HAL
open science

Développement d'une méthode de référence candidate pour la quantification de la procalcitonine dans le sérum humain

Huu Hien Huynh

To cite this version:

Huu Hien Huynh. Développement d'une méthode de référence candidate pour la quantification de la procalcitonine dans le sérum humain. Chimie analytique. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLS037 . tel-03336568

HAL Id: tel-03336568

https://pastel.hal.science/tel-03336568

Submitted on 7 Sep 2021

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

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

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'ESPCI Paris
Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique
Ecole Nationale de Physique et de Chimie Industrielle de la ville de Paris

Développement d'une méthode de référence candidate pour la quantification de la procalcitonine dans le sérum humain

Soutenue par
Huu-Hien HUYNH
Le 29 Janvier 2021

Ecole doctorale ED388
Chimie Physique et chimie analytique de Paris Centre

Spécialité
Chimie analytique

Composition du jury :

Laurence SABATIER Professeure, Université de Strasbourg	*Présidente*
Jean-Paul CRISTOL Professeur, Praticien hospitalier, CHU Montpellier	*Rapporteur*
François BECHER Ingénieur de recherche, CEA Saclay	*Rapporteur*
Ralf JOSEPHS Ingénieur de recherche, BIPM	*Examinateur*
Anne VARENNE Professeure, Chimie ParisTech PSL	*Examinatrice*
Lauriane GOLDWIRT Praticienne hospitalière, Hôpital Saint-Louis (APHP)	*Examinatrice*
Amandine BOEUF Cadre scientifique EPIC, LNE	*Examinatrice*
Joëlle VINH Directrice de recherche, ESPCI Paris PSL	*Directrice de thèse*

Confidentielle jusqu'au 29/07/2021

ESPCI PARIS | PSL

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du **Dr. Joëlle Vinh** du laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris et sous l'encadrement du **Dr. Amandine Boeuf** et du **Dr. Vincent Delatour** du Laboratoire National de Métrologie et d'Essais.

Résumé

Le dosage de la procalcitonine (PCT) est un outil de choix pour le diagnostic précoce du sepsis et la gestion du traitement antibiotique. Comme les prises de décision médicale et la stratégie de prise en charge thérapeutique des patients reposent en général sur des valeurs seuil de concentration de la PCT, il apparaît primordial de disposer de résultats de mesure fiables et comparables, quelle que soit la méthode de dosage employée, dans le temps, et dans l'espace. Or, de nombreuses méthodes de dosage de la PCT de type immunoessai sont actuellement disponibles et les résultats fournis par celles-ci ne sont pas toujours comparables. Cette situation peut s'expliquer en partie par l'absence de méthode de référence et de matériau de référence certifié d'ordre supérieur.

Ces travaux ont consisté dans un premier temps à documenter l'état actuel de la comparabilité des mesures de la PCT entre les méthodes de routine afin d'évaluer la nécessité d'établir la traçabilité métrologique des résultats aux unités SI. L'analyse de l'ensemble des études de corrélation publiées et des résultats de contrôles externes de qualité a montré qu'il est difficile d'évaluer correctement la comparabilité des résultats et de comprendre l'origine de leur variabilité à partir de matériaux dont la commutabilité n'a pas été démontrée. Aussi, parait-il indispensable de mener des campagnes d'évaluation externe de qualité utilisant des matériaux de contrôle commutables. Par ailleurs, afin de répondre aux exigences réglementaires relatives au raccordement métrologique des résultats de mesure et afin de pouvoir évaluer la justesse des méthodes de routine, une méthode de référence candidate pour la quantification absolue de la PCT dans le sérum humain par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a été développée et validée avec une limite de quantification de 0,25 ng/mL. Le raccordement des résultats aux unités SI a été établi par l'utilisation d'étalons primaires dont la pureté a été préalablement caractérisée par analyse des acides aminés avec correction de la contribution des impuretés identifiées par spectrométrie de masse haute résolution.

