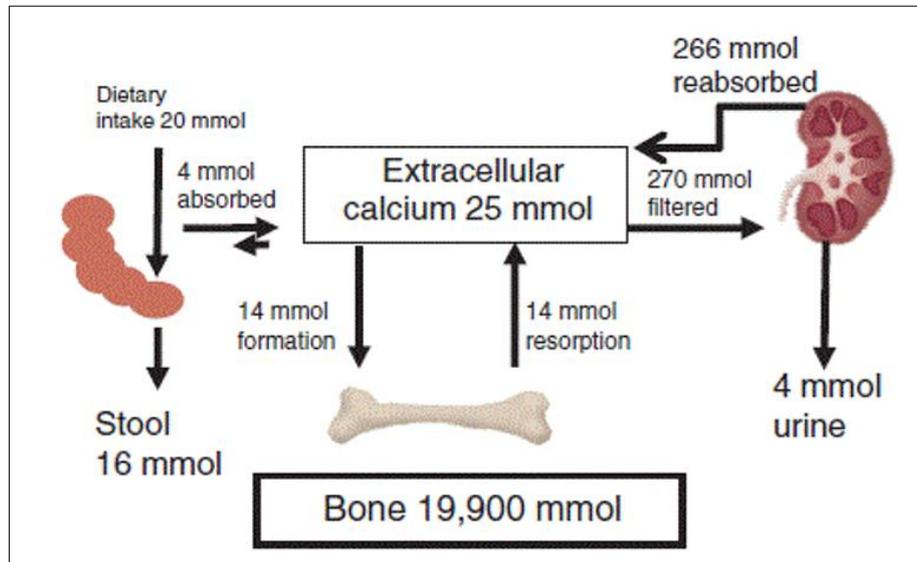


Figure 6: Équilibre normal du calcium dans le sang (*Moe, 2016*).

6.1. Hypocalcémie

Les symptômes et les signes cliniques prédominants de l'hypocalcémie sont ceux d'une irritabilité neuromusculaire, paresthésie péri-buccale, fourmillement des doigts et des orteils, et tétanie spontanée et latente. En cas d'hypocalcémie profonde ou lors de chutes aiguës du taux de calcium sérique, des crises de grand mal ou des laryngospasmes peuvent également être observés. L'hypocalcémie chronique est associée à des symptômes plus légers d'irritabilité neuromusculaire et peut même être asymptomatique (*Winter et al., 2020*).

Les causes courantes de l'hypocalcémie sont une diminution de l'activité de la PTH, une action déficiente de la vitamine D et une carence extrême en calcium alimentaire. Les autres causes d'hypocalcémie sont l'insuffisance rénale chronique, le dépôt excessif de calcium dans le squelette (*Winter et al., 2020*).

Tests de laboratoire dans le cadre d'une hypocalcémie

Lorsque les concentrations de calcium sont faibles, il faut tester l'albumine ou le calcium libre afin d'exclure la cause de l'hypocalcémie, afin d'exclure qu'une faible quantité d'albumine soit la cause de l'hypocalcémie. La créatinine et l'urée doivent être testées pour évaluer les fonctions rénales. Le phosphate et la PTH doivent être mesurés.

L'hypomagnésémie chronique diminue la libération de PTH et la réponse à la PTH, donc les niveaux de magnésium doivent être testés. Si la PTH est faible face à une hypocalcémie et une hyperphosphatémie, on diagnostique un hypoparathyroïdisme.

Une carence en vitamine D peut être diagnostiquée lorsque la 25(OH)D est faible et que le phosphate est diminué en cas d'hypocalcémie (*Song, 2017a*).

6.2. Hypercalcémie

Une légère hypercalcémie peut être asymptomatique chez la plupart des patients et ne peut être détectée qu'à la suite d'une analyse chimique de routine incluant le calcium total. Les symptômes et les plaintes associés à l'hypercalcémie ne sont pas spécifiques. Notamment la fatigue, les malaises, la faiblesse, la dépression, l'apathie et l'incapacité à se concentrer (*Song, 2017a*).

L'hypercalcémie peut induire un léger diabète insipide néphrogénique avec soif, polydipsie et polyurie. Une réduction significative de la clairance de la créatinine ou une altération de la capacité de concentration ou d'acidification peut être observée chez un tiers des personnes présentant une hypercalcémie asymptomatique (*Mitlak et al., 2009*).

Les causes de l'hypercalcémie sont l'hyperparathyroïdie primaire, les tumeurs malignes, le surdosage en vitamine D, les maladies granulomateuses et l'insuffisance rénale. L'hyperparathyroïdie primaire est la cause la plus fréquente chez les patients ambulatoires, tandis que les tumeurs malignes sont plus fréquentes chez les patients hospitalisés (*Song, 2017b*).

7. Facteurs modifiant la calcémie

7.1. Facteurs endogènes

7.1.1. Microbiote

Il existe des preuves que le microbiome et ses métabolites peuvent améliorer la structure osseuse et réduire le renouvellement des os en augmentant la biodisponibilité du calcium (**D'Amelio et Sassi, 2018**).

En effet, les deux types de bactéries prédominants dans l'intestin humain sont les Firmicutes et les Bacteroidetes. Une réduction du rapport Firmicutes/Bacteroidetes entraîne une augmentation de la concentration d'ions calcium dans le sang et une amélioration de la microstructure osseuse (**Xie et al., 2020**).

Par ailleurs, les acides gras à chaîne courte (AGCC), tels que le butyrate, l'acétate et le propionate, sont formés à la suite de la fermentation microbienne des fibres (**Chambers et al., 2018**). Les acides gras à chaîne courte affectent aussi directement l'absorption du calcium et augmentent son transport en modulant la voie de signalisation (**D'Amelio et Sassi, 2018**).

7.1.2. Sérotonine

La sérotonine est un neurotransmetteur qui régule presque toutes les fonctions cérébrales. Des études récentes ont montré que la sérotonine peut réduire la formation osseuse. Une étude *in vitro* des cellules ostéoblastiques a montré que la sérotonine activait le récepteur de la 5-hydroxytryptamine 6 (un récepteur de sérotonine couplé à la protéine G), ce qui entraînait une réduction des niveaux de phosphatase alcaline et inhibait la minéralisation osseuse. En revanche, l'inhibition de ce processus chez les rats ovariectomisés a entraîné une augmentation significative de la masse osseuse (**Yun et al., 2016**).

D'une part, l'augmentation de la production de sérotonine par le microbiome intestinal peut provoquer des troubles de la formation osseuse; d'autre part, le précurseur de la sérotonine par voie intraveineuse réduit l'hypocalcémie (**Hernández-Castellano et al., 2017**).

7.2. Facteurs exogènes

7.2.1. Régimes alimentaires

La biodisponibilité du calcium est affectée par différents facteurs apportés par l'alimentation. Les macronutriments et les micronutriments peuvent améliorer ou perturber l'absorption du calcium. L'absorption du calcium est affectée par les ingrédients alimentaires individuels et également par les régimes spécifiques consommés par les personnes ayant des besoins particuliers, comme les patients souffrant d'hypertension et les athlètes (*Xu et al., 2019 ; Maurya et Aggarwal, 2017a*).

7.2.2. Graisses

Les graisses ont un impact sur la biodisponibilité de la vitamine D liposoluble, qui est nécessaire à l'absorption du calcium (*Maurya et Aggarwal, 2017b*). Les graisses contribuent également à l'absorption directe du calcium, et l'effet dépend du type d'acides gras qu'elles forment. Le régime alimentaire recommandé est donc un régime riche en acides gras monoinsaturés, car il a l'effet le plus bénéfique sur la santé des os et une augmentation modérée de l'absorption intestinale du calcium (*Wang et al., 2016*).

7.2.3. Produits laitiers

Les produits laitiers sont la principale source alimentaire de lactose et de calcium (*Ali Naqvi et al., 2016*). Bien que le lactose seul n'affecte pas l'absorption du calcium, une alimentation pauvre en produits laitiers est un indicateur de carence en calcium et, par conséquent, affecte négativement le métabolisme osseux (*Hodges et al., 2019*).

7.2.4. Fibres

Les fibres réduisent le pH des selles et diminuent l'activité de la β -glucosidase dans le gros intestin. En acidifiant le milieu intestinal, l'absorption du calcium peut être augmentée en limitant la formation de phosphates (*Albarracín et al., 2016*).

7.2.5. Peptides liant le calcium

Une étude expérimentale sur des rats a déterminé que les peptides de liaison au calcium provenant d'os de morue du Pacifique se combinent au calcium pour augmenter

l'absorption et la perméabilité du calcium dans l'intestin, améliorant ainsi les propriétés biomécaniques, la structure et la densité minérale des os, tout en réduisant la concentration des marqueurs du renouvellement osseux dans le sang (*Zhang et al., 2018*).

7.2.6. Caséine

Lors de la digestion de la caséine (protéine du lait), des phosphopeptides de caséine sont libérés. Ils peuvent transporter les ions calcium et augmenter leur biodisponibilité. Dans des études *in vitro et in vivo*, les chercheurs ont confirmé que les phosphopeptides de caséine empêchent la précipitation du calcium dans l'intestin, de sorte que son absorption est très efficace (*Sun et al., 2018*).

7.2.7. Eléments minéraux

- *Phosphore*

Le rapport entre le calcium et le phosphore dans l'alimentation doit être compris entre 1,3:1 et 2:1. Un régime pauvre en phosphore, même s'il est accompagné de quantités appropriées de calcium, entraîne une diminution de la digestibilité apparente et de l'excrétion rénale du phosphore, tandis que l'excrétion de calcium augmente de manière significative, ce qui peut indiquer que l'organisme est incapable d'utiliser ce minéral (*Kiefer-Hecker et al., 2018*).

- *Fer*

L'administration de fer par voie intraveineuse chez des personnes présentant une carence importante en ce minéral favorise une augmentation du taux de FGF-23, ce qui entraîne une diminution de l'absorption intestinale du calcium. Aucun effet de ce type n'a été observé chez les patients qui utilisaient un supplément de fer oral (*Fukao et al., 2018*).

- *Magnésium*

Le magnésium contribue à augmenter l'absorption du calcium en modifiant la synthèse de la vitamine D dans l'organisme. Les 3 principales enzymes (24-hydroxylase et 1 α -hydroxylase dans les reins et 25-hydroxylase dans le foie) qui convertissent la vitamine D en sa forme active sont dépendantes du magnésium. Une carence en magnésium entraîne

une diminution du taux de calcidiol et une détérioration du fonctionnement de la PTH, ce qui a un effet négatif sur le métabolisme du calcium. Un apport adéquat en magnésium est associé à un faible risque d'ostéoporose (*Uwitonze et Razzaque, 2018*).

7.2.8. Caféine

Il existe des preuves qu'une consommation modérée de caféine est bonne pour la santé et réduit le risque d'ostéoporose. On a observé que la consommation de caféine réduit l'activité de la phosphatase acide et alcaline dans le sérum, ce qui indique un ralentissement du métabolisme osseux et donc une réduction du risque d'ostéoporose (*Xu et al., 2019*).

II. Méthodes de dosages du calcium sanguin

1. Historique

Historiquement, la mesure quantitative du calcium total dans le sérum a commencé, comme pour de nombreuses procédures analytiques, par la gravimétrie (*Robertson et al., 1979a*).

En 1860, Herschel et Talbot ont découvert une méthode pour mesurer le calcium qui est l'émission atomique de flamme. En 1861, Janssen a suggéré que l'analyse spectrale, jusqu'alors utilisée uniquement pour des observations qualitatives. Cette méthode a été appliquée 70 ans plus tard (*MacIntyre, 1961a*).

En 1921 Kramer et Tisdall ont utilisé une autre méthode pour mesurer le calcium qui est l'oxydo-réduction (*Kramer et Tisdall, 1921*). Cette méthode a été modifiée ultérieurement par Clark et Collip en 1925 qui ont souligné l'importance de maintenir la température de la solution d'oxalate pendant le titrage dans une fourchette de 70 à 75°C et qui ont également introduit quelques modifications dans la procédure de lavage et d'égouttage après l'étape de précipitation. La méthode de Clark et Collip a été utilisée pendant de nombreuses années comme procédure de routine recommandée pour mesurer le calcium sérique (*Clark et Collip, 1925*).

Les méthodes complexométriques ont vu le jour grâce au développement des indicateurs métallochromiques dans les années 1940 et 1950 ayant introduit un nouveau concept dans la mesure du calcium. Le principe de base des méthodes utilisant ces indicateurs consiste à titrer le calcium en solution avec un ion chélateur de calcium puissant tel que l'un des acides polyaminocarboxyliques, l'acide éthylènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique (EDTA) et l'acide éthylèneglycol bis-(2-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA), notamment cette méthode aussi permis d'utiliser des indicateurs comme l'arsenazo-III et le bleu méthyle thymol en 1967 et a été récemment repris par Gindler et King en 1972 (*Robertson et al., 1979b*).

En 1960-1961, Wili a découvert une nouvelle méthode pour mesurer le calcium qui est la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA). Puis en 1964, Seligson et Zettner ont montré que la SAA pouvait être utilisée pour mesurer le calcium dans les fluides sanguins rapidement et avec une précision suffisante (*MacIntyre, 1961b*).

Le calcium peut également être dosé par colorimétrie. Actuellement, le colorant le plus populaire dans les méthodes manuelles et automatisées pour la mesure colorimétrique du calcium est l'o-crésolphtaléine. Cette méthode largement utilisée a ensuite été évoluée par Kessler et Wolfman en 1964, qui l'ont rendue plus spécifique pour le calcium en ajoutant de la 8-hydroxyquinoline pour masquer tout magnésium présent (*Willis, 2006*).

2. Méthodes analytiques de calcium sanguin

2.1. Méthodes colorimétriques

Les méthodes colorimétriques utilisent différentes substances qui complexent le calcium en formant un dérivé dont la coloration est proportionnelle à la concentration du calcium de l'échantillon à doser (sang ou urine). Ces méthodes sont réalisées sur les appareils automatiques multiparamétriques de biochimie.

