

## Article original

# Validation d'une méthode de dosage du cuivre dans le sérum par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique

## *Validation of an electrothermic atomic absorption spectrometry method for dosage of copper in serum*

Carine Garcia Hejl<sup>1\*</sup>, Hélène Thefenne Astier<sup>1</sup>, Aurélie Servonnet<sup>1</sup>, José Manuel Ramirez<sup>1</sup>

Hôpital d'Instruction des Armées du Val de Grâce - Laboratoire de Biochimie, 74 boulevard de Port Royal, 75005 Paris, France

**Résumé – Objectif :** Un déséquilibre du métabolisme du cuivre est à l'origine de maladies génétiques graves ; la maladie de Menkès lors de déficits en cuivre et la maladie de Wilson caractérisée par une surcharge en cet oligo-élément. Le diagnostic des ces pathologies implique le dosage du cuivre sérique et urinaire par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE). Nous décrivons ici le protocole de validation de notre technique de dosage du cuivre sérique par SAA. **Méthode :** Nous avons appliqué un protocole recommandé par la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP). **Résultats :** Ce protocole nous a permis de tester la linéarité, la fidélité et l'exactitude de notre méthode et de définir le domaine de linéarité ainsi que les limites de détection et de quantification. **Conclusion :** L'étude réalisée a permis de valider la méthode de dosage utilisée au laboratoire.

**Mots clés :** Cuivre, SAA, validation

**Abstract – Objectives:** Several severe hereditary human disorders of copper regulatory mechanisms have been identified; they result in copper deficiency (Menkes disease) or in copper overload (Wilson disease). Diagnosis relies on determination of copper in serum and urine. Dosage of copper can be performed by electrothermic atomic absorption spectrometry (EAAS). This article describes how this method has been validated. **Method:** Protocol used is recommended by the French Pharmaceutical Society (SFSTP). **Results:** These guidelines allow us to show that this method is accurate and precise and to define its limits of detection and quantification. **Conclusion:** Dosage of copper in serum has been validated.

**Key words:** Copper, EAAS, validation

Reçu le 13 janvier 2009, accepté après modifications le 25 mars 2009  
Publication en ligne le 5 mai 2009

## 1 Introduction

Le cuivre est un oligo-élément essentiel, mais qui peut être toxique à fortes doses. Un déséquilibre de son métabolisme est à l'origine de maladies génétiques graves, en particulier les maladies de Menkès et de Wilson. Par ailleurs, le cuivre est très utilisé dans l'industrie, d'où la possibilité de certaines intoxications professionnelles.

La maladie de Menkes est une maladie rare liée à l'X [1]. Elle est caractérisée par un déficit général en cuivre par défaut d'absorption intestinale, consécutive à une activité diminuée ou abolie de sa protéine de transport ATP7A. Les premières manifestations cliniques apparaissent vers le deuxième mois [1]. Dans la forme classique, les principaux signes cliniques observés sont des troubles neurologiques avec un re-

tard mental sévère, un retard de croissance, diverses anomalies touchant les os, la peau, la morphologie du visage et les cheveux. Le traitement consiste en l'administration de cuivre par voie parentérale. La détérioration neurologique est progressive et la mort survient dans l'enfance (le plus souvent avant la troisième année). La maladie de Wilson est une maladie autosomique récessive, caractérisée par une accumulation toxique de cuivre par défaut d'excrétion biliaire. Le principal gène responsable code pour la protéine de transport ATP7B situé sur le chromosome 13 [2]. Seuls les sujets homozygotes sont symptomatiques. La majorité des patients présentent les premiers signes entre 5 et 35 ans. Les manifestations cliniques sont très polymorphes avec principalement des atteintes hépatiques ou neurologiques. Des troubles psychiatriques, rénaux, cardiaques sont également décrits. Le traitement consiste en l'administration de sels de zinc ou d'un agent chélateur du cuivre (D penicillamine, trientine) [2]. Le diagnostic de ces

\* Correspondance : Carine Garcia Hejl, [carinegarcia92@wanadoo.fr](mailto:carinegarcia92@wanadoo.fr)

**Tableau I.** Principaux paramètres biologiques en dehors du dépistage génétique.

Paramètres biologiques	cuivre sérique	cuivre urinaire	céruleoplasmine
Maladie de Menkès	abaissé	abaissé	abaissée
Maladie de Wilson	abaissé	augmenté	abaissée

**Tableau II.** Programmation de température.

Étapes	température °C	palier s	montée °C/s	gaz inerte	débit gaz L/min
Séchage	90	10	5	argon	0,3 L/min
Séchage	110	5	2	argon	0,2 L/min
Minéralisation	500	2	50	argon	0,2 L/min
Minéralisation	800	10	100	argon	0,2 L/min
Atomisation	2400	4	0	argon	arrêt
Nettoyage	2500	3	0	argon	0,3 L/min