Mots clés : procalcitonine, sepsis, antibiorésistance, méthode de référence, dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplé à la spectrométrie de masse, traçabilité métrologique

Abstract

Procalcitonin measurement is a usefully tool to aid the early diagnosis and antibiotic stewardship for patients with sepsis. As sepsis diagnosis and antibiotic stewardship rely on fixed clinical cutoffs (threshold concentration values), ensuring accuracy and comparability of PCT results over time and space is essential to ensure an appropriate diagnostic and therapeutic management. Multiple immunoassays have been developed and commercialized. However, comparability of results remains questionable. There is no metrological traceability to the international system of units (SI) for PCT measurement due to the lack of higher order reference method and certified reference materials.

This work initially consisted in documenting the current state for results' comparability between the different commercially available immunoassays for PCT in order to evaluate the need to establish metrological traceability to the SI. The evaluation of correlation studies and external quality assessment schemes results indicate that properly evaluating the current state of result's comparability and discriminating the origin of result's discrepancies is made difficult because studies were conducted in non-harmonized conditions and commutability of the materials was not characterized. Thus, it seems essential to conduct quality external evaluation using commutable control materials. In order to evaluate accuracy of commercially available immunoassays for PCT and to meet the regulatory requirements for the metrological traceability of results, a candidate reference method based on isotopic dilution liquid chromatography coupled to mass spectrometry was developed and validated for an absolute quantification of PCT in human serum with a limit of quantification of 0.25 ng/mL. Results traceability to the SI units could be established thanks to a thorough purity assessment of the primary calibrators by amino acid analysis and correction of impurities contribution.

Key words: procalcitonin, sepsis, reference method, isotope dilution liquid chromatography coupled to mass spectrometry, metrological traceability

Remerciements

Ce projet de thèse n'a été rendu possible que grâce à la collaboration entre le laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (EPSCI Paris) de l'Université Paris Sciences et Lettres (PSL) et le Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE).

Je tiens à adresser mes remerciements et toute ma gratitude à mes encadrants de thèse. A ma directrice de thèse d'abord, Joëlle Vinh, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour la confiance qu'elle m'a accordé, pour sa patience et la qualité de ses critiques, toujours précieuses. Les discussions éclairées de ces trois années ont profondément contribué à ma formation scientifique. A mon encadrant Vincent Delatour, pour ses conseils de très grande qualité, pour sa confiance et son soutien. Sa disponibilité et son écoute ne me firent jamais défaut. A ma co-encadrante Amandine Bœuf. Sans son sens aigu de l'analyse critique et les discussions longues de plusieurs heures à comprendre et à trouver des solutions, sans sa disponibilité et son soutien sans faille durant ces trois dernières années, ce travail aurait été infiniment plus difficile.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Jean-Paul Cristol, Professeur au CHU Montpellier, ainsi que Monsieur François Becher, Docteur au CEA Paris Saclay pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je voudrais également remercier Madame Laurence Sabatier, Professeure à l'Université de Strasbourg, Madame Anne Varenne, Professeure à l'Ecole Chimie ParisTech, Monsieur Ralf Josephs, Docteur au Bureau International aux Poids et Mesures et Madame Lauriane Goldwirt, Docteur à l'hôpital Saint-Louis pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse.

Je voudrais également remercier Madame Sophie Vaslin-Reimann et Madame Béatrice Lalère pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe du Pôle Chimie et Biologie et pour leurs avis critiques sur mes différents posters, présentations et publications.

Je souhaite également remercier le Docteur Qinde Liu et le Docteur Yizhao Chen pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe du HSA lors de mon séjour d'échange à Singapour. Pour m'avoir nourri en discussions scientifiques ainsi qu'en conseils pratiques pour mieux passer mon séjour à Singapour.

Mes remerciements vont également à mes collègues SMBP : A Manue pour la source du « CocaCola » ; à Alex, Nicolas et encore Manue pour des discussions techniques et des solutions de problèmes instrumentaux ; à Iman pour son super pouvoir en informatique ; à Yann pour ses conseils techniques pour réaliser des beaux gels, à Gio pour des discussions

techniques, à Martha, Massamba, Wafa, Zeyuan, Ranjith et les SMBP Alumni Shakir et Sergio. Merci à tous pour ces moments.