2.1.1. Colorimétrie au bleu de méthylthymol

Une méthode colorimétrique simple, spécifique et rapide pour la détermination de la concentration sérique de calcium à l'aide de bleu de méthylthymol (MTB) est décrite. Le réactif MTB (Figure 7) peut être utilisé à la fois dans des méthodes manuelles et dans des méthodes automatisées utilisant des analyseurs automatisés sans nécessiter de dialyse. Les résultats obtenus par la méthode automatique ont été comparés à ceux obtenus par la méthode manuelle et l'absorption atomique (*Ripoll, 1976*).

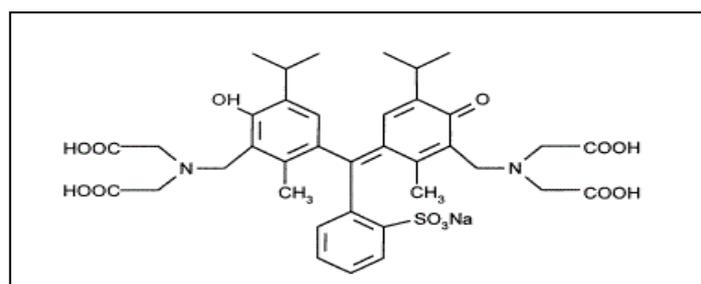


Figure 7: Structure du réactif colorimétrique bleu de méthylthymol (MTB) (*Lin et al., 1999*).

- **Principe du dosage**

L'ion calcium produit avec le MTB, en milieu alcalin, une couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium. La présence d'hydroxy 8-quinoléine élimine l'interférence due aux ions magnésium (*Gindler et King, 1972*).

2.1.2. L'O-crésolphtaléine complexon

L'O-crésolphtaléine est un indicateur de pH réversible. Il est utilisé pour la détermination colorimétrique de la teneur en calcium par la méthode O-CPC. En présence de conditions alcalines (pH 10-12), la liaison du calcium à l'O-crésolphtaléine entraîne la formation d'un complexe rouge d'absorbance comprise entre 570 et 575 nm (*H.M. Brown et Rydqvist, 1981*). Malgré son utilisation très répandue, la méthode CPC présente une stabilité des réactifs relativement courte sur le système, est si sensible au pH, que le dioxyde de carbone influence. Elle présente une non-linéarité de bas de gamme dépendant de la stœchiométrie (*Bourguignon et al., 2014*).

- **Principe du dosage**

La méthode CPC (O-Crésol Phtaléine Complexon) modifiée/établie par Moorehead et Briggs permet la détermination du calcium total dans le sérum, le plasma ou les urines. En milieu alcalin, le CPC réagit avec le calcium pour former un complexe coloré rouge foncé dont l'absorbance, mesurée à 570 nm, est proportionnelle à la concentration en calcium dans le spécimen (*Moorehead et al., 1974*).

2.2. Méthodes physiques

2.2.1. Spectroscopie d'absorption atomique

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est une technique dans laquelle des atomes gazeux libres absorbent un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique pour donner un signal mesurable. Le signal d'absorption reste en rapport avec la concentration des atomes libres absorbants dans le trajet optique. Dans les mesures AAS, l'analyte doit d'abord être transformé en atomes gazeux, généralement par l'effet de chaleur à une cellule dite atomiseur (Figure 8) (*Fernández et al., 2018a*).

- **Principe du dosage**

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est utilisée pour analyser les éléments métalliques à l'état atomique et certains éléments non-métalliques. Lorsque la ligne spectrale caractéristique émise par la lampe de l'élément passe à travers la vapeur atomique produite par l'atomisation, elle sera absorbée par les atomes à l'état fondamental de l'élément à mesurer dans la vapeur (*Bai et al., 2020*).

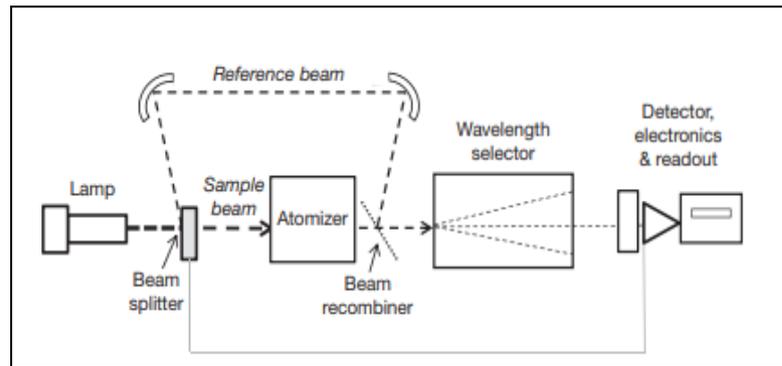


Figure 8: Vue schématique d'un spectromètre à double faisceau pour des mesures d'absorption atomique (Fernández et al., 2018b).

2.2.2. Méthodes photométriques par émission de flamme

Un photomètre à flamme est un appareil employé en analyse chimique inorganique pour établir le taux de certains métaux en solution. Il détecte l'intensité de la lumière émise par le métal lorsque la solution est pulvérisée dans des conditions contrôlées dans une flamme non lumineuse (Figure 9) (Tisi et al., 2015).

- **Principe de dosage**

Dans la photométrie de flamme, l'échantillon, en solution, est pulvérisé dans une flamme pour vaporiser, atomiser et exciter l'échantillon. Les atomes excités de l'élément d'intérêt émettent de la lumière à certaines longueurs d'onde discrètes qui sont caractéristiques de cet élément. La lumière de la longueur d'onde est séparée du reste de la radiation émise et son intensité est mesurée.

Cette mesure d'intensité peut être reliée directement à la concentration de l'élément en question, généralement par comparaison avec les intensités mesurées d'un étalon ou d'une série d'étalons (Isaac et Kerber, 2015).

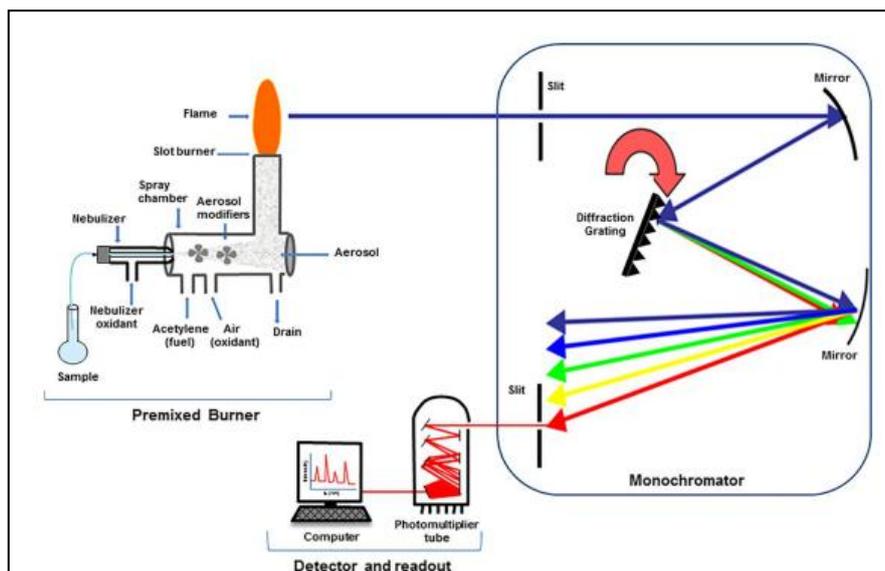


Figure 9: Diagramme schématisé d'un spectrophotomètre de flamme (Fernández-Sánchez et al., 2018).

2.3. Méthodes complexométrique

Les dosages complexométriques sont des méthodes de dosages reposant sur la capacité que possèdent certaines molécules à pouvoir chélateur pour complexer des cations comme le Ca^{2+} . Ce ligand doit posséder au moins une paire d'électrons non-liants disponibles pour se lier au cation central piégé.

Au cours du dosage, un agent complexant ou chélateur, comme l'éthylènediamine-tétraacétate (EDTA), est capable de piéger les cations à doser comme le calcium (Figure 10). Lorsque tous les ions à doser sont piégés, un indicateur complexométrique change de couleur permettant de visualiser l'équivalence (Nielsen, 2010).

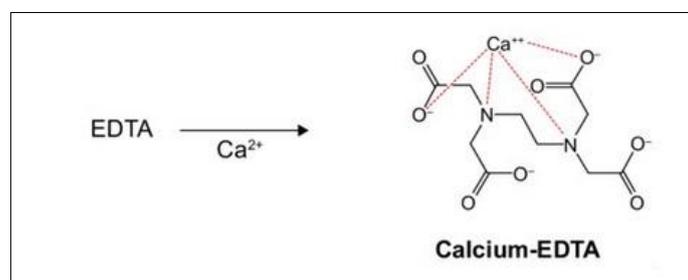


Figure 10: Structure de la molécule de calcium chélatée par l'EDTA (Tsai et al., 2015).

Parmi les indicateurs qui permettent la visualisation de la complexation, on cite le 5-nitro-5'-méthyl-(1,2-bis(o-aminophénoxy) éthan-N, N,N',N' -acide tétraacétique (NM-BAPTA) qui a été développé par ROCHE pour mesurer le calcium total dans le plasma, le sérum et l'urine et d'éviter les inconvénients du CPC (*Bourguignon et al., 2014*).

III. Vérification/validation des performances de méthodes analytiques

1. Définition de protocole de Vérification/validation de méthodes d'analyse

L'objectif d'une méthode d'analyse en biologie médicale est d'identifier et/ou quantifier, avec une incertitude connue, des molécules ou des composants présents dans les liquides biologiques (*Vassault et al., 2010*).

La vérification/validation d'une technique consiste à évaluer les performances du processus analytique (fidélité, justesse, exactitude, domaine de mesure, sensibilité aux interférences, limite de détection s'il y a lieu), à les quantifier en suivant un protocole opératoire standardisé puis à les juger, par rapport à des critères définis(*Vassault et al., 2010*). La Vérification/ la Validation des méthodes exige les référentiels de qualité par des normes. Ces derniers peuvent être utilisés par les laboratoires de biologie médicale et qui peuvent élaborer leurs systèmes de management de la qualité et évaluer leur propre compétence. Ces normes sont "La norme ISO NF 9001 Version 2008", "La norme ISO NF 15189", "La norme ISO NF 22870.

Le domaine d'application des protocoles de vérification/validation des performances des méthodes utilisées en biologie médicale ne s'attache qu'à la phase analytique et concerne des analyses effectuées dans les milieux biologiques (plasma, urine, liquide céphalo-rachidien, etc.) par différentes méthodes (immuno- logiques, colorimétriques, électrochimiques, séparatives, etc.) (*Vassault et al., 2010*).

2. Terminologie

1.1. Méthode de mesure : description générique de l'organisation logique des opérations mises en œuvre dans un mesurage (*Bureau international des poids et mesures (BIPM)International vocabulary of metrology, 2008*).

1.2. Système de mesure : ensemble technique comprenant analyseur, réactif et protocole d'adaptation (*Bureau international des poids et mesures (BIPM)International vocabulary of metrology, 2008*).

1.3. Méthode qualitative

Méthode générant un résultat issu d'une observation par un opérateur. On classe dans cette catégorie toutes les méthodes pour lesquelles aucune mesure d'une donnée quantifiable n'est disponible(*LAB GTA, 2004*).

1.4. Méthode quantitative

Méthode fournissant un résultat chiffré, sur une échelle continue, dont les limites basses et hautes sont connues, en relation directe avec une quantité ou une activité donnée de l'analyte à mesurer (*LAB GTA, 2004*).

1.5. Méthode semi-quantitative

Méthode fournissant un résultat de type qualitatif (positif/négatif) extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (signal continu) (*LAB GTA, 2004*). Ce type de méthode est assimilable à une méthode quantitative.

1.6. Série

Conditions expérimentales aussi représentatives que possible de la variabilité de l'utilisation de la méthode en routine (jour, opérateur, appareillage, etc.) (*Hubert P et al., 2003*).

1.7. Valeur assignée

Valeur attribuée à une grandeur particulière et reconnue, parfois par convention, comme ayant une incertitude appropriée à un usage donné (*Bureau international des poids et mesures (BIPM) International vocabulary of metrology, 2008*).

1.8. Validation

Confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies (*ISO, 2005*). Validation de méthode : c'est l'ensemble des procédures à mettre en œuvre pour s'assurer qu'une méthode présente la fiabilité requise pour répondre aux exigences de qualité dans l'état actuel de l'art (*Vassault A et al, 1986*).

1.9. Vérification

Confirmation par examen et établissement des preuves que les exigences spécifiées ont été satisfaites (*Bureau international des poids et mesures (BIPM) International vocabulary of metrology, 2008*).

1.10. Facteurs de variabilité

Ensemble de facteurs, pouvant influencer l'exactitude des résultats d'analyse et pouvant représenter des biais de mesure, ils peuvent être maîtrisable de manière à minimiser les risques d'erreur. Ces facteurs sont la main d'œuvre, opérateur, milieu et conditions de fonctionnement, objet de mesure, lot de réactifs, étalonnage.

3. Démarche à suivre pour la Validation / vérification des méthodes quantitatives.

3.1. Etapes de la validation / vérification des méthodes quantitatives

La vérification/validation des méthodes analytiques quantitatives, proprement dite, comprend 3 étapes :

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

Le choix de critères de performance (fidélité, justesse...) et les limites d'acceptabilité (seuil) pour une méthode donnée doit se faire préalablement à l'étude expérimentale. Il peut s'appuyer sur des recommandations de sociétés savantes, de groupes de travail de conférences de consensus, de publications scientifiques, sur des valeurs limites utilisées pour la gestion du CIQ, sur des résultats de campagnes de comparaison inter laboratoires, et sera confronté aux données du fournisseur (*Vassault A et al, 1986*).

3.2. Différence entre vérification et validation des méthodes analytiques

Le tableau 2 présente la différence entre la vérification et validation des méthodes quantitatives selon plusieurs modules. D'une part, la vérification est la fourniture d'une preuve objective qu'un élément donné répond à des exigences spécifiées comme répétabilité, justesse, comparaison, mesure de variabilité, maîtrise des facteurs de variabilité. Tandis que la validation est la vérification, lorsque les exigences spécifiées sont adéquates pour l'utilisation prévue qui sont répétabilité, justesse, comparaison, mesure de variabilité, maîtrise des facteurs de variabilité, reproductibilité, limites de quantification, linéarité, limite de détection, sensibilité/spécificité analytiques, interférences, contamination entre échantillons, robustesse, stabilité des réactifs, intervalle de référence.