**Tableau III.** Principe de la validation statistique.

Linéarité	Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro
	Test d'homogénéité des variances (Cochran)
	Test de l'existence de la pente (Fisher)
	Validité des ajustements (Fisher)
Fidélité	Test d'homogénéité des variances (Cochran)
	Études des variances de répétabilité, de reproductibilité
Exactitude	Dosage d'échantillons de contrôles
Limite de quantification (LQ)	Vérification des critères de fidélité et exactitude
Limite de détection	Détermination à partir de la LQ

maladies n'est pas toujours aisé : seul le génotypage permet de poser le diagnostic avec certitude mais les mutations décrites sont nombreuses (plus de 300) et ne peuvent être recherchées de façon systématique. Les mutations les plus fréquentes sont étudiées en priorité, comme H1069Q chez les caucasiens ou R778L chez les asiatiques pour la maladie de Wilson. L'exploration du métabolisme du cuivre est un donc un élément important du diagnostic et du suivi thérapeutique (tableau I). L'objectif de ce travail est de valider cette méthode de quantification du cuivre dans le sérum par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Cette étude a été réalisée à l'occasion du renouvellement de l'appareil de SAA du laboratoire.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Réactifs et consommables :

Les réactifs utilisés sont tous de pureté analytique :

- acide nitrique Normapur 69 % (VWR®);
- solution standard de nitrate de cuivre 1g/L CertiPUR MERCK® ;
- eau distillée ;
- contrôles de qualité : SERONORM®, Lyphochek assayed chemistry control BIORAD® niveaux 1 et 2, contrôles E0607 et E0704 de l'Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ).

Les fioles jaugées utilisées sont en polypropylène de classe B (fioles Nalgène®).

### 2.2 Méthode

Le spectromètre d'absorption atomique est de type M series Atomic Absorption Spectrometer de la société THERMO Electron Corporation®. Il est équipé d'un passeur automatique. Les mesures sont effectuées en triplicate à 324,7 nm, longueur d'onde de mesure spécifique du cuivre. Le signal est quantifié en hauteur. Le four utilisé est un four graphite enrobé (type ELC). La correction de fond est réalisée à l'aide d'une lampe au deutérium. Le programme de température est indiqué dans le tableau II. Les échantillons comme les contrôles de qualité interne sont dilués au 1/10 en godet polypropylène, sans extraction préalable (100 µL de sérum + 900 µL d'eau distillée), puis une dilution au tiers est réalisé par l'automate.

La quantification est réalisée à l'aide d'une gamme d'étalonnage externe à partir d'une gamme synthétique dans l'eau distillée. En effet, l'effet matrice est minime puisque l'échantillon est dilué au final au 1/33 dans l'eau. Cette méthode déjà en place au laboratoire sur le précédent appareil de SAA présentait des résultats de contrôle de qualité satisfaisant au regard notamment des exigences de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC).

### 2.3 Protocole de validation

Les différents paramètres étudiés sont ceux définis dans la norme SFSTP [3] (tableau III).

**Tableau IV.** Gamme d'étalonnage.

Volumes $\mu\text{L}$	blanc C0	sérum dilué	C1	C2	C3	C4	C5
Eau	10	7	8	6	4	2	0
Échantillon	0	3	0	0	0	0	0
Solution F2	0	0	2	4	6	8	10
volume total	10	10	10	10	10	10	10

### Étude de la linéarité

La linéarité d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain domaine, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte à doser. Le modèle étudié est un modèle linéaire de type  $y = ax + b$ .

Le protocole employé consiste à préparer 3 séries ( $i = 1$  à  $n$  avec  $n = 3$ ) de cinq ( $j$  de 1 à  $p$  avec  $p = 5$ ) niveaux de concentrations C1 à C5 (10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g/L}$ ) de cuivre dans de l'eau distillée et un blanc réactif (C0). Les solutions sont préparées à partir de la solution mère de nitrate de cuivre à 1g/L CertiPUR. Cette solution mère est diluée au 1/100 (solution fille F1 à 10  $\mu\text{g/L}$ ) puis une deuxième solution fille F2 à 50  $\mu\text{g/L}$  est préparée par dilution au 1/200 de la solution F1. La gamme d'étalonnage est ensuite préparée par l'appareil selon le protocole mentionné dans le tableau IV. Pour chacune des trois séries, les solutions F1 et F2 ont été refaites extemporanément. Les trois gammes sont préparées et injectées successivement. Les droites d'étalonnage sont tracées pour chacune des gammes.

### Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro

L'inégalité suivante va permettre d'établir la corrélation de la droite avec zéro :

$$\frac{|b|}{S_b} < t(\alpha; N - 2) \text{ soit } 2,16 \text{ pour } \alpha = 5\%$$

avec  $S_b$  = écart type de l'ordonnée à l'origine.

### Test d'homogénéité des variances (Cochran)

L'objectif de ce test est de vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale et ainsi de détecter la présence de valeurs suspectes. Le critère à utiliser est :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum S_j^2} \text{ avec } j = 1 \text{ à } p$$

avec  $S_{\max}^2$ , la variance la plus élevée des groupes  $j$  et  $S_j^2$  : variance de groupe  $j$  (sur 3 valeurs). L'inégalité  $C < C(\alpha; p; n - 1)$  doit être vérifiée, avec  $p = 5$ ,  $n = 3$ ,  $\alpha = 5\%$  soit **0,68**.

### Test de l'existence de la pente (Fisher)

Il faut prouver que la pente de la droite n'est pas seulement due à la variance résiduelle, mais que la droite possède une pente qui lui est propre (variance de régression  $S_i^2 >$  variance résiduelle  $S_R^2$ ).

La vérification de l'existence d'une pente significative est établie à l'aide du test de Fisher en montrant que les variances  $S_i^2$  et  $S_R^2$  sont significativement différentes au risque  $\alpha$  (5 %) :

$$F_1 = \frac{S_i^2}{S_R^2} > F(\alpha; 1; N - 2) = \mathbf{4,67}.$$

### Test de validité des ajustements ou de la droite de régression (Fisher)

L'objectif est vérifier que les variances  $S_L^2$  de l'erreur de régression (erreur de modèle) et  $S_E^2$  de l'erreur expérimentale (variation à l'intérieur de chaque niveau) ne sont significativement pas différentes au seuil de risque  $\alpha$  choisi (5 %) :

La validité de la droite de régression est représentée par  $F_2$  :

$$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2}.$$

La table de Fisher donne  $F(\alpha; p - 2; N - p)$  soit (0,05, 3, 10) = **3,71**.

### Étude de la fidélité

La fidélité de la méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de prises d'essai multiples d'un même échantillon sérique, dans des conditions prescrites. Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité. La répétabilité est évaluée en faisant analyser un même échantillon, plusieurs fois par un même opérateur, dans un court intervalle de temps avec des conditions opératoires constantes. La condition de reproductibilité est vérifiée en faisant effectuer les manipulations par des opérateurs différents sur le même appareillage à des moments différents avec la même méthode sur un échantillon initial homogène. Pour cette étude, un même échantillon de contrôle SERONORM® titré à 1250  $\mu\text{g/L}$  (19,7  $\mu\text{mol/L}$ ) est analysé à 6 reprises par 3 opérateurs différents. La valeur moyenne et les CV de répétabilité et de reproductibilité sont calculés. Ils doivent être respectivement inférieurs à 10 % et 20 %. L'homogénéité des variances est vérifiée au préalable par un test de Cochran.

### Calcul de la variance de répétabilité :

$$S_r^2 = \sum S_j^2 / 3 \text{ avec } j \text{ de } 1 \text{ à } 3.$$

### Calcul de la variance de reproductibilité $S_R^2$ :

$$S_g^2 = \frac{\sum (M_j - \bar{M})^2}{p - 1} - \frac{S_r^2}{n}$$

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2$$

avec  $M_j$  = moyenne des groupes,  $\bar{M}$  = Moyenne des  $M_j$ .

### Étude de l'exactitude

Pour vérifier l'exactitude de notre méthode, nous avons réalisé 6 dosages d'un contrôle externe SFBC titré à 700,63  $\mu\text{g/L}$  (11  $\mu\text{mol/L}$ ) par quatre opérateurs différents (soit un total de 24 valeurs). La valeur moyenne et le CV sont ensuite calculés.

**Tableau V.** Résultats obtenus pour l'étude de linéarité.

	Cuivre sérique	Valeurs théoriques des constantes statistiques au risque 5 %
Pente de la droite d'ajustement	0,006	
Ordonnée à l'origine de la droite d'ajustement	0,00707	
Coefficient de corrélation	0,996	
Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro	1,463 (NS)	$t(0,05; 13)$ = 2,16
Test d'homogénéité des variances (Cochran)	0,437 (NS)	$C(0,05; 5; 2)$ = 0,68
Test de l'existence de la pente (Fisher)	1697,84 (HS)	$F(0,05; 1; 13)$ = 4,67
Validité des ajustements (Fisher)	0,57 (NS)	$F(0,05; 3; 10)$ = 3,71

**Tableau VI.** Étude de la fidélité.

	Résultats trouvés	Exigence en objectif
Test d'homogénéité des variances (Cochran)	0,44 (NS)	$C < 0,696$
CV de répétabilité	1,32 %	< 10%
CV de reproductibilité	5,77 %	< 20%