Merci à Hélène pour nos séances d'incertitude le vendredi après-midi, à Maxence pour son aide dans les manips de la dernière ligne droite, à Chiara pour des questions techniques et aux filles de la Chimie. Merci à Julie, Valentin pour les séances de crossfit. Merci à tous pour ces moments passés.

Merci à Elodie, mon binôme de thèse, coloc LNE et voisine de la résidence Simone Veil, pour les moments de partage, de répète et de soutien. Merci à Mathieu pour son soutien et pour m'avoir supporté. Merci à Marc, Emeline, et Flo pour les moments de partage.

Merci à mes amis : Christophe, Rizky, Liem, Charlotte, Ila pour avoir compris et accepté mes trop nombreuses absences durant cette dernière année de thèse. Merci à Félix, le bellevillois de Zurich, mon camarade de formation en pharmacie et en Chimie, à Rama et Fred, mes potes de pharmacie qui ne comprennent toujours pas pourquoi je poursuis une nouvelle thèse.

Merci à ma famille en France et au Vietnam pour avoir toujours cru en moi. Finalement, je veux remercier de tout mon cœur mes parents et mes sœurs qui m'ont toujours soutenu dans mes projets.

Table des matières

Résumé I
Abstract III
Remerciements V
Table des matières VII
Valorisation XI
Liste des figures XIII
Liste des tableaux XVII
Liste des abréviations XIX
Introduction générale 1
Partie A Introduction bibliographique 5
Chapitre I Apport de la métrologie en biologie médicale 7
I.1 Enjeux de la fiabilité des examens de biologie médicale 8
I.2 Assurance qualité en biologie médicale 11
I.2.1 Contexte normatif et règlementaire 11
I.2.2 Contrôle qualité dans les laboratoires de biologie médicale 13
I.3 La métrologie en biologie médicale 15
I.3.1 Traçabilité métrologique 15
I.3.2 Matériaux de référence certifiés et procédures de mesure de référence 17
I.3.3 Commutabilité 19
I.3.4 Standardisation/Harmonisation 22
Chapitre II Sepsis et résistance aux antibiotiques 25
II.1 Sepsis 26
II.1.1 Historique et définition 26
II.1.2 Epidémiologie 30
II.1.3 Etiologie 32
II.1.4 Physiopathologie et conséquences du sepsis 32
II.1.4.1 Physiopathologie du sepsis 32
II.1.4.2 Manifestations cliniques du sepsis 35
II.1.5 Diagnostic du sepsis 36
II.1.6 Prise en charge thérapeutique des patients 39
II.2 Résistance aux antibiotiques 40
II.2.1 Antibiothérapie 40

II.2.2 Résistance aux antibiotiques 42
II.2.3 Consommation des antibiotiques et risque de développer une résistance aux antibiotiques 42
II.2.4 Antibiothérapie et résistance aux antibiotiques dans le cadre du sepsis 45
Chapitre III Procalcitonine 47
III.1 Généralités sur la procalcitonine 48
III.1.1 Structure et biogenèse de la procalcitonine 48
III.1.2 Production de la procalcitonine en cas de sepsis d'origine bactérienne 49
III.1.3 Utilisation de la PCT pour le diagnostic du sepsis, la stratification des patients et l'antibiothérapie 52
III.1.4 Bénéfices des dosages de la PCT dans la gestion et la prise en charge des patients 55
III.1.5 Limites des dosages de la PCT 57
III.2 Méthode de dosage de la procalcitonine 58
III.2.1 Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale 58
III.2.2 Autres méthodes de dosage de la PCT 65
Chapitre IV Quantification de protéines en matrice complexe par ID-LC-MS/MS 67
IV.1 Sérum et protéines du sérum 68
IV.2 Quantification par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse 71
IV.2.1 Séparation par chromatographie en phase liquide 71
IV.2.2 Détection par spectrométrie de masse 72
IV.2.2.1 Modes de fragmentation 75
IV.2.2.2 Mode d'acquisition 76
IV.2.2.2.1 Analyse en masse intacte 76
IV.2.2.2.2 Acquisition en mode dépendant des données 77
IV.2.2.2.3 Parallel reaction monitoring 77
IV.3 Quantification de protéines par ID LC-MS 79
IV.3.1 Approches protéomiques 79
IV.3.2 Stratégie de quantification de la PCT 82
IV.3.2.1 Principe général 82
IV.3.2.2 Quantification par dilution isotopique 83
IV.3.2.3 Etalonnage 86
IV.3.2.4 Caractérisation des étalons légers par l'approche PICAA 87
IV.4 Traitement de l'échantillon 87
IV.4.1 Dénaturation des protéines 91
IV.4.2 Précipitation des protéines 91
IV.4.3 Ultrafiltration des protéines 92
IV.4.4 Extraction en phase solide 93