Tableau/ 2: Différence entre vérification et validation des méthodes d'analyse quantitatives (Jean Longtin, n.d.).

Modules	Vérification	Validation
Répétabilité	X	X
Reproductibilité		X
Justesse/exactitude	X	X
Comparaison	X	X
Incertitude : mesure de variabilité	X	X
Incertitude : maîtrise des facteurs de variabilité	X	X
Limites de quantification		X
Linéarité		X
Limite de détection		X
Sensibilité/spécificité analytiques		X
Interférences		X
Contamination entre échantillons		X
Robustesse		X
Stabilité des réactifs		X
Intervalle de référence		X

3.3. Modules de vérification/validation des méthodes d'analyse quantitatives

Ci-dessus seront cités quelques exemples de modules utilisés pour la vérification des performances de méthodes de détermination quantitative

3.3.1. Fidélité (Répétabilité)

C'est la mesure dans les mêmes conditions optimales (procédure, opérateur, système de mesure, condition de fonctionnement, milieu, lot de réactif, étalonnage et le même objet de mesure pendant courte période de temps), dans le but de vérification. (Hubert P et al., 2003 ; Vassault A et al, 1986).

Des échantillons biologiques anonymisés sont utilisés et provenant de patients, à condition d'avoir l'assurance de leur stabilité pendant la durée de l'évaluation. Des échantillons de contrôle peuvent être utilisés également. Concernant les niveaux (x) de concentration, il est préférable d'effectuer l'évaluation à deux niveaux de concentration différents. Un seul niveau peut être suffisant mais cela doit être justifié (Vassault et al., 2010). Les

niveaux sont choisis en fonction des zones de décision médicale. L'effectif idéal est 30 pour une interprétation statistique optimale. Un nombre d'essais inférieur devra être argumenté en fonction des critères pertinents (coûts des analyseurs, durée d'analyses...)(**Yaya, 2015**).

L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales(**Hubert P et al., 2003 ; Vassault A et al, 1986**).

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série (**Yaya, 2015**).

$$m = \frac{\sum x_i}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}} \quad CV = \frac{s}{m} \times 100$$

3.3.2. Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

L'essai de reproductibilité intra-laboratoire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages. Il permet connaître la variabilité analytique d'une méthode.

On utilise soit des échantillons biologiques anonymisés provenant de patients (échantillons non titrés), à condition d'avoir l'assurance de leur stabilité pendant la durée de l'évaluation, soit des échantillons de contrôle.

L'analyse de chacun des échantillons en double dans 15 séries différentes 15 jours différents au minimum est nécessaire en privilégiant à chaque série de façon indépendante le changement de plusieurs conditions opératoires (manipulateur, lot de réactif, lot d'étalons, etc.).

La détermination de la moyenne (m_{fi}), l'écart type (s_{fi}) et le coefficient de variation (CV_{fi}) des valeurs obtenues pour chaque niveau de concentration au cours des 15 séries indépendamment effectuées en exploitant les formules suivantes :

$$m_{fi} = \frac{\sum x_i}{n} \quad s_{fi} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}} \quad CV_{fi} = \frac{s_{fi}}{m} \times 100$$

Le CV_{fi} calculé est évalué par rapport au CV limite annoncé dans la notice d'utilisation (compte tenu de l'intervalle de confiance) du dispositif produit par le fournisseur.

3.3.3. Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essai et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (*Vassault et al., 2010*).

Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible (**Yaya, 2015**), et cette évaluation permet de mettre en évidence le biais d'une méthode ou une différence systématique entre deux méthodes et de la quantifier à condition de s'assurer que les échantillons de contrôle utilisés se comportent comme les échantillons biologiques (*Vassault et al., 2010*).

Les échantillons retenus peuvent être ceux utilisés pour l'évaluation de la fidélité). Utiliser au moins 2 échantillons de contrôle de 2 niveaux de concentration différents dont les valeurs cibles sont connues, ces niveaux sont choisis en fonction des zones de décision médicale. Les conditions opératoires sont le reflet de l'utilisation habituelle de la méthode (*Vassault et al., 2010*).

La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire), à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur "vraie" (v) de l'échantillon testé (**Yaya, 2015**). Elle est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times ((m-v)/v)$$

La valeur du biais relatif exprimée en pourcentage ou en unité de concentration doit être inférieure à celle annoncée dans les fiches techniques produites par le fournisseur

3.3.4. Limites de linéarité

L'évaluation des limites de linéarité permet de déterminer l'intervalle de de la relation linéaire existant entre les concentrations théoriques des dilutions d'un spécimen à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fidélité et justesse. Au-delà de la limite supérieure (*Yaya, 2015*).

Les solutions contenant l'analyte à doser à partir desquelles des dilutions sont effectuées. Il peut s'agir d'échantillons de matrice équivalente à celle de l'échantillon à doser, sur- chargés avec le composé à mesurer. Choisir une solution de concentration supérieure à celle attendue pour la limite supérieure (E) ; et une solution ne contenant pas l'analyte à doser ou une concentration inférieure à la limite basse attendue (B) (*Vassault et al., 2010*).

Analyser chaque dilution en triple. Répéter l'essai, le cas échéant dans d'autres conditions de temps.

Reporter les résultats sur un graphe $y_i = f(x_i)$ en portant en abscisse les concentrations théoriques des solutions analysées ou de la dilution (x_i) effectuée et en ordonnée les valeurs observées pour chaque dilution y_i . Tracer la droite correspondante. ; et calculer la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression traduisant cette relation(*Vassault et al., 2010*).

L'examen visuel de cette relation permet une appréciation satisfaisante des limites de linéarité haute et basse de la technique étudiée.

Exprimer en pourcentage de la valeur de la solution E (obtenue par une technique de référence ou sélectionnée) les résultats observés pour chaque point de la gamme et les reporter sur un graphe en fonction de la dilution effectuée. La partie rectiligne de la courbe correspond à la zone de linéarité à l'intérieur de laquelle les résultats sont validés (*Vassault et al., 2010*).

3.3.5. Comparaison avec une autre méthode

Elle consiste à évaluer les résultats obtenus avec une méthode par rapport à ceux d'une autre méthode, permet d'estimer la comparabilité des résultats obtenus par ces méthodes et de définir s'il existe un biais entre elles. En cas de discordance entre les deux méthodes, il conviendra d'en évaluer les causes et d'informer les prescripteurs et les patients.

Une cohorte de 40 échantillons au minimum est constituée. Ils sont choisis pour couvrir l'étendue du domaine physiopathologique rencontré et répartis si possible selon les recommandations de la Société française de biologie clinique (SFBC) (*Vassault A et al, 1986*).

Les conditions de stabilité des échantillons sont définies, Les échantillons sont analysés par les deux techniques dans des conditions de temps maîtrisées en utilisant les systèmes analytiques dans les conditions définies et décrites par le fournisseur.

La comparaison des deux méthodes selon les recommandations de Bland-Altman (*Vassault A et al, 1986*) permet d'estimer les relatives différences entre les deux méthodes en fonction des moyennes des concentrations mesurées par chaque méthode. Cela permet de définir le biais entre les deux techniques, son écart type et son intervalle de confiance 95 %.

Les différences observées sont calculées puis reportées sur un graphe. Les rapports (y_i/x_i) pour chaque résultat en fonction de x_i sont calculés. Ensuite, sur un graphe les différences et/ou les rapports en fonction des valeurs de x sont représentés. Enfin, la droite de régression la mieux adaptée pour définir la relation statistique liant les résultats de la technique A avec ceux de la technique B est calculée puis interprétée (*Vassault A et al, 1986*).

Volet pratique

Notre étude est de type analytique qui nous a permis d'appliquer quelques modules de vérification et de validation de deux méthodes analytiques utilisées dans le dosage de la calcémie.

1. Lieu et période de travail

Nous avons réalisé notre stage à l'hôpital universitaire d'Ibn Rochd au niveau du service de biochimie. Notre travail s'est déroulé du 16 au 24 mai 2022.

2. Equipements et réactifs

- Automate Roche COBAS INTEGRA R 400 plus w/o ISE : est un système d'analyse à accès aléatoire regroupant les analyses de chimie clinique, d'électrolytes, de protéines sériques, de drogues et de médicaments thérapeutiques (Figure 11), qui offre actuellement plus de 150 applications (*Muser et al., 2001*).



Figure 11: Automate Roche COBAS INTEGRA R 400 plus w/o ISE

- Automate BIOSYSTEME A 15 : est un analyseur automatique à accès aléatoire spécialement conçu pour effectuer des analyses cliniques biochimiques et turbidimétriques. L'instrument est contrôlé en ligne et en temps réel à partir d'un PC externe dédié (*Annexe I*).



Figure 12: Automate BIOSYSTEME A 15

- Réactifs les réactifs utilisés pour le dosage du calcium sanguin par les deux méthodes sont détaillés dans les annexes 1 et 2.

Réactif 1 : pour l'automate Biosysteme A15 qui contient 50mmol/L de tampon phosphate, 5 mmol/L d'acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique et 120 μ mol/L de Arsénazo III.

Réactif 2 : pour l'automate COBAS Roche qui a deux réactifs.

R1 dans la position B et R2 dans la position C.

R1- CAPSO : 557 mmol/L, NM-BAPTA : 2mmol/L, PH : 10, agent de surface non réactif, conservateur

R2- EDTA : 7.5 mmol/L, PH : 7.3, agent de surface non réactif, conservateur.

3. Phase pré-analytique

Des échantillons de sang ont été prélevés chez des patients anonymes. Des contrôles pathologique et normal ont été également utilisés pour quelques modules de vérification des méthodes analytiques.

3.1. Prélèvement sanguin

Le prélèvement se fait sur du sang veineux au pli du coude, le sang total est prélevé dans des tubes contenant l'héparine.

3.2. Prétraitement des échantillons

Afin d'obtenir le sérum à partir du sang total, une centrifugation (Eppendorf AG 22331 Hamburg) à 30000 tours/min pendant 5min a été effectuée. Une étape de congélation a permis de conserver les échantillons jusqu'au moment du dosage.

4. Méthodes analytiques

4.1. Dosage du calcium sérique par méthode colorimétrique Arsénazo III

Arsénazo III (AIII) est un colorant pigmentaire métallique (*Chiu et Haynes, 1980*). Il est utilisé pour détermination du calcium dans des échantillons biologiques (*H M Brown et Rydqvist, 1981*).

4.1.1. Principe du dosage

La méthode est basée sur la variation d'absorption à la longueur d'onde 650 nm du complexe formé par la liaison spécifique de l'Arsénazo III avec le calcium en milieu acide (pH=6.5). L'intensité du chromophore formé est proportionnelle à la concentration de calcium total de l'échantillon (*Michaylova et Ilkova, 1971*).



4.1.2. Mode opératoire

Une étape de préparation est d'abord nécessaire avant d'effectuer le dosage. Un lavage du circuit de l'automate est effectué pour minimiser le risque de contamination. Ensuite une calibration de contrôle est réalisée (intervalle de la normalité du contrôle de Ca^{2+} (Arsénazo III) [2.72 mmol/l - 3.39 mmol], valeur cible = 3.05 mmol/l).

Après une décongélation des échantillons (par un simple mouvement de friction des tubes entre les deux mains), des volumes de 150 μl de sérum sont mis dans les godets et sont placés par ordre dans les cuves au niveau de l'automate (Biosystème A 15). Les résultats de la calcémie sont recueillis après une programmation des paramètres du système d'automate.

4.1.3. Expression des résultats

Les concentrations du calcium sérique sont exprimées en mmol/L

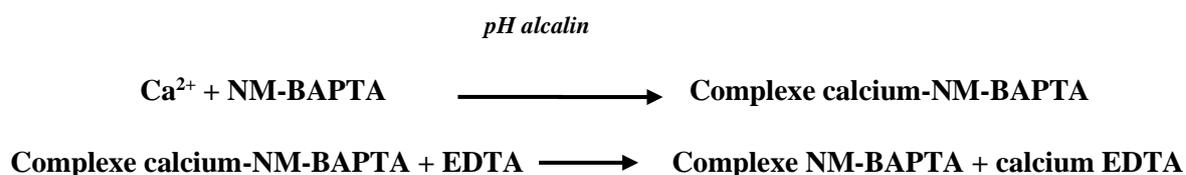
4.2. Dosage du calcium sérique par méthode complexométrique BAPTA

Roche a développé une nouvelle méthode pour mesurer le calcium total dans le plasma, le sérum et l'urine à l'aide du chromophore 5-nitro-5'-méthyl-(1,2-bis(o-aminophénoxy) éthan-N, N, N', N'-acide tétraacétique (NM-BAPTA). Cette méthode

présente plusieurs avantages par rapport à la méthode colorimétrique CPC, notamment une meilleure linéarité, une meilleure précision, une stabilité accrue et une absence d'interférence par le magnésium ou le gadolinium (*Bourguignon et al., 2014*).

4.2.1. Principe du dosage

Les ions calcium réagissent avec le 5-nitro-5'-méthyl-BAPTA (NM-BAPTA) dans des conditions alcalines pour former un complexe. Ce complexe réagit dans la deuxième étape avec l'EDTA.



La variation de l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration de calcium et se mesure par le biosystème (*Annexe 1*).

4.2.2. Mode opératoire

Une calibration de contrôle est réalisée ensuite des volumes de 150 µl de sérum sont mis dans les godets et sont placés par ordre dans des portoirs au niveau de l'automate (Cobas). Les résultats de la calcémie sont recueillis après une programmation des paramètres du système d'automate.

4.2.3. Expression des résultats

Les concentrations du calcium sérique sont exprimées en mmol/L

5. Protocole de vérification/ validation des méthodes Arsenazo-Bapta.

Les modules d'évaluation analytique appliqués dans cette étude s'inspirent des recommandations du protocole Valtec de la Société française de biologie clinique (SFBC) (*A.Vassault et al., 1999*).

5.1. Etude de la comparaison de méthodes analytiques

La comparaison de deux méthodes permet d'estimer la comparabilité des résultats obtenus par ces méthodes et de définir s'il existe un biais entre elles.