**Tableau VII.** Limite de quantification. Moyenne : 262,5.

	Résultats trouvés	Exigence en objectif
Critère de Fidélité	19,94 %	< 20%
Critère de Justesse	4,95 %	< 10%

### Limites de détection et de quantification

La limite de quantification (LQ) est la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement avec une variabilité définie. Pour la déterminer, 10 solutions contenant 200 µg/L (valeur choisie arbitrairement en fonction des données cliniques et analytiques) sont préparées puis analysées. La concentration théorique est obtenue de la droite de régression réalisée lors de l'évaluation. La LQ choisie est valide si elle satisfait les critères de fidélité et d'exactitude définis comme suit :

#### Critère de fidélité :

$$CV = S_{LQ}/LQ.$$

#### Critère d'exactitude :

$$\frac{LQ - \bar{x}_{LQ}}{S_{LQ}/n^{1/2}}$$

avec  $x_{LQ}$  = moyenne calculée.

$S_{LQ}$  : écart type, LQ : concentration théorique testée.

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité d'un analyte, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée). Elle est obtenue en divisant par trois la limite de quantification validée.

### 3 Résultats

L'ensemble de l'étude de linéarité permet de conclure à la validité du modèle choisi. La droite d'ajustement obtenue à partir des trois séries a pour équation  $y = 0,006x + 0,00707$ . Son coefficient de corrélation est de 0,996. La droite possède une pente propre ( $F_1 > 4,67$ ) avec une ordonnée à l'origine passant bien par zéro ( $t < 2,16$ ). Les ajustements sont valides ( $F_2 < 3,71$ ). L'ensemble des variances est considéré comme homogène ( $C < 0,68$ ). Les résultats sont consignés dans le tableau V. L'étude de fidélité a permis de montrer que cette méthode est répétable et reproductible (tableau VI). La valeur moyenne de l'échantillon analysé est de 1279 µg/L (20,1 µmol/L) pour une valeur cible à 1250 µg/L (19,7 µmol/L).

Pour l'évaluation de l'exactitude, la valeur moyenne des 24 déterminations est de 717,25 µg/L (11,3 µmol/L). Le coefficient de variation (CV) est de 9,4 %, ce qui est acceptable au regard des recommandations des experts définissant que le CV doit être inférieur à 12 % [4].

La limite de quantification testée est de 200 µg/L (3,15 µmol/L) soit une limite de détection de 67 µg/L (1,05 µmol/L) (tableau VII).

### Discussion

L'étude réalisée a permis de valider la méthode de dosage utilisée au laboratoire. La méthode proposée est linéaire,

répétable et reproductible avec des CV acceptables au regard des recommandations des experts. Les limites de détection et de quantification sont tout à fait adaptées aux valeurs plasmatiques usuelles (700 à 1500 µg/L soit 11–23,6 µmol/L chez l'adulte) mais aussi aux concentrations plasmatiques retrouvées en cas de pathologies ou d'exposition professionnelle. Enfin, la méthode proposée est simple à réaliser : aucune extraction préalable n'est nécessaire et il s'agit d'une gamme synthétique dans l'eau.

## Conclusion

La méthode de dosage utilisée au laboratoire a été validée à l'aide du protocole préconisé par la SFSTP. En l'absence de guide de validation pour les méthodes de dosage en spectrométrie d'absorption atomique, ce protocole a permis de tester les performances analytiques de notre méthode. Néanmoins, la participation à un programme d'évaluation externe de la qualité, comme ceux proposés par la SFBC et l'INSPQ, est indispensable pour un suivi des performances de la méthode et garantir la qualité des résultats.

*Remerciements.* Sophie Allorant, Valérie Annabi, Frédéric Porcu et Olivier Sépot.

## Références

1. Cordier-Alex MP. La maladie de Menkès. Encyclopédie Orphanet, mars 2003. <http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-menkes.html>
2. Duclos-Vallée JC, Ichai P, Misrahi M, Woimant F. La maladie de Wilson. Rev Prat. 2006; 56: 469-474.
3. Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guillauteau M, Histe M, Lallier M, N'Guyen-Huu JJ, Russoto R. Guide de validation analytique : rapport d'une commission SFSTP-I méthodologie ; STP Pharma pratiques 1992; 2: 205-226.
4. Arnaud J, Weber JP, Weykamp CW, Parsons PJ, Angerer J, Mairiaux E, Mazarrasa O, Valkonen S, Menditto A, Patriarca M, Taylor A. Quality specifications for the determination of copper, zinc, and selenium in human serum or plasma: evaluation of an approach based on biological and analytical variation. Clin Chem. 2008; 54: 1892-1899.