IV.4.5 Déplétion des protéines 94
IV.4.6 Immunoaffinité 95
Partie B Résultats 97
Chapitre I Evaluation des besoins de standardisation 101
I.1 Evaluation de la comparabilité des résultats de mesure de la PCT 102
Article 1 : Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ? 107
I.2 Stratégie pour l'établissement d'une chaîne de traçabilité des mesures de la PCT 149
Article 2 : Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders 153
Chapitre II Développement d'une méthode de quantification de la PCT en sérum 177
II.1 Sélection des peptides pour la quantification de la PCT en sérum par une approche bottom-up 178
II.2 Quantification et caractérisation des étalons primaires 181
II.2.1 Etalon primaire peptidique 185
II.2.1.1 Analyses des acides-aminés 185
II.2.1.2 Identification des impuretés peptidiques 189
II.2.1.3 Détermination de la concentration corrigée 198
II.2.1.4 Estimation des incertitudes 200
II.2.2 Etalon primaire protéique 204
II.2.2.1 Analyse des acides aminés : 204
II.2.2.2 Analyses des impuretés 207
II.2.2.2.1 Confirmation de l'identité de la PCT recombinante par l'approche *top-down*. 211
II.2.2.2.2 Identification des impuretés par MS/MS 213
II.2.2.3 Détermination de la concentration corrigée 216
II.2.2.4 Estimation des incertitudes 216
II.3 Méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain 217
II.3.1 Optimisation des conditions chromatographiques 218
II.3.1.1 Nature des phases mobiles 219
II.3.1.2 Influence du gradient 221
II.3.1.3 Influence des agents d'appariement d'ions dans les phases mobiles 224
II.3.1.4 Optimisation du débit 227
II.3.1.5 Optimisation de la température de la colonne chromatographique 229
II.3.2 Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse 231
II.3.2.1 Paramètres de source 232
II.3.2.2 Paramètres de la méthode PRM 235
II.3.3 Optimisation de la méthode de préparation d'échantillon 239
II.3.3.1 Dénaturation des protéines 239

II.3.3.2 Précipitation des protéines 241
II.3.3.3 Purification des protéines par SPE 244
II.3.3.4 Digestion des protéines 245
II.3.3.5 Purification des peptides 250
II.3.4 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage peptidique 254
Article 3 : Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin at sub-nanogram per milliliter level in human serum using a peptide-based calibration 257
II.3.5 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage protéique 300
Article 4 : A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator 303
Conclusion générale et perspectives 331
Annexes 343
Références 359