Lors de cette étape, nous avons réalisé sur 30 échantillons le dosage de la calcémie sur chacun des deux automates pour évaluer leurs concordances. Nous avons comparé par la suite, les valeurs de calcémie obtenues par Roche COBAS INTEGRA 400 plus w/o ISE à celles obtenues par le Biosystèmes A15.

Un coefficient de corrélation R ainsi que le facteur de détermination de régression r^2 .

5.2. Etude de la répétabilité

Cette évaluation a pour objet de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement des deux systèmes analytiques.

Pour l'étude de la répétabilité de calcium, nous avons utilisé deux échantillons contrôles pathologique et normal. Le dosage est effectué et répété 6 fois, le même jour, avec la même procédure, le même opérateur, le même lot de réactif et les mêmes conditions de travail.

Pour chacun des deux niveaux de contrôle (pathologique et normal) on détermine ensuite la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (CV).

$$m = \frac{\sum x_i}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}} \quad CV = \frac{s}{m} \times 100$$

5.3. Etude de la reproductibilité (fidélité intra-laboratoire)

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... Elle permet connaître la variabilité analytique d'une méthode.

L'essai de reproductibilité a été effectué sur deux échantillons contrôles pathologique et normal. Le facteur de variabilité était le temps, les essais sont répétés trois fois chaque jour pendant 3 jours successifs.

Le calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation (CV) sont réalisés. Le CV calculé est comparé au CV limite admissible de fidélité intermédiaire choisi au préalable (Fournisseur, SFBC, ...)

$$m_{fi} = \frac{\sum x_i}{n} \quad s_{fi} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n - 1}} \quad CV_{fi} = \frac{s_{fi}}{m} \times 100$$

5.4. Approche de la justesse (Module 3)

Cette évaluation permet de mettre en évidence le biais d'une méthode ou une différence systématique entre deux méthodes et de la quantifier. Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible (Yaya, 2015).

Pour ce faire, les échantillons retenus sont ceux utilisés pour l'évaluation de la fidélité. deux échantillons de contrôle de deux niveaux de concentration différents dont les valeurs cibles sont connues.

La justesse est quantifiée par le biais relatif estimé en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de fidélité intermédiaire à la valeur cible attendue assimilée à la valeur vraie (v) de l'échantillon testé. La valeur du biais relatif exprimée en pourcentage ou en unité de concentration doit être inférieure à celle annoncée dans les fiches techniques produites par le fournisseur.

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times ((m-v)/v)$$

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel GreaphPad Prism 5. Les résultats de mesure de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse sont présentés sous forme de moyenne \pm écartype ($m \pm s$) est par le coefficient de variation CV (%) ainsi que par le biais relatif (%) pour la justesse.

La comparaison entre les moyennes et les biais relatif entre les méthodes analytiques est analysée par le *t*-test de student, avec un seuil de signification statistique défini par une valeur de $p < 0.05$.

La comparaison entre les différents coefficients de variation et biais relatifs est analysée par le test de Fisher.

L'analyse statistique de corrélation a pour but d'étudier la corrélation entre 2 séries des variables quantitatives et de trouver la droite de régression linéaire simple qui les associe. Pour se faire, la normalité de distribution des variables a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Selon le résultat trouvé un test de corrélation de Pearson est appliqué si les variables suivent la loi normale. Dans le cas contraire un test de corrélation de Spearman est appliqué.

Dans les deux cas, le coefficient de corrélation varie entre -1, 0 et +1. Par convention la relation entre les deux variables est dite :

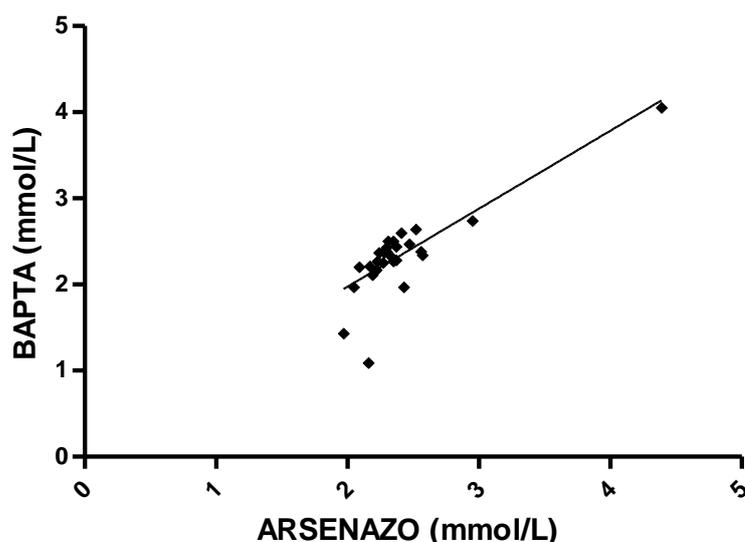
- Parfaite si $r = 1$.
- Très forte si $r > 0,8$.
- Forte si r se situe entre 0,5 et 0,8.

L'analyse de régression simple est une méthode statistique de modélisation des relations entre les variables (dépendantes et indépendantes). Elle est utilisée pour décrire et analyser les relations entre les données.

Résultats et Interprétation

1. Résultats de corrélation entre la calcémie dosée par deux méthodes analytiques

La figure 13 montre une forte corrélation positive ($R=0,7301$) et statistiquement significative ($p < 0,0001$) entre les valeurs de la calcémie obtenues par COBAS INTERGA 400 PLUS par méthode complexométrique BAPTA et celles obtenues par BIOSYSTEM A 15 par méthode colorimétrique ArsenazoIII. Le coefficient de détermination r^2 de la régression linéaire est égal à 0,6809.



Couple (X, Y)	Ratio Xi/Yi	Différence Xi-Yi
BAPTA/ARSENAZO	0.97	0.1
	[0.73, 1.08]	[-0.2, +0.5]

Figure 13: Diagramme de corrélation BAPTA / ARSENAZO du dosage de la calcémie

En comparant les résultats des mêmes échantillons donnés par les deux méthodes, les rapports des valeurs (Ratio Xi/Yi) oscillent dans l'intervalle [0,73 ; 1,08] donc proches de 1 (Ratio Xi/Yi = 0,97). Quant aux différences entre les valeurs (Xi-Yi), elles oscillent dans l'intervalle [-0,2, +0,5] donc proches de 0. Il en résulte que les deux méthodes fournissent des résultats comparables.

En effet, d'après la représentation de la figure 14, il est clair qu'il n'y a pas de différence significative ($p\ 0,7393 > 0,05$) entre le taux de calcémie dosé par la méthode BAPTA estimée à $2,389 \pm 0,4195$ mmol/L et celui dosé par la méthode ArsenazoIII qui est estimé à $2,326 \pm 0,4602$ mmol/L.

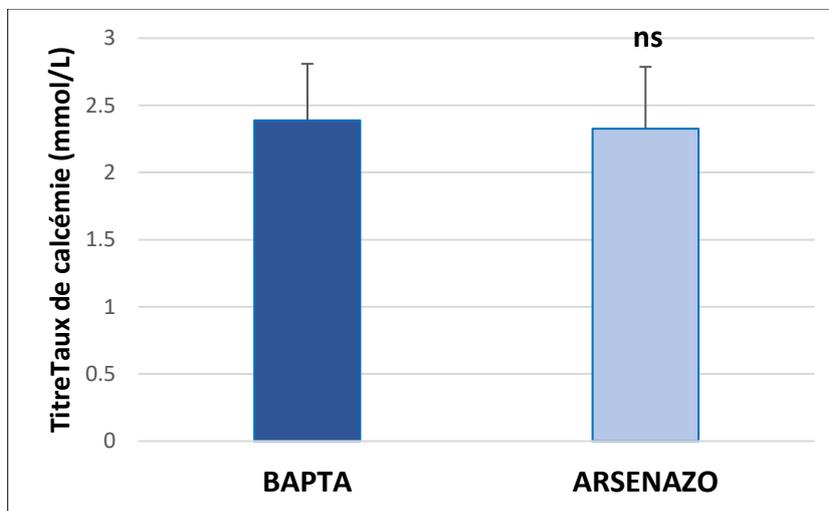


Figure 14: Comparaison entre les taux de calcémie dosée par deux méthodes analytiques.

Chaque barre représente la moyenne \pm S du taux de la calcémie dosée par la méthode complexométrique BAPTA et par la méthode colorimétrique ArsenazoIII. La comparaison entre les moyennes a été analysée par le test Mann-Whitney ($p < 0,05$).

2. Résultat de la répétabilité

Les résultats de l'étude de la répétabilité du dosage de calcium par la méthode complexométrique BAPTA (COBA INTERGA 400 PLUS) et par la méthode colorimétrique Arsenazo III (Biosysteme A 15) sont présentés dans le tableau 03.

En comparant les deux moyennes des répétitions du dosage du calcium du niveau contrôle normal entre les deux méthodes d'analyses (CN BAPTA et CN Arsenazo), il semble que ces deux valeurs sont proches ($2,235 \pm 0,042$ et $2,013 \pm 0,173$ mmol/L) mais elles sont significativement différentes ($*p < 0,05$). La même observation est faite concernant les deux moyennes des répétitions de calcémie du niveau contrôle pathologique entre les deux méthodes d'analyses (CP BAPTA et CP Arsenazo) avec des valeurs significativement différentes ($3,362 \pm 0,057$ et $3,042 \pm 0,139$ mmol/L, $**p < 0,01$).

En faisant une deuxième comparaison entre les coefficients de variation, on remarque que le CV des deux niveaux de control BAPTA ($CV_{CN} = 1,89\%$ et $CV_{CP} = 1,7\%$) sont supérieurs

aux normes de fournisseur ($CV_{\text{Fournisseur}} = 0.8\%$) et de la SFBC ($CV_{\text{SFBC}} = 1.2\%$). La même remarque est constatée pour la valeur du CV des deux niveaux de control Arsenazo ($CV_{\text{CN}} = 8.60\%$ et $CV_{\text{CP}} = 4.59\%$) sont supérieurs aux normes de la SFBC ($CV_{\text{SFBC}} = 1.2\%$). En plus, si on compare les CV des deux niveaux de control BAPTA avec leurs respectifs Arsenazo, on remarque ces derniers sont statistiquement bien supérieurs (selon le test de Fisher) aux CVs de la méthode BAPTA.

Tableau 3: Résultats de l'étude de répétabilité

Echantillon	n	m ± s (mmol/L)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
				Fournisseur	SFBC
Niveau 1 : CN BAPTA	6	2.235 ± 0.042	1.89	0.8	1.2
Niveau 1 : CN Arsenazo	6	2.013 ± 0.173 *	8.60 §	-	1.2
Niveau 2 : CP BAPTA	6	3.362 ± 0.057	1.70	0.8	1.2
Niveau 2 : CP Arsenazo	6	3.042 ± 0.139 **	4.59 §	-	1.2

Chaque résultat représente la moyenne ± écartype ($m \pm s$) de 6 (n) répétition de dosage de deux niveaux de contrôle normal (CN) et contrôle pathologique (CP). La comparaison entre moyennes du même niveau de contrôle évaluées par deux méthodes analytiques (BAPTA/ARRSENAZO) a été analysée par le t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0.01$). Les comparaisons des coefficients de variation CV (%) sont analysés par le test de Fisher (§ désigne une différence significative).

3. Résultat de la reproductibilité

En comparant les deux moyennes des répétitions de 3 jours du dosage du calcium du niveau contrôle normal entre les deux méthodes d'analyses (CN BAPTA et CN Arsenazo), il semble que ces deux valeurs sont statistiquement similaires ($2,253 \pm 0,100$ et $2,017 \pm 0,177$ mmol/L ; *ns p* > 0.05). La même constatation est faite concernant les deux moyennes des répétitions de 3 jours de la calcémie du niveau contrôle pathologique entre les deux méthodes d'analyses (CP BAPTA et CP Arsenazo) avec des valeurs statistiquement comparables ($3,200 \pm 0,026$ et $3,160 \pm 0,103$ ns mmol/L, *ns p* > 0.05).

En faisant une deuxième comparaison entre les coefficients de variation, on remarque que le CV de control normal BAPTA (CV CN = 4.47%) est supérieur aux normes de fournisseur (CV Fournisseur = 0.9%) et de la SFBC (CV SFBC = 1.6%) par contre le CV de control pathologique BAPTA (CV CP = 0.83%) est inférieur aux normes de fournisseur (CV Fournisseur = 0.9%) et de la SFBC (CV SFBC = 1.6%). On remarque la même chose pour la valeur du CV des deux niveaux de control Arsenazo (CV_{CN} = 8.82% et CV_{CP} = 3.29%) sont supérieurs aux normes de la SFBC (CV_{SFBC} = 1.6%). D'autre part la comparaison des CV des deux niveaux de control BAPTA avec leurs respectifs Arsenazo, montre que ces derniers sont supérieurs aux CV de la méthode BAPTA mais cette différence n'est pas significative statistiquement (selon le test Fisher).

Tableau 4: Résultats de l'étude de reproductibilité

Echantillon	N	m ± s (mmol/L)	CV (%)	CV (%)	
				Fournisseur	SFBC
Niveau 1 : CN BAPTA	3	2,253 ± 0,100	4.47	0.9	1.6
Niveau 1 : CN Arsenazo	3	2,017 ± 0,177 ns	8.82 ns	-	1.6
Niveau 2 : CP BAPTA	3	3,200 ± 0,026	0.83	0.9	1.6
Niveau 2 : CP Arsenazo	3	3,160 ± 0,103 ns	3.29 ns	-	1.6

Chaque résultat représente la moyenne ± écartype ($m \pm s$) de 3 répétitions ($n = 3$ jours) de dosage de deux niveaux de contrôle normal (CN) et contrôle pathologique (CP). La comparaison entre moyennes du même niveau de contrôle évaluées par deux méthodes analytiques (BAPTA/ARRSENAZO) a été analysée par le t -test ($*p < 0,05$). Les comparaisons des coefficients de variation CV (%) sont analysés par le test de Fisher. (§ désigne une différence significative).