Valorisation

Communication écrite

- **Huynh HH**, Bœuf A, Vinh J, Delatour V, IFCC Working Group on Standardization of Procalcitonin assays (WG-PCT). 'Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders', Clinica Chimica Acta, 2021, 515, p.111-121.
- **Huynh HH**, Bœuf A, Pfannkuche J, Schuetz P, Thelen M, Nordin G, Hagen E v D, Kaiser P, Kesseler D, Badrick T, Poggi B, Tiikkainen U, Davies GJ, Kessler A, Plebani M, Vinh J, Delatour V. 'Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ?', article soumis pour publication dans Clinical Chemistry
- **Huynh HH**, Bœuf A, Derbez-Morin M, Dupuy AM, Lalère B, Delatour V, Vinh J. 'Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin in human serum at sub-nanogram per milliliter level using a peptide-based calibration', article soumis pour publication dans Analytical and Bioanalytical Chemistry.
- **Huynh HH**, Bœuf A, Derbez-Morin M, Dupuy AM, Liu Q, Vinh J, Delatour V. 'A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator', En préparation en vue de la soumission pour publication dans Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Communication par affiche

- **Huynh HH**, Bœuf A, Lalere B, Vaslin-Reimann S, Delatour V, Vinh J. 'Candidate reference method to establish traceable PCT measurement results', December 2019, JCTLM 2019, Sèvres, France
- **Huynh HH**, Bœuf A, Lalere B, Vaslin-Reimann S, Delatour V, Vinh J. 'A candidate reference method for PCT quantification in human serum using ID-LC-MS/MS', September 2019, SMAP 2019, Strasbourg, France
- **Huynh HH**, Bœuf A, Lalere B, Vaslin-Reimann S, Delatour V, Vinh J. 'A candidate reference method for PCT quantification in human serum using ID-LC-MS/MS', May 2019, EuroMedLab 2019, Barcelona, Spain

Communication orale

- Réunion du groupe de travail IFCC WG-PCT (Barcelone, 20 Mai 2019)
- Séminaire R&D du LNE (Trappes, 21/01/2020)
- Réunion du Pôle Chimie et Biologie LNE (Paris, 10/03/2020)

Liste des figures

Figure 1. Sources et répartition des erreurs liées aux examens de biologie médicale en 2006 (adapté de (12)) 10
Figure 2. Les différentes normes internationales ISO s'appliquent aux différentes parties prenantes de la chaine de traçabilité métrologique. 11
Figure 3. Chaîne de traçabilité métrologique 16
Figure 4. Influence de matériaux de référence secondaires non-commutables 20
Figure 5. Principe de l'évaluation de la commutabilité d'un matériau de référence 21
Figure 6. Classification des conditions infectieuses ou non-infectieuses liées à un sepsis selon le premier consensus international en 1991 (45). 27
Figure 7. Classification des états septiques selon la troisième définition internationale SEPSIS-3 en 2016 (48) 28
Figure 8. Incidence (A) et taux de mortalité (B) du sepsis dans le monde (selon Rudd et al. 2020 (50)) 31
Figure 9. Physiopathologie du sepsis depuis la reconnaissance des agents pathogènes jusqu'aux conséquences cliniques manifestées (adapté selon (68)) 33
Figure 10. Taux de survie en fonction du délai d'administration d'un traitement chez les patients atteints de sepsis présentant une hypotension (Adapté de (96)) 39
Figure 11. Découverte de différentes classes thérapeutiques d'antibiotiques dans le temps (selon reactgroup.org). 41
Figure 12. Mécanismes d'action des antibiotiques 41
Figure 13. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (ATB) 42
Figure 14. Cartographie des plans nationaux d'action pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (enquête de 2018-2019 menée par l'OMS). 45
Figure 15. Cartographie de la résistance aux antibiotiques pour deux souches Staphylococcus aureus (A) et Pseudomonas aeruginosa (B) (ECDC 2018). 46
Figure 16. Séquence d'acides aminés de la PCT humaine (adapté selon Maruna et al, 2000 (124)..... 48
Figure 17. Différentes formes circulantes de la PCT, ainsi que leurs concentrations respectives dans le sang en conditions physiologiques (adapté selon Becker et al., 2004) 49
Figure 18. Production de la PCT dans les conditions physiologiques et en cas de sepsis bactérien (adapté de (132)) 50
Figure 19. Cinétique de différents biomarqueurs suite à un stimuli bactérien (136) 51
Figure 20. Stratification des patients en fonction de la concentration de la PCT (144) 53
Figure 21. Recommandations pour l'initiation d'une antibiothérapie (A) et le suivi thérapeutique en dehors des situations d'urgence thérapeutique (méningite, choc septique) (B) en fonction de la concentration de la PCT (147). 54
Figure 22 : Illustration des différentes étapes d'un dosage immunoessai 62
Figure 23. Distribution des protéines sériques/plasmatiques 69
Figure 24. Comparaison du sérum et du plasma 70