4. Résultat de la justesse

La comparaison entre les biais relatifs, montre que le biais relatif des deux niveaux de contrôle BAPTA (Biais_{CN} = 0.22% et Biais_{CP} = 1.69%) sont inférieurs aux normes de la SFBC (Biais_{SFBC} = 1.7%). Quant à la méthode Arsenazo, on constate que le biais relatif du niveau de contrôle normal (Biais_{CN} = 3.76%) est supérieur au biais relatif des normes SFBC (Biais_{SFBC} = 1.7%), contrairement au biais relatif du niveau de contrôle pathologique (Biais_{CP} = 0.06%) qui est inférieur aux normes SFBC.

Par ailleurs, en comparant les biais relatifs du niveau de contrôle normal entre les deux méthodes, on trouve que le biais relatif BAPTA est inférieur à celui de la méthode Arsenazo. Concernant le niveau de contrôle pathologique BAPTA ; il est supérieur par rapport à celui de la méthode Arsenazo.

Tableau 5: Résultats de l'étude de justesse

Echantillon	n	m ± s (mmol/L)	Valeur de référence cible	Biais relatif (%)	Biais (%) SFBC
Niveau 1 : CN BAPTA	6	2.235 ± 0.042	2.23	0.22	1.7
Niveau 1 : CN Arsenazo	6	2.013 ± 0.173 *	1.94	3.76	1.7
Niveau 2 : CP BAPTA	6	3.362 ± 0.057	3.42	1.69	1.7
Niveau 2 : CP Arsenazo	6	3.042 ± 0.139 **	3.04	0.06	1.7

Chaque résultat représente la moyenne ± écartype ($m \pm s$) de 6 répétitions (n) de dosage de deux niveaux de contrôle normal (CN) et contrôle pathologique (CP). La comparaison entre moyennes du même niveau de contrôle évaluées par deux méthodes analytiques (BAPTA/ARRSENAZO) a été analysée par le t -test ($*p < 0,05$)

Notre étude a été conçue pour comparer deux méthodes différentes de dosage du calcium sanguin, une méthode complexométrique BAPTA utilisant l'automate COBAS INTEGRA 400 et une deuxième méthode colorimétrique utilisant l'automate BIOSYSTEM A15.

Le dosage de 30 échantillons sanguin par ces deux méthodes différentes a donné deux moyennes similaires avec aucune différence significative. Notre résultat a également montré une corrélation positive selon Spearman ($R=0,7301$; $p > 0.05$), entre ces deux méthodes analytiques. Ce résultat est en accord avec celui de l'étude de Omoro ayant trouvé une valeur de coefficient de corrélation de Pearson égale à 0,7978. Dans cette étude, le chercheur a comparé entre deux méthodes colorimétrique de dosage du calcium, Arsenazo III et l'o-CPC (*OMORE, 2018*).

De plus, dans une deuxième étude réalisée par Supak Smolcic et ses collaborateurs, les résultats de la comparaison du dosage de calcium de 30 échantillons sanguin entre deux méthodes colorimétriques, Arsenazo III effectuée par Beckman Coulter AU640 et la méthode o-CPC réalisée par l'analyseur Cobas 6000 série c501 a donné un coefficient de corrélation positif de 0.98 (selon Passing and Bablock) qui est plus élevé que le nôtre (*Supak Smolcic et al., 2011*).

La connaissance des performances des méthodes d'analyse utilisée est indispensable à la maîtrise de la fiabilité des résultats. Une méthode d'analyse présente plusieurs caractéristiques essentielles parmi lesquelles, la fidélité et la justesse, que le laboratoire se doit de connaître. Dans notre travail, nous avons évalué la fidélité des deux automates avec leurs propres méthodes de dosage de la calcémie. Cette étude de fidélité a inclus la répétabilité et la reproductibilité (fidélité intermédiaire).

Nos résultats de répétabilité sont exprimés par le coefficient de variation (CV%) et par des moyennes de 6 répétitions de deux niveaux de contrôle (normal et pathologique) utilisant deux méthode BAPTA et Arsenazo. Ces moyennes sont très proches ($CN_{BAPTA} = 2.235 \pm 0.042$ et $CN_{Arsenazo} = 2.013 \pm 0.173$ mmol/L) mais elles sont significativement différentes ($*p < 0,05$). Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Dada ayant fait la répétabilité du dosage de calcium par méthode Arsenazo sur spectromètre Mindray BA 88A, il a trouvé une valeur de moyenne de 2.22 ± 0.19 mmol/L (*DADA Lazare, 2019*). Par ailleurs le CV du niveau de control normal Arsenazo est estimé dans nos résultats à 8.6%

ce qui est en accord avec le CV_{CN} Arsenazo de l'étude de Dada qui est estimé à 8.88% (*DADA Lazare, 2019*).

Concernant l'évaluation de la répétabilité des deux méthodes BAPTA et Arsenazo, leurs CV respectifs qui sont estimés à 1.89% et 8.6% sont statistiquement différents. Ces deux CV sont supérieurs aux normes du fournisseur (0.8% pour BAPTA) (**Annexe 1**) et de la SFBC (1.2%) (*A.Vassault et al., 1999*). On peut dire que le dosage du calcium, ne répond pas aux critères de la SFBC en ce qui concerne la répétabilité, ceci concerne la méthode Arsenazo plus que la méthode BAPTA. Ce constat appelle une action corrective urgente.

En faisant le constat sur le deuxième élément de la fidélité, la reproductibilité, les moyennes des répétitions du dosage sur trois jours consécutifs des deux niveaux de contrôles ne montre pas de différence significative entre les deux méthodes BAPTA et Arsenazo. Dans l'étude de Dada, citée ci-dessus, la valeur de la moyenne de reproductibilité du contrôle normal Arsenazo était de 2.29 ± 0.60 mmol/L qui est similaire à la nôtre $2,017 \pm 0,177$ mmol/L (*DADA Lazare, 2019*).

Les CV de reproductibilité des niveaux de contrôle respectifs aux deux méthodes utilisées BAPTA et Arsenazo sont estimés à 4.47% et 0.83% (pour CN/CP_{BAPTA}) et 8.82% et 3.29% (pour $CN/CP_{Arsenazo}$). Toutes ces valeurs de CV sont supérieures aux normes du fournisseur (0.9% pour BAPTA) (**Annexe 1**) et de la SFBC (1.6%) (*A.Vassault et al., 1999*). On peut dire que le dosage du calcium, ne répond pas aux critères de la SFBC en ce qui concerne la reproductibilité avec un degré plus important avec la méthode Arsenazo par rapport à la méthode BAPTA. Ce constat appelle une action corrective urgente.

D'une autre part, une approche de la justesse a été envisagée et appliquée à nos deux méthodes analytiques. Il s'agit de comparer la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la valeur vraie. L'écart observé correspond au biais relatif dont la valeur ne doit pas dépasser les normes de SFBC.

Lorsqu'on compare les valeurs de biais relatifs obtenues dans notre étude, avec les spécifications de qualité recommandées par la SFBC (1.7%), les résultats pour le dosage de calcium par la méthode BAPTA (Biais $CN = 0.22\%$ et Biais $CP = 1.69\%$) sont en accord avec ces recommandations (*A.Vassault et al., 1999*). Par contre les CVs correspondants aux dosages Arsenazo ne sont pas en accord avec les recommandations de la SFBC avec un biais

du CN (3.76%) supérieur à la norme et un biais du CP (0.06%) inférieur à celui recommandé par les spécifications de qualité SFBC. Ces résultats qui s'opposent pour une même méthode prouvent que l'automate Biosysteme A15 utilisant la méthode Arsenazo pour le dosage de la calcémie n'est pas juste.

Comme la majeure partie du processus analytique est réalisée par l'appareil, une défaillance au niveau de l'appareil peut affecter son mode de fonctionnement. Ce dysfonctionnement au niveau de l'automate peut entraîner de nombreuses erreurs car chaque élément entrant dans le système analytique serait affecté (*DADA Lazare, 2019*). Des erreurs aléatoires et systématiques peuvent être constatées. La technique automatisée BAPTA- COBAS INTEGRA Plus 400 s'est montrée juste, alors que la technique automatisée Arsenazo III-BIOSYSTEME A15 ne l'est pas. Ceci peut être expliqué par le fait que, l'automate COBAS INTEGRA Plus 400 fonctionne en système fermé difficile à contaminer tandis que le Biosystème A15 fonctionne selon un système ouvert où les échantillons sont exposés à la contamination, sachant que les deux techniques automatisées utilisent des réactifs prêts à l'emploi.

Si les résultats de laboratoire ne sont pas comparables à partir de différents systèmes analytiques, la possibilité d'un diagnostic incorrect et de mauvaise qualité des soins prodigués aux patients est accrue. Les erreurs de laboratoire peuvent être préanalytiques, analytiques ou postanalytiques. Il a été prouvé que les erreurs préanalytiques sont plus fréquentes que les erreurs analytiques. Les erreurs analytiques dues à un dysfonctionnement de l'analyseur peuvent être complètement évitées si l'on dispose de deux analyseurs comparables (*Nanda, 2014*).

Conclusion

Dans le cadre de l'évaluation des méthodes de détermination quantitative du calcium sanguin par deux systèmes analytiques NM-BAPTA-COBAS INTEGRA Plus 400 et ArsenazoIII- BIOSYSTEME A15, notre travail suggère une corrélation positive entre les deux méthodes avec des moyennes statistiquement comparables.

En appliquant deux modules de vérification ; fidélité (répétabilité, reproductibilité) et justesse sur les deux automates utilisés, et sur la base des valeurs obtenues pour le biais relatif et CV, on peut conclure que :

- La technique automatisée NM-BAPTA- COBAS INTEGRA Plus 400 s'est montrée juste avec une fidélité moindre selon les normes SFBC.
- La technique Arsenazo III-BIOSYSTEME A15 n'est pas juste et n'est pas fidèle, elle ne suit pas les recommandations de la SFBC
- L'automate COBAS INTEGRA Plus 400 à système fermé fonctionne mieux et donne des résultats plus justes que l'automate BIOSYSTEME A15 à système ouvert.
- Le calcium étant très sensible aux interférences et à la contamination des réactifs, la méthode préférée pour le dosage est la méthode complexométrique NM-BAPTA par rapport à la méthode colorimétrique Arsenazo-III.

Notre travail mérite d'être complété en prenant en considération les points suivants

- Augmenter le nombre d'échantillons
- Eliminer les valeurs aberrantes par des méthodes statistiques adéquates
- Application de tous les modules de vérification/validation des méthodes de dosage du calcium
- Procéder à la vérification/validation de toutes les méthodes de dosage du calcium utilisées dans les laboratoires d'analyses algériens afin de créer un consensus lors du choix de la méthode appropriée

Nous terminons par ces recommandations concernant le contrôle de qualité :

- Mettre en place des systèmes de contrôle de qualité interne et externe à l'échelle nationale
- Faire la maintenance périodique des appareils et automates

Références bibliographiques

- A. Vassault, A. Hulin, E. Chapuzet, J.A., C. Giroud et les membres du sous-groupe 2. analytique de la SFBC*, 2010. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse 247–294.
- Albarracín, M., Weisstaub, A.R., Zuleta, A., Drago, S.R., 2016. Extruded whole grain diets based on brown, soaked and germinated rice. Effects on the lipid profile and antioxidant status of growing Wistar rats. Part II. Food Funct. 7, 2729–2735. <https://doi.org/10.1039/C6FO00208K>
- Ali Naqvi, M., Anaraki Irani, K., Katanishoostari, M., Rousseau, D., 2016. Disorder in Milk Proteins: Formation, Structure, Function, Isolation and Applications of Casein Phosphopeptides. Curr. Protein Pept. Sci. 17, 368–379. <https://doi.org/10.2174/1389203717666151201191658>
- Ambroise Olabodé OMORE, 2018. ETUDE COMPARATIVE DE DEUX METHODES DE DOSAGE DU CALCIUM AU CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DEPARTEMENTAL DE L'OUEME - PLATEAU (CHUD-OP).
- Anthony Lai, F., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.-Y., Meissner, G., 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature 331, 315–319. <https://doi.org/10.1038/331315a0>
- A.Vassault, D.G., J.De Greave, J.Bienvenu, 1999. Analyses de biologie médicale: spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques.
- Bai, L., Sun, W., Huang, M., Li, L., Geng, C., Liu, K., Yan, D., 2020. Study on the Methods of Separation and Detection of Chelates. Crit. Rev. Anal. Chem. 50, 78–89. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1573657>
- Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (Eds.), 2005. Clinical chemistry: principles, procedures, correlations, 5th ed. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Bourguignon, C., Dupuy, A.M., Coste, T., Michel, F., Cristol, J.P., 2014. Evaluation of NM-BAPTA method for plasma total calcium measurement on Cobas 8000®. Clin. Biochem. 47, 636–639. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.027>
- Bove-Fenderson, E., Mannstadt, M., 2018. Hypocalcemic disorders. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.05.006>
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., Carafoli, E., 2013. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling, in: Banci, L. (Ed.), Metallomics and the Cell, Metal Ions in Life Sciences. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 119–168. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_5

- Brown, H.M., Rydqvist, B., 1981. Arsenazo III-Ca²⁺. Effect of pH, ionic strength, and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca²⁺ ion-sensitive electrodes and absorbance measurements. *Biophys. J.* 36, 117–137. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84720-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84720-0)
- Brown, H M, Rydqvist, B., 1981. Arsenazo III-Ca²⁺. Effect of pH, ionic strength, and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca²⁺ ion-sensitive electrodes and absorbance measurements 36, 21.
- Buckley, B.M., Russell, L.J., 1988. The Measurement of Ionised Calcium in Blood Plasma. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 25, 447–465. <https://doi.org/10.1177/000456328802500501>
- Budesínský, B., 1969. Acidity of several chromotropic acid azo derivatives. *Talanta* 16, 1277–1288. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(69\)80003-2](https://doi.org/10.1016/0039-9140(69)80003-2)
- Burckhardt, P., 2021. Hypocalcémie, hypomagnésémie et hypophosphatémie. *Forum Méd. Suisse – Swiss Med. Forum.* <https://doi.org/10.4414/fms.2021.08613>
- Bureau international des poids et mesures (BIPM) International vocabulary of metrology, 2008. Basic and general concepts and associated terms (VIM, 3rd edition).
- Carafoli, E., 1987. INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002143>
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M., 2001. Generation, Control, and Processing of Cellular Calcium Signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 107–260. <https://doi.org/10.1080/20014091074183>
- Carnevale, V., Dionisi, S., Nofroni, I., Romagnoli, E., Paglia, F., De Geronimo, S., Pepe, J., Clemente, G., Tonnarini, G., Minisola, S., 2004. Potential Clinical Utility of a New IRMA for Parathyroid Hormone in Postmenopausal Patients with Primary Hyperparathyroidism. *Clin. Chem.* 50, 626–631. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026328>
- Chambers, E.S., Preston, T., Frost, G., Morrison, D.J., 2018. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr. Nutr. Rep.* 7, 198–206. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0248-8>
- Chiu, V.C.K., Haynes, D., 1980. The pH Dependence and the Binding Equilibria of the Calcium Indicator — Arsenazo III. *Membr. Biochem.* 3, 169–183. <https://doi.org/10.3109/09687688009063884>
- Clark, E.P., Collip, J.B., 1925. A STUDY OF THE TISDALL METHOD FOR THE DETERMINATION OF BLOOD SERUM CALCIUM WITH A SUGGESTED MODIFICATION. *J. Biol. Chem.* 63, 461–464. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)85009-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)85009-8)
- Cusano, N.E., Maalouf, N.M., Wang, P.Y., Zhang, C., Cremers, S.C., Haney, E.M., Bauer, D.C., Orwoll, E.S., Bilezikian, J.P., 2013. Normocalcemic Hyperparathyroidism and