Figure 25. Principe de la détection en spectrométrie de masse 72
Figure 26. Mécanisme de formation des ions en phase gazeuse par l'électronébulisation (ESI) (206) 73
Figure 27. Analyseur quadripôle (207) 74
Figure 28. Analyseur Orbitrap (208) 74
Figure 29. Les différents fragments générés lors de la fragmentation des protéines/peptides 75
Figure 30.Principe d'une analyse en mode PRM Parallel Reaction Monitoring 78
Figure 31. Comparaison des signaux obtenus en fonction des modes d'acquisition SRM ou PRM (212). 79
Figure 32. Illustration des deux approches top-down et bottom-up (213) 80
Figure 33. Stratégie de quantification LC-MS des biomarqueurs protéiques par l'approche « bottom-up » 82
Figure 34. Trois stratégies d'utilisation des étalons internes marqués dans la quantification des biomarqueurs protéiques. 84
Figure 35. Différentes stratégies de pré-traitement des échantillons pour une quantification de biomarqueurs protéiques dans le sérum/plasma par LC-MS (185). 88
Figure 36. Principe de la digestion sur filtre 93
Figure 37. Principe de l'extraction en phase solide (SPE) 94
Figure 38. Résultat de la concentration de la PCT d'un patient en fonction des différents parcours hospitaliers 99
Figure 39. Stratégie de sélection des peptides protéotypiques de la PCT 178
Figure 40. Superposition des chromatogrammes d'ion extrait des 8 peptides issus de la digestion par l'enzyme trypsine de la PCT en milieu tampon sans matrice sérum. 179
Figure 41. Superposition des chromatogrammes d'ion extrait des peptides issus de la digestion par l'enzyme trypsine de la PCT en sérum 180
Figure 42. Stratégie PICAA pour la détermination de la concentration exacte de l'étalon primaire de type peptidique ou protéique 182
Figure 43. Schéma de l'analyse des acides aminés par l'hydrolyse en phase gazeuse 183
Figure 44. Superposition de chromatogrammes d'ion extrait des six acides aminés d'un contrôle de qualité interne issu de l'analyse LC-MS du matériau de référence certifié 2389a 184
Figure 45. Chromatogramme d'ion total obtenu pour un échantillon du peptide SALESSPADPATLSEDEAR issu d'une hydrolyse en phase gazeuse à 130°C pendant 40 heures 186
Figure 46. Superpositions des chromatogrammes d'ion extrait du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et des impuretés majeures d'une solution diluée de la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR 190
Figure 47. Relation entre l'aire du pic majoritaire correspondant au peptide SALESSPADPATLSEDEAR et le de la quantité injectée de peptide SALESSPADPATLSEDEAR 192
Figure 48. Spectre de fragmentation du peptide SALESSPADPATLSEDEAR (m/z 973.4469, z=2) 194
Figure 49. Spectres de fragmentation des impuretés I4, I8 et I11 196
Figure 50. Représentation de la fraction massique du peptide SALESSPADPATLSEDEAR en fonction de l'acide aminé utilisé 202
Figure 51. Représentation graphique de la contribution relative de chaque composante du budget d'incertitude dans l'incertitude associée à la fraction massique moyenne du peptide SALESSPADPATLSEDEAR (A), ainsi que les contributions relatives des composantes du budget d'incertitude de la fraction massique obtenue pour chaque acide aminé (B) 203