- Hypoparathyroidism in Two Community-Based Nonreferral Populations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2734–2741. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1300>
- D'Amelio, P., Sassi, F., 2018. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif. Tissue Int.* 102, 415–425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>
- D'Amour, P., Räkel, A., Brossard, J.-H., Rousseau, L., Albert, C., Cantor, T., 2006. Acute Regulation of Circulating Parathyroid Hormone (PTH) Molecular Forms by Calcium: Utility of PTH Fragments/PTH(1–84) Ratios Derived from Three Generations of PTH Assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 283–289. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1628>
- Divieti, P., John, M.R., Jüppner, H., Bringhurst, F.R., 2002. Human PTH-(7-84) Inhibits Bone Resorption *in Vitro* Via Actions Independent of the Type 1 PTH/PTHrP Receptor. *Endocrinology* 143, 171–176. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8575>
- Fernández, B., Lobo, L., Pereiro, R., 2018a. Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, p. B9780124095472140000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14116-2>
- Fernández-Sánchez, M.L., Fernández-Arguelles, M.T., Costa-Fernández, J.M., 2018. Optical Atomic Emission Spectrometry/Flame Photometry, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, p. B9780124095472144000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14533-0>
- Fleming, K.H., Heimbach, J.T., 1994. Consumption of Calcium in the U.S.: Food Sources and Intake Levels. *J. Nutr.* 124, 1426S–1430S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_8.1426S
- Fukagawa, M., Kazama, J.J., 2005. With or without the kidney: the role of FGF23 in CKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 1295–1298. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh827>
- Fukao, W., Hasuike, Y., Yamakawa, T., Toyoda, K., Aichi, M., Masachika, S., Kantou, M., Takahishi, S. (Ikeda), Iwasaki, T., Yahiro, M., Nanami, M., Nagasawa, Y., Kuragano, T., Nakanishi, T., 2018. Oral Versus Intravenous Iron Supplementation for the Treatment of Iron Deficiency Anemia in Patients on Maintenance Hemodialysis—Effect on Fibroblast Growth Factor-23 Metabolism. *J. Ren. Nutr.* 28, 270–277. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2017.12.009>
- Gindler, E.M., King, J.D., 1972. Rapid Colorimetric Determination of Calcium in Biologic Fluids with Methylthymol Blue. *Am. J. Clin. Pathol.* 58, 376–382. <https://doi.org/10.1093/ajcp/58.5.376>
- Godfraind-De Becker, A., Godfraind, T., 1980. Calcium Transport System: A Comparative Study in Different Cells, in: International Review of Cytology. Elsevier, pp. 141–170. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62428-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62428-6)
- Goldstein, D.A., 1990. Serum Calcium, in: Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W. (Eds.), Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Butterworths, Boston.

- Habener, J.F., Kemper, B.W., Rich, A., Potts, J.T., 1977. Biosynthesis of Parathyroid Hormone, in: Proceedings of the 1976 Laurentian Hormone Conference. Elsevier, pp. 249–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571133-3.50013-1>
- Harold Copp, D., 1972. Evolution of calcium regulation in vertebrates. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1, 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(72\)80049-5](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(72)80049-5)
- Hernández-Castellano, L.E., Hernandez, L.L., Weaver, S., Bruckmaier, R.M., 2017. Increased serum serotonin improves parturient calcium homeostasis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 1580–1587. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11638>
- Hodges, J., Cao, S., Cladis, D., Weaver, C., 2019. Lactose Intolerance and Bone Health: The Challenge of Ensuring Adequate Calcium Intake. *Nutrients* 11, 718. <https://doi.org/10.3390/nu11040718>
- Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B., al, 2003. Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches – rapport d’une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques (raport), STP Pharma Pratiques.
- Hunt, C.D., Johnson, L.K., 2007. Calcium requirements: new estimations for men and women by cross-sectional statistical analyses of calcium balance data from metabolic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1054–1063. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.4.1054>
- Isaac, R.A., Kerber, J.D., 2015. Atomic Absorption and Flame Photometry: Techniques and Uses in Soil, Plant, and Water Analysis, in: Walsh, L.M. (Ed.), *Instrumental Methods for Analysis of Soils and Plant Tissue*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 17–37. <https://doi.org/10.2136/1971.instrumentalmethods.c2>
- ISO, 2005. Quality management system. Fundamentals and vocabulary. *Systèmes de management de la qualité. Principes essentiels et vocabulaire*.
- Jean Longtin, n.d. VÉRIFICATION ET VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES.
- Jorgensen, A.O., Shen, A.C., Campbell, K.P., 1985. Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *J. Cell Biol.* 101, 257–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.1.257>
- Katayev, A., Balciza, C., Seccombe, D.W., 2010. Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results: Is There a Better Way? *Am. J. Clin. Pathol.* 133, 180–186. <https://doi.org/10.1309/AJCPN5BMTSF1CDYP>
- Kiefer-Hecker, B., Kienzle, E., Dobenecker, B., 2018. Effects of low phosphorus supply on the availability of calcium and phosphorus, and musculoskeletal development of growing dogs of two different breeds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 789–798. <https://doi.org/10.1111/jpn.12868>
- Klemm, K.M., Klein, M.J., 2011. Biochemical Markers of Bone Metabolism, in: *Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Elsevier, pp. 193–209. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0974-2.00015-4>

- Koch, G.L.E., 1990. The endoplasmic reticulum and calcium storage. *BioEssays* 12, 527–531. <https://doi.org/10.1002/bies.950121105>
- Kramer, B., Tisdall, F.F., 1921. A SIMPLE TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF CALCIUM AND MAGNESIUM IN SMALL AMOUNTS OF SERUM. *J. Biol. Chem.* 47, 475–481. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86062-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86062-8)
- LAB GTA, 2004. Guide de validation des méthodes en biologie médicale.
- Lin, J., Idee, J.-M., Port, M., Diai, A., Berthommier, C., Robert, M., Raynal, I., Devoldere, L., Corot, C., 1999. Interference of magnetic resonance imaging contrast agents with the serum calcium measurement technique using colorimetric reagents. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, 931–943. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00188-0)
- Lumachi, F., 2012. Editorial [Hot Topic: Calcium Metabolism and Treatment of Hypercalcemia]. *Med. Chem.* 8, 549–550. <https://doi.org/10.2174/157340612801216175>
- MacLennan, D.H., Holland, P.C., 1975. Calcium Transport in Sarcoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 4, 377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.04.060175.002113>
- MacIntyre, I., 1961a. Flame Photometry, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60033-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60033-5)
- MacIntyre, I., 1961b. Flame Photometry, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60033-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60033-5)
- MAKANERA,, Yaya, 2015. Vérification des performances analytiques de l'automate G7 de TOSOH BIOSCIENCES pour le dosage de l'HbA1c et des hémoglobines A2 et F par HPLC au laboratoire de Biochimie de l'HMIMV.
- Maurya, V.K., Aggarwal, M., 2017a. Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *J. Food Sci. Technol.* 54, 3753–3765. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2840-0>
- Maurya, V.K., Aggarwal, M., 2017b. Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *J. Food Sci. Technol.* 54, 3753–3765. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2840-0>
- Medici, D., Razzaque, M.S., DeLuca, S., Rector, T.L., Hou, B., Kang, K., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Olsen, B.R., Lanske, B., 2008. FGF-23–Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D–induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 182, 459–465. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803024>
- Meissner, G., 1975. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 389, 51–68. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90385-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90385-5)
- Michaylova, V., Ilkova, P., 1971. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal. Chim. Acta* 53, 194–198. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80088-X)

- Mitlak, B.H., Daly, M., Potts, J.T., Schoenfeld, D., Neer, R.M., 2009. Asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.* 6, S103–S110. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650061422>
- Moe, S.M., 2016. Calcium Homeostasis in Health and in Kidney Disease, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1781–1800. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150052>
- Moorehead W, Briggs H.G, *Clin. Chem.*, 1974. Calcium methode CPC.
- Murray, T.M., Rao, L.G., Divieti, P., Bringhurst, F.R., 2005. Parathyroid Hormone Secretion and Action: Evidence for Discrete Receptors for the Carboxyl-Terminal Region and Related Biological Actions of Carboxyl-Terminal Ligands. *Endocr. Rev.* 26, 78–113. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0024>
- Muser, J., Bienvenu, J., Blanckaert, N., Brandslund, I., Delattre, J., Soffiati, G., Swaminathan, R., Maggini, S., Mastall, H., 2001. Inter-Laboratory Evaluation of the COBAS INTEGRA® 400 Analytical System. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2001.090>
- Nabeshima, Y., Imura, H., 2008. α -Klotho: A Regulator That Integrates Calcium Homeostasis. *Am. J. Nephrol.* 28, 455–464. <https://doi.org/10.1159/000112824>
- Nanda, S.K., 2014. Validation of Method Performance of pH, PCO₂ , PO₂ , Na⁺, K⁺ of Cobas b121 ABG Analyser. *J. Clin. Diagn. Res.* <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9218.4442>
- Nielsen, S.S., 2010. Complexometric Determination of Calcium, in: Nielsen, S.S. (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual*, Food Science Texts Series. Springer US, Boston, MA, pp. 61–67. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_8
- Norman, A.W., 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 491S-499S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.491S>
- Opas, M., Michalak, M., 1992. Calcium storage in nonmuscle tissues: is the retina special? *Biochem. Cell Biol.* 70, 972–979. <https://doi.org/10.1139/o92-141>
- Pedersen, P.L., Carafoli, E., 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146–150. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90071-5)
- Perrone, D., Monteiro, M., 2015. CHAPTER 5. The Chemistry of Calcium, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Food and Nutritional Components in Focus*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 67–74. <https://doi.org/10.1039/9781782622130-00067>
- Pravina, P., Sayaji, D., Avinash, M., 2013. Calcium and its Role in Human Body 4, 11.

- Ripoll, J.-P., 1976. Determination du calcium sérique par une technique utilisant le bleu de methylthymol. *Clin. Chim. Acta* 72, 133–139. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(76\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(76)90044-9)
- Risteli, J., Winter, W.E., Kleerekoper, M., Risteli, L., 2012. Bone and Mineral Metabolism, in: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier, pp. 1733–1801. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6164-9.00052-4>
- Robertson, W.G., Marshall, R.W., Walser, M., 1979a. Calcium Measurements in Serum and Plasma—Total and Ionized. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 11, 271–304. <https://doi.org/10.3109/10408367909105859>
- Robertson, W.G., Marshall, R.W., Walser, M., 1979b. Calcium Measurements in Serum and Plasma—Total and Ionized. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 11, 271–304. <https://doi.org/10.3109/10408367909105859>
- Root, A.W., Harrison, H.E., 1976. Recent advances in calcium metabolism. *J. Pediatr.* 88, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(76\)80719-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(76)80719-6)
- Sharan, K., Siddiqui, J.A., Swarnkar, G., Chattopadhyay, N., 2008. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J. Med. Res.* 127, 274–286.
- Somlyo, A.P., 1984. Cell physiology: Cellular site of calcium regulation. *Nature* 309, 516–517. <https://doi.org/10.1038/309516b0>
- Song, L., 2017a. Calcium and Bone Metabolism Indices, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–46. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.06.005>
- Song, L., 2017b. Calcium and Bone Metabolism Indices, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–46. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.06.005>
- Sun, S., Liu, F., Liu, G., Miao, J., Xiao, H., Xiao, J., Qiu, Z., Luo, Z., Tang, J., Cao, Y., 2018. Effects of casein phosphopeptides on calcium absorption and metabolism bioactivity *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct.* 9, 5220–5229. <https://doi.org/10.1039/C8FO00401C>
- Suzuki, Y., Pasch, A., Bonny, O., Mohaupt, M.G., Hediger, M.A., Frey, F.J., 2008. Gain-of-function haplotype in the epithelial calcium channel TRPV6 is a risk factor for renal calcium stone formation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1613–1618. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn048>
- Tisi, R., Martegani, E., Brandão, R.L., 2015. Total Cellular Ca²⁺ Measurements in Yeast Using Flame Photometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015, pdb.prot076869. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot076869>
- Titchenal, C.A., Dobbs, J., 2007. A system to assess the quality of food sources of calcium. *J. Food Compos. Anal.* 20, 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.013>
- Tsai, H.-C., Wu, S.-Y., Chang, L.-T., Peng, S., 2015. Calcium-activated gene transfection from DNA/poly(amic acid-co-imide) complexes. *Int. J. Nanomedicine* 1637. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76502>

- Uwitonze, A.M., Razzaque, M.S., 2018. Role of Magnesium in Vitamin D Activation and Function. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 118, 181. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2018.037>
- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, les membres de la commission, 1986. « validation de techniques » de la SFBC. Protocole de validation de techniques (Documents A et B) 679–745.
- Wang, Y., Dellatore, P., Douard, V., Qin, L., Watford, M., Ferraris, R.P., Lin, T., Shapses, S.A., 2016. High fat diet enriched with saturated, but not monounsaturated fatty acids adversely affects femur, and both diets increase calcium absorption in older female mice. *Nutr. Res.* 36, 742–750. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.03.002>
- Weaver, C.M., Peacock, M., 2019. Calcium. *Adv. Nutr.* 10, 546–548. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy086>
- Weiss, N., 2006. Neuronal voltage-gated calcium channels regulation by heterotrimeric G-proteins.
- Willis, J.B., 2006. Analysis of Biological Materials by Atomic Absorption Spectroscopy, in: Glick, D. (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1–67. <https://doi.org/10.1002/9780470110294.ch1>
- Winter, W.E., Pelletier, J.P.R., Harris, N.S., 2020. Calcium biology and disorders, in: *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 795–824. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00045-4>
- Xie, W., Han, Y., Li, F., Gu, X., Su, D., Yu, W., Li, Z., Xiao, J., 2020. Neuropeptide Y1 Receptor Antagonist Alters Gut Microbiota and Alleviates the Ovariectomy-Induced Osteoporosis in Rats. *Calcif. Tissue Int.* 106, 444–454. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00647-5>
- Xu, H., Liu, T., Hu, L., Li, J., Gan, C., Xu, J., Chen, F., Xiang, Z., Wang, X., Sheng, J., 2019. Effect of caffeine on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108650. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108650>
- Yang, J., Punshon, T., Guerinot, M.L., Hirschi, K.D., 2012. Plant Calcium Content: Ready to Remodel. *Nutrients* 4, 1120–1136. <https://doi.org/10.3390/nu4081120>
- Yun, H.-M., Park, K.-R., Hong, J.T., Kim, E.-C., 2016. Peripheral serotonin-mediated system suppresses bone development and regeneration via serotonin 6 G-protein-coupled receptor. *Sci. Rep.* 6, 30985. <https://doi.org/10.1038/srep30985>

Annexe 1 : Fiche technique de la méthode de dosage du calcium NM-BAPTA

000505 1482190 c50 1V5.0

CA2

Calcium Gen.2

cobas®**Urine**

Urine specimens should be collected in acid-washed bottles. 24-hour specimens should be collected in containers containing 20-30 mL of 6 mol/L HCl to prevent calcium salt precipitation. Precipitated calcium salts may not be completely dissolved by the addition of HCl following urine collection.⁴

Stability in serum/plasma:⁵

7 days at 15-25 °C
3 weeks at 2-8 °C
8 months at (-15)-(-25) °C

Stability in urine:⁵

2 days at 15-25 °C
4 days at 2-8 °C
3 weeks at (-15)-(-25) °C

Stored serum or urine specimens must be mixed well prior to analysis. Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay. See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Sample stability claims were established by experimental data by the manufacturer or based on reference literature and only for the temperatures/time frames as stated in the method sheet. It is the responsibility of the individual laboratory to use all available references and/or its own studies to determine specific stability criteria for its laboratory.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma**cobas c 311 test definition**

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 6-8 (STAT 3 / 6-8)
Wavelength (sub/main)	376/340 nm
Reaction direction	Decrease
Units	mmol/L (mg/dL)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	20 µL 160 µL
R2	20 µL -

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	3 µL	-	-
Decreased	3 µL	-	-
Increased	3 µL	-	-

cobas c 501/502 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 10-13 (STAT 3 / 10-13)
Wavelength (sub/main)	376/340 nm
Reaction direction	Decrease
Units	mmol/L (mg/dL)

Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	20 µL 160 µL
R2	20 µL -

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	3 µL	-	-
Decreased	3 µL	-	-
Increased	3 µL	-	-

Application for urine**cobas c 311 test definition**

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 6-8 (STAT 3 / 6-8)
Wavelength (sub/main)	376/340 nm
Reaction direction	Decrease
Units	mmol/L (mg/dL)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	20 µL 160 µL
R2	20 µL -

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	-	-
Decreased	4 µL	15 µL	135 µL
Increased	2 µL	-	-

cobas c 501/502 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 10-13 (STAT 3 / 10-13)
Wavelength (sub/main)	376/340 nm
Reaction direction	Decrease
Units	mmol/L (mg/dL)

Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	20 µL 160 µL
R2	20 µL -

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	-	-
Decreased	4 µL	15	135
Increased	2 µL	-	-

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration • after reagent lot change • as required following quality control procedures

00061482 190 c0715.0

CA2

Calcium Gen.2

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
05061482 190	Calcium Gen.2 (300 tests)	System-ID 07 7476 6 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401
10759350 360	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL, for USA)	Code 401
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300
12149435 160	Precinorm U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 300
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301
12149443 160	Precipath U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 301
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05947626 160	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL, for USA)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
05947774 160	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL, for USA)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For cobas c 311/501 analyzers:

CA2: ACN 698

S-CA2: ACN 699 (STAT, reaction time: 3)

For cobas c 502 analyzer:

CA2: ACN 8698

S-CA2: ACN 8699 (STAT, reaction time: 3)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of calcium in human serum, plasma and urine on Roche/Hitachi cobas c systems.

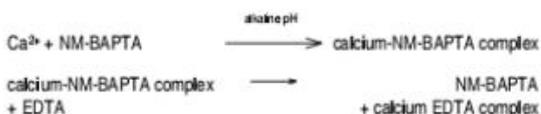
Summary¹

Calcium is the most abundant mineral element in the body with about 99 percent in the bones primarily as hydroxyapatite. The remaining calcium is distributed between the various tissues and the extracellular fluids where it performs a vital role for many life sustaining processes. Among the extra skeletal functions of calcium are involvement in blood coagulation, neuromuscular conduction, excitability of skeletal and cardiac muscle, enzyme activation, and the preservation of cell membrane integrity and permeability.

Serum calcium levels and hence the body content are controlled by parathyroid hormone (PTH), calcitonin, and vitamin D. An imbalance in any of these modulators leads to alterations of the body and serum calcium levels. Increases in serum PTH or vitamin D are usually associated with hypercalcemia. Increased serum calcium levels may also be observed in multiple myeloma and other neoplastic diseases. Hypocalcemia may be observed e.g. in hypoparathyroidism, nephrosis, and pancreatitis.

Test principle

Calcium ions react with 5-nitro-5'-methyl-BAPTA (NM-BAPTA) under alkaline conditions to form a complex. This complex reacts in the second step with EDTA.



The change in absorbance is directly proportional to the calcium concentration and is measured photometrically.

Reagents - working solutions

R1 CAPSO: 557 mmol/L; NM-BAPTA: 2 mmol/L; pH 10.0; non-reactive surfactant; preservative

R2 EDTA: 7.5 mmol/L; pH 7.3; non-reactive surfactant, preservative

4-[3-(6-oxoheptano-3-ylidene-5-propanoate)amino]benzoic acid

R1 is in position B and R2 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents. Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

For USA: Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

CA2

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on cobas c pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 6 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on cobas c pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum: Fresh serum collected in the fasting state is the preferred specimen.

Plasma: Li-heparin plasma.

Serum or plasma should be separated from blood cells as soon as possible, because prolonged contact with the clot may cause lower calcium values.² Sera from patients receiving EDTA (treatment of hypercalcemia) are unsuitable for analysis, since EDTA will chelate the calcium and render it unavailable for reaction with NM-BAPTA. Co-precipitation of calcium with fibrin (i.e. heparin plasma), lipids, or denatured protein has been reported with storage or freezing.^{1,3}

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Annexe 2 : Fiche technique de la méthode de dosage du calcium Arsenazo III

Calcium AS FS*

CODE CQN : TR

Réactif de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative du calcium dans le sérum, le plasma ou l'urine sur systèmes photométriques

Présentation

Références	Emballage coffret
1 1130 99 10 021	R 6 x 25 mL
1 1130 99 10 026	R 6 x 100mL
1 1130 99 10 023	R 1 x 1000 mL
1 1130 99 10 704	R 8 x 50 mL

Intérêt clinique [1,2]

Le calcium joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires : en intracellulaire, lors de la contraction musculaire et dans le métabolisme du glycogène ; en extracellulaire, dans la minéralisation osseuse, la coagulation et la transmission de l'influx nerveux. Le calcium est présent sous trois formes dans le plasma : libre, lié aux protéines ou complexé avec des anions comme les phosphates, les citrates ou les bicarbonates. Une diminution des concentrations en calcium est en rapport avec les maladies osseuses (en particulier l'ostéoporose), les affections rénales (notamment sous dialyse), les troubles de l'absorption intestinale et l'hypoparathyroïdie. Une augmentation des concentrations en calcium est observée dans l'hyperparathyroïdie, les affections malignes avec métastases et la sarcoidose. Le dosage du calcium peut aider au contrôle de la supplémentation calcique, en particulier dans la prévention de l'ostéoporose.

Méthode

Test colorimétrique « arsenazo III »

Principe

A pH neutre, le calcium forme avec l'arsénazo III un complexe bleu, dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en calcium.

L'addition d'acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique élimine l'interférence due au magnésium.

Réactifs

Composants et Concentrations

Réactif	Concentration
Tampon phosphate pH 7,5	50 mmol/L
Acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique	5 mmol/L
Arsénazo III	120 µmol/L

Préparation et Conservation des réactifs

Le réactif est stable jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée, conservé entre +2 °C et +8 °C en évitant toute contamination. Ne pas congeler le réactif !

Avertissements et précautions d'emploi

- Comme le calcium est un ion ubiquitaire, des précautions sont nécessaires pour éviter toute contamination accidentelle. Utiliser de préférence du matériel à usage unique.
- Des chélateurs, tel que EDTA peut empêcher la formation du complexe coloré.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (0,95 g/L) comme conservateur. Ne pas avaler ! Éviter le contact avec la peau et les membranes muqueuses.
- Dans de très rares cas, des spécimens de patients souffrant de gammopathie peuvent produire des valeurs faussées [7].
- Merci de vous référer aux fiches de sécurité et prendre les précautions nécessaires pour l'utilisation de réactifs de laboratoire. Pour le diagnostic, les résultats doivent toujours être exploités en fonction de l'historique médical du patient, des examens cliniques ainsi que des résultats obtenus sur d'autres paramètres.
- Uniquement à usage professionnel !

Élimination des déchets

Se référer aux exigences légales nationales.

Préparation des réactifs

Le réactif est prêt à l'emploi.

Matériels requis mais non fournis

Solution NaCl 9 g/L.

Équipement général de laboratoire.

Spécimen

Sérum, plasma recueilli sur héparine et urine

Ne pas utiliser de plasma recueilli sur EDTA.

Stabilité [5] :

Matériau	Stabilité	Température
dans le sérum/plasma	7 jours	entre 20 – 25 °C
	3 semaines	entre 4 – 8 °C
	8 mois	entre –20 °C
dans l'urine	2 jours	entre 20 – 25 °C
	4 jours	entre 4 – 8 °C
	3 semaines	à –20 °C

Ajouter 10 mL de concentré HCl aux urines de 24 h et chauffer l'échantillon pour dissoudre l'oxalate de calcium.

Éliminer les échantillons contaminés ! Congélation unique !

Mode opératoire

Des notices d'application adaptées aux systèmes automatisés sont disponibles sur demande.

Longueur d'onde	650 nm, Hg 623 nm (630–670 nm)
Trajet optique	1 cm
Température de mesure	+20 °C/+25 °C/+37 °C
Mesure	Contre le blanc réactif

	Blanc	Échantillon/Calibrant
Échantillon/Calibrant	-	10 µL
Eau distillée	10 µL	-
Réactif	1000 µL	1000 µL
Mélanger, incubé pendant 5 min. et lire l'absorbance contre le blanc réactif.		

Annexe 3 : Valeurs des niveaux de contrôles normaux (méthode Arsenazo)

TruLab N

LOT 27547



Cat. No. 5 9000 99 10 061 (6 x 5 mL)
5 9000 99 10 062 (20 x 5 mL)



2022-08

Updated sheets: www.diasys-diagnostics.com/service-area/value-sheets/

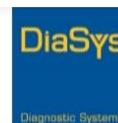
Value sheet version: 6

Short Name / Analyte	Method	Reagent ID	Value	Range	Unit
ALB	Bromcresol green	1 0220	3.63	2.80 - 4.46	g/dL
Albumin			36.3	28.0 - 44.6	g/L
AP	IFCC 37°C	1 0441	69.8	52.4 - 87.3	U/L
Alkaline phosphatase			1.16	0.873 - 1.45	µkat/L
	DGKC 1970 37°C	1 0401	112	84.0 - 140	U/L
			1.87	1.40 - 2.33	µkat/L
ALT/GPT	IFCC, with pyridoxal phosphate 37°C	1 2701 +	48.7	37.5 - 59.9	U/L
Alanine aminotransferase		2 5010	0.812	0.625 - 0.999	µkat/L
	without pyridoxal phosphate 37°C	1 2701	49.0	37.7 - 60.3	U/L
			0.817	0.629 - 1.00	µkat/L
AST/GOT	IFCC, with pyridoxal phosphate 37°C	1 2601 +	44.1	33.9 - 54.2	U/L
Aspartate aminotransferase		2 5010	0.734	0.565 - 0.903	µkat/L
	without pyridoxal phosphate 37°C	1 2601	42.4	32.7 - 52.2	U/L
			0.707	0.544 - 0.870	µkat/L
AMY	EPS G-7	1 0501	70.6	56.5 - 84.7	U/L
Amylase			1.18	0.941 - 1.41	µkat/L
PAMY	EPS G-7	1 0551	27.0	21.6 - 32.4	U/L
Pancreatic amylase			0.449	0.359 - 0.539	µkat/L
APOA1	Immunoturbidimetric	1 7102	131	105 - 157	mg/dL
Apolipoprotein A1			1.31	1.05 - 1.57	g/L
APOB	Immunoturbidimetric	1 7112	72.6	58.1 - 87.1	mg/dL
Apolipoprotein B			0.726	0.581 - 0.871	g/L
BILE	Enzymatic cycling method	1 2238	9.72	7.77 - 11.7	µmol/L
Total Bile Acids					
DBIL	DCA	1 0821	0.697	0.516 - 0.878	mg/dL
			11.9	8.82 - 15.0	µmol/L
	Jendrassik-Grof	1 0849	0.670	0.496 - 0.845	mg/dL
Direct Bilirubin			11.5	8.48 - 14.4	µmol/L
TBIL	DCA	1 0811	1.47	1.09 - 1.85	mg/dL
			25.1	18.6 - 31.7	µmol/L
	Jendrassik-Grof	1 0849	1.65	1.22 - 2.08	mg/dL
Total Bilirubin			28.3	20.9 - 35.6	µmol/L
CA	Arsenazo	1 1130	1.94	1.73 - 2.16	mmol/L
Calcium			7.79	6.93 - 8.65	mg/dL
	Phosphonazo	1 1181	2.07	1.84 - 2.30	mmol/L
			8.31	7.39 - 9.22	mg/dL
CL	Colorimetric	1 1221	108	98.1 - 118	mmol/L
Chloride			382	348 - 417	mg/dL
CHOL	CHOD-PAP	1 1300 +	156	134 - 178	mg/dL
		1 1350	4.04	3.47 - 4.60	mmol/L
CHE	Butyrylthiocholin	1 1401	6178	5066 - 7290	U/L
Cholinesterase			103	84.4 - 122	µkat/L
CK	DGKC, IFCC 37°C	1 1601	152	122 - 182	U/L
			2.53	2.03 - 3.04	µkat/L
Creatine kinase					