Figure 52. Séquence d'acides aminés de la protéine PCT recombinante et stœchiométrie des différents acides aminés obtenue après hydrolyse en milieu acide 205
Figure 53. Chromatogramme d'ion total obtenu pour un échantillon d'étalon primaire protéique issu d'une hydrolyse en phase gazeuse à 130 °C pendant 40 °C. 207
Figure 54. Stratégie de correction des contributions des impuretés dans l'approche PICAA pour un étalon primaire de type protéique 208
Figure 55. Chromatogramme et spectre de masse obtenus lors de l'analyse LC-HRMS de la protéine recombinante PCT. 210
Figure 56. Confirmation de la séquence d'acides aminés de la protéine PCT recombinante par l'approche top-down 212
Figure 57. Spectre de fragmentation MS/MS de la protéine PCT et sa forme acétylée en mode HCD 214
Figure 58. Présentation du score PCS et P-score en fonction de la position de la modification « acétylé » en mode HCD et CID de l'ion précurseur 915,2327 (m/z) 215
Figure 59. Représentation graphique de la contribution relative de chaque composante du budget d'incertitude dans l'incertitude associée à la fraction massique moyenne de la protéine standard PCT (A), ainsi que les contributions relatives des composantes du budget d'incertitude de la fraction massique obtenue par chaque acide aminé (B) 217
Figure 60. Influence du solvant organique de la phase mobile sur l'intensité de signal MS des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK 219
Figure 61. Chromatogramme des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus dans différentes conditions de phase mobile organique 220
Figure 62. Comparaison des aires sous le pic pour les deux peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré avec différents gradients de phase mobile organique B 222
Figure 63. Chromatogrammes des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus en fonction du gradient de la phase mobile B 223
Figure 64. Influence de la présence d'acide formique et d'acide acétique dans les deux phases mobiles (eau et méthanol) 225
Figure 65. Chromatogrammes des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus avec différents agents d'appariement d'ion dans les deux phases mobiles (eau et méthanol) 227
Figure 66. Comparaison des aires du pic des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré dans les différents débits des phases mobiles .. 228
Figure 67. Influence du débit sur la séparation chromatographique 229
Figure 68. Influence de la température de la colonne sur la séparation chromatographique 230
Figure 69. Comparaison des aires du pic des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré dans les différentes températures de la colonne chromatographique 230
Figure 70. Optimisation des différents paramètres de la source MS 235
Figure 71. Profils des différents ions produits détectés en mode PRM en fonction de l'énergie de collision. 237
Figure 72. Optimisation des énergies de collisions des deux peptides 238
Figure 73. Influence de l'ajout de SDC sur les signaux des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK 241

Figure 74. Influence de la précipitation protéique (PP) 242
Figure 75. Influence de la précipitation protéique par l'acétonitrile 243
Figure 76. Evaluation du pourcentage du méthanol dans la solution d'élution de SPE HLB 245
Figure 77. Etude de la quantité d'enzyme trypsine..... 246
Figure 78. Cinétique de digestion de la PCT 247
Figure 79. Rapport des aires entre les peptides non-marqués (L) et les peptides marqués (H) issues de la digestion de la PCT et PCT marquée en fonction de la durée de la digestion enzymatique 248
Figure 80. Rapport des aires détectés entre les peptides (L) issus de la digestion de la PCT et les peptides marqués synthétiques (H) au cours du temps 249
Figure 81. Influence d'ajout du Tween 20 à 0,0001 % dans la solution avant la digestion 250
Figure 82. Superposition de deux chromatogrammes du courant d'ion total obtenues d'un digestat sans extraction SPE HLB (profil en bleu) et d'un extrait par SPE HLB du digestat (profil en noir) 251
Figure 83. Protocole de quantification de la PCT dans le sérum humain par LC-MS/MS 254
Figure 84. Schéma d'analyse des acides aminés par l'hydrolyse en phase gazeuse 346

Liste des tableaux

Tableau 1. Différentes catégories d'évaluations externes de qualité (22) 14
Tableau 2. Calcul du score SOFA à partir de l'évaluation des fonctions vitales principales..... 29
Tableau 3. Recommandations pour l'utilisation des dosages de la PCT dans le traitement antibiotique chez les patients atteints de sepsis ou d'infection des voies respiratoires inférieures (148–151)..... 55
Tableau 4. Situation de faux négatifs des dosages de la PCT 57
Tableau 5. Situations de faux positif des dosages de la PCT 57
Tableau 6. Caractéristiques des méthodes de dosage de la PCT disponibles commercialement 59
Tableau 7. Les tests dits « Point of care » POCT disponible pour le dosage de la PCT 65
Tableau 8. Classification de type de colonne chromatographique liquide en fonction de diamètre interne 71
Tableau 9. Avantages et inconvénients des différentes approches d'étalonnage interne pour la quantification d'un biomarqueur protéique en LC-MS/MS (adapté de Brun et al. 2009) 86
Tableau 10. Etude bibliographique des articles de recherche pour la quantification des biomarqueurs dans le sérum/plasma par la stratégie bottom-up. Les études sont présentées en fonction de la technique de la préparation d'échantillon. 89
Tableau 11. Concentrations molaires du peptide SALESSPADPATLSEDEAR dans la solution mère obtenues par analyse des acides aminés après hydrolyse en phase gazeuse et en phase liquide..... 188
Tableau 12. Liste des impuretés identifiées par l'analyse en masse intacte LC-HRMS et en LC-MS/MS. Seules les impuretés retenues avec une aire relative supérieure à 0,1 % sont présentées 193
Tableau 13. Liste des impuretés majoritaires identifiées dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR 197
Tableau 14. Fractions massiques des impuretés dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR après la correction des contributions des impuretés..... 199
Tableau 15. Résultats non corrigés par la contribution des impuretés obtenus par analyse des acides aminés dans différentes conditions d'hydrolyse en phase gazeuse (température et temps d'hydrolyse) 206
Tableau 16. Résultat d'analyse en masse intacte HRMS de la solution mère de la protéine PCT 211
Tableau 17. Récapitulatif des conditions chromatographiques de la méthode LC- MS optimisées pour la quantification de la PCT dans le sérum humain 231
Tableau 18. Paramètre de source MS final pour la quantification de la PCT en sérum pour un débit de phases mobiles de 80 µl/min 235
Tableau 19. Paramètres MS pour la détection en PRM des peptides d'intérêt de la PCT et de leurs analogues marqués 239
Tableau 20. Conditions d'extraction SPE de type HLB au niveau peptidique 252
Tableau 21. Préparation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des acides aminés par ID-LC/MS 345
Tableau 22. Conditions de chromatographie liquide pour la séparation des acides aminés 347
Tableau 23. Conditions de la source d'ionisation ESI pour l'analyse des acides aminés 347

Tableau 24. Liste d'inclusion pour la détection des acides aminés..... 348
Tableau 25. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés du peptide synthétique SALES 349
Tableau 26. Condition de la source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés du peptide synthétique SALES..... 350
Tableau 27. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés de la PCT..... 352
Tableau 28. Conditions de source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés de la PCT 352
Tableau 29. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés de la PCT..... 353
Tableau 30. Condition de la source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés de la PCT 354
Tableau 31. Récapitulatif des paramètres chromatographiques optimisés de la méthode LC-MS pour la quantification de la PCT dans le sérum humain 357
Tableau 32. Paramètre de source MS final pour la quantification de la PCT en sérum..... 358
Tableau 33. Paramètres MS pour la détection en PRM des peptides de la PCT et leurs étalons internes marqués..... 358

Liste des abréviations

AAA	Analyse des acides aminés
Ab	Anticorps
ACCP	*American College of Chest Physicians*
AHRQ	*Agency for Healthcare Research and Quality*
AQUA	*Absolute QUAntification*
ATS	*American Thoracic Society*
BCA	Dosage à l'acide bicinchoninique
CID	*Collision Induced Dissociation*
CIQ	Contrôle interne de qualité
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CLR	*C-type lectin receptors*
CLSI	*Clinical and Laboratory Standard Institutes*
COFRAC	Comité français d'accréditation
CRP	Protéine C-réactive
DAMPS	*Damage Associated Molecular