Annexe 4 : Valeurs des niveaux de contrôles pathologique (méthode Arsenazo)

TruLab P

LOT 27548



Cat. No. 5 9050 99 10 061 (6 x 5 mL)
5 9050 99 10 062 (20 x 5 mL)



2022-08

Updated sheets: www.diasys-diagnostics.com/service-area/value-sheets/

Value sheet version: 5

Short Name / Analyte	Method	Reagent ID	Value	Range	Unit
ALB	Bromcresol green	1 0220	5.04	3.88 - 6.20	g/dL
Albumin			50.4	38.8 - 62.0	g/L
AP	IFCC 37°C	1 0441	193	145 - 241	U/L
Alkaline phosphatase	DGKC 1970 37°C	1 0401	3.22	2.41 - 4.02	µkat/L
			285	214 - 356	U/L
			4.75	3.56 - 5.94	µkat/L
ALT/GPT	IFCC, with pyridoxal phosphate 37°C	1 2701 +	120	92.5 - 148	U/L
Alanine aminotransferase		2 5010	2.00	1.54 - 2.46	µkat/L
	without pyridoxal phosphate 37°C	1 2701	119	91.6 - 146	U/L
			1.98	1.53 - 2.44	µkat/L
AST/GOT	IFCC, with pyridoxal phosphate 37°C	1 2601 +	164	126 - 201	U/L
Aspartate aminotransferase		2 5010	2.73	2.10 - 3.36	µkat/L
	without pyridoxal phosphate 37°C	1 2601	167	129 - 206	U/L
			2.79	2.15 - 3.43	µkat/L
AMY	EPS G-7	1 0501	227	181 - 272	U/L
Amylase			3.78	3.02 - 4.53	µkat/L
PAMY	EPS G-7	1 0551	111	88.6 - 133	U/L
Pancreatic amylase			1.85	1.48 - 2.21	µkat/L
APOA1	Immunoturbidimetric	1 7102	193	154 - 232	mg/dL
Apolipoprotein A1			1.93	1.54 - 2.32	g/L
APOB	Immunoturbidimetric	1 7112	104	83.2 - 125	mg/dL
Apolipoprotein B			1.04	0.832 - 1.25	g/L
BILE	Enzymatic cycling method	1 2238	38.7	31.0 - 46.5	µmol/L
Total Bile Acids					
DBIL	DCA	1 0821	1.65	1.22 - 2.08	mg/dL
Direct Bilirubin			28.3	20.9 - 35.6	µmol/L
	Jendrassik-Grof	1 0849	2.04	1.51 - 2.57	mg/dL
			34.9	25.8 - 43.9	µmol/L
TBIL	DCA	1 0811	4.61	3.41 - 5.80	mg/dL
Total Bilirubin			78.7	58.3 - 99.2	µmol/L
	Jendrassik-Grof	1 0849	5.04	3.73 - 6.35	mg/dL
			86.2	63.8 - 109	µmol/L
CA	Arsenazo	1 1130	3.04	2.71 - 3.37	mmol/L
Calcium			12.2	10.8 - 13.5	mg/dL
	Phosphonazo	1 1181	3.10	2.76 - 3.44	mmol/L
			12.4	11.1 - 13.8	mg/dL
CL	Colorimetric	1 1221	146	132 - 159	mmol/L
Chloride			516	470 - 563	mg/dL
CHOL	CHOD-PAP	1 1300 +	218	187 - 248	mg/dL
Cholesterol		1 1350	5.64	4.85 - 6.42	mmol/L
CHE	Butyrylthiocholin	1 1401	9126	7483 - 10769	U/L
Cholinesterase			152	125 - 179	µkat/L
CK	DGKC, IFCC 37°C	1 1601	234	187 - 280	U/L
Creatine kinase			3.89	3.12 - 4.67	µkat/L

Annexe 5 : Tableau des résultats de dosage de la calcémie (Arsénazo/BAPTA)

Ech	BAPTA	Arsénazo
01	2.19	2.11
02	2.41	2.60
03	2.37	2.44
04	2.09	2.20
05	2.35	2.27
06	2.34	2.31
07	2.22	2.17
08	2.29	2.38
09	2.31	2.50
10	2.52	2.64
11	2.56	2.38
12	2.23	2.27
13	2.28	2.37
14	2.30	2.38
15	2.17	2.21
16	2.30	2.43
17	2.37	2.28
18	2.23	2.27
19	2.05	1.97
20	2.43	1.97
21	2.28	2.39
22	2.16	1.09
23	4.39	4.05
24	2.27	2.25
25	2.95	2.74
26	2.24	2.37
27	1.97	1.43
28	2.57	2.34
29	2.47	2.47
30	1.98	Hémolysé
31	2.35	2.50

Annexe 6 : Tableau des répétitions des contrôles Normales/Pathologique

Contrôle	BAPTA	Arsénazo III
Contrôle normale	2.24	1.86
	2.25	2.21
	2.26	1.98
	2.26	1.90
	2.25	2.25
	2.15	1.88
Contrôle Pathologique	3.43	2.89
	3.39	3.25
	3.36	3.12
	3.38	3.08
	3.35	3.02
	3.26	2.89

Annexe 7 : Tableau des contrôles (Normales/Pathologique) des 3 jours

Jour(s)	BAPTA			Arsénazo III		
	J 01	J 02	J 03	J 01	J 02	J 03
Niveau 01 (Normale)	2.36	2.24	2.16	1.86	1.98	2.21
Niveau 02 (Pathologique)	3.21	3.17	3.22	3.22	3.04	

Annexe 8 : Annexe de Biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques

Tableau 3. Limites d'acceptabilité proposées

1	2	3	4	5			6	7			8			9		
				Niveaux			Inter- valle %	Répétabilité CV %			Reproductibilité CV %			Justesse %		
				Bas	Moyen	Élevé		Bas	Moyen	Élevé	Bas	Moyen	Élevé	Bas	Moyen	Élevé
Dosages plasmatiques																
Acide urique	µmol/l	10-1 000	150-500	150	300	450	15	2,7	2,4	2,1	3,6	3,2	2,8	7,1	6,2	5,3
Ammonium	µmol/l	1-1 000	10-50	50	100	200	20	5,3	4,5	3,8	7,0	6,0	5,0	7,1	6,7	6,2
Bicarbonates	mmol/l	5-50	20-29	10	20	30	15	7,5	6,0	4,5	10,0	8,0	6,0	6,6	6	5,3
Bilirubine	µmol/l	5-400	5-17	15	50	150	15	5,1	4,2	3,2	6,8	5,6	4,2	13,4	10,6	11,2
Calcium ionisé	mmol/l	0,20-5,00	1,05-1,30	0,60	1,00	1,50	10	1,2	1,2	1,2	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7
Calcium total	mmol/l	0,50-5,00	2,25-2,60	1,80	2,40	3,40	4	1,2	1,2	1,2	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7
Chlorure	mmol/l	96-108	80	105	120		4	1,2	1,2	1,2	1,6	1,6	1,6	1,9	1,9	1,9
Cholestérol	mmol/l	0,5-10,0	3,2-6,5	3,0	5,0	8,0	10	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	5,7	5,7	5,7
Chol. HDL	mmol/l	0,2-5,0	1,0-2,0	0,8	1,4	2,2	10	4,5	4,5	4,5	6,0	6,0	6,0	8	8	8
Créatinine	µmol/l	10-1 000	60-110	50	140	590	10	4,5	3,4	1,8	6,0	4,5	2,4	8	7,8	7,6
Fer	µmol/l	0,5-100,0	9,0-30,0	5,0	20,0	40,0	15	6,0	3,8	3,0	8,0	5,0	4,0	12,7	8,7	6,9
Ferritine	µg/l	2-1 500	10-350	20	200	800	20	7,5	6,0	6,0	10,0	8,0	8,0	8,3	6	6
Folates	µg/l	0-20	2-9	1	4	15	20	7,5	6,0	6,0	10,0	8,0	8,0	11	8,9	8,9
Fructosamines	µmol/l	10-1 000	200-265	200	400	600	10	3,8	3,8	3,8	5,0	5,0	5,0	8,7	7,5	6,2
Glucose	mmol/l	0,5-50,0	4,0-5,8	2,0	6,0	16,0	10	2,4	1,8	1,2	3,2	2,4	1,6	5,1	4,4	3,7
Hb A1c	%	1,0-15,0	3,5-6,5	4,0	7,0	10,0	10	3,8	3,8	3,8	5,0	5,0	5,0	6,2	6,2	6,2
Lactate	mmol/l	0,2-15,0	0,4-2,0	1,0	3,0	8,0	20	3,8	3,8	3,8	5,0	5,0	5,0	8,7	8,7	8,7
Magnésium	mmol/l	0,10-4,00	0,70-1,00	0,50	0,90	1,60	10	3,0	2,4	2,4	4,0	3,2	3,2	4,5	5,1	5,1
Phosphates	mmol/l	0,20-5,00	0,60-1,50	0,50	1,50	3,00	10	3,0	2,5	1,8	4,0	3,3	2,4	3,9	4,5	5,1
Potassium	mmol/l	0,5-10,0	3,5-5,0	2,0	4,0	6,0	8	1,5	1,2	1,2	2,0	1,6	1,6	2,9	3,1	3,1
Protéines tot.	g/l	20-120	60-76	40	65	90	6	2,4	1,8	1,8	3,2	2,4	2,4	3,8	3,8	3,2
Sodium	mmol/l	50-180	135-145	120	140	160	3	1,0	0,8	0,7	1,3	1,1	0,9	1,5	1,4	1,3
Triglycérides	mmol/l	0,20-15,00	0,40-1,80	0,50	1,50	3,00	15	4,2	3,6	3,6	5,6	4,8	4,8	8,3	6,4	6,4
Urée	mmol/l	0,5-50,0	2,5-7,5	2,5	10,0	25,0	15	4,5	3,0	1,9	6,0	4,0	2,5	10,4	6,9	4,3
Dosages urinaires																
Acide urique	mmol/l	0,1-5,0	1,5-4,5	0,5	1,5	4,0	15	4,5	3,8	3,0	6,0	5,0	4,0	10,4	8,7	6,9
Calcium	mmol/l	0,1-5,0	1,5-7,5	1,0	2,5	4,0	10	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	10	10	10
Chlorure	mmol/l	10-175	26-130	30	80	140	10	3,8	3,0	2,3	5,0	4,0	3,0	8,7	4,5	4
Créatinine	mmol/l	0,5-25	8-18	1	8	20	10	4,5	3,8	3,8	6,0	5,0	5,0	8	6,2	6,2
Glucose	mmol/l	0,5-70,0	< 0,1	1,0	10,0	30,0	10	4,5	3,8	3,8	6,0	5,0	5,0	5,3	4,9	6,2
Magnésium	mmol/l	0,5-10,0	3,0-5,0	0,5	2,0	6,0	10	4,5	4,5	4,5	6,0	6,0	6,0	8	8	8
Microalbumine (1)	mg/l	2-500	< 10	20	50	100	10	6,0	4,5	4,5	8,0	6,0	6,0	8,9	8	8
Phosphates	mmol/l	0,9-40,0	10,0-30,0	2,0	10,0	20,0	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	10,4	8	6,2
Potassium	mmol/l	2-300	25-130	20	100	200	10	3,8	3,8	3,0	5,0	5,0	4,0	4,9	4,9	4,5
Protéines	g/l	0,10-2,00	< 0,15	0,20	0,60	1,20	10	6,8	5,3	3,8	9,0	7,0	5,0	17,9	13,3	8,7
Sodium	mmol/l	5-300	20-200	20	100	200	10	3,8	3,8	3,0	5,0	5,0	4,0	4,9	4,9	4,5
Urée	mmol/l	10-600	100-500	10	150	350	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
Enzymes																
5' nucléotidase	U/l	0-50	0-5	10	20	50	15	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
α-amylase	U/l	0-500	< 80	50	150	400	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
ALAT 37 °C	U/l	0-800	10-65	20	50	200	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
ASAT 37 °C	U/l	0-800	10-45	20	50	200	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
CK 37 °C	U/l	0-500	30-160	50	100	400	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
GGT 37 °	U/l	0-800	10-65	20	50	390	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
LDH 37 °	U/l	0-1 200	210-450	150	300	900	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
Lipase (turbidimétrie)	U/l	0-700	50-190	80	200	400	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
(colorimétrique)	37°	0-300	7-60													
PAL 37 °	U/l	1-1 000	40-110	20	50	390	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	8	6,7	6,2
Immunochimie																
α1-antitrypsine	g/l	0,5-10	1,5-4	1	2	4	10	4,5	4,5	3,8	6,0	6,0	5,0	10,4	10,4	8,7
α2-macroglobuline	g/l	0,5-10	1,5-3,5	1	2	4	10	4,5	3,8	3,0	6,0	5,0	4,0	5,3	6,2	6,9
Albumine	g/l	5-100	35-55	20	30	50	10	4,5	3,8	3,0	6,0	5,0	4,0	5,3	6,2	6,9
ApoA1	g/l	0,2-3	1,1-2,2	0,5	1,5	2	10	6,0	4,5	3,8	8,0	6,0	5,0	12,7	10,4	10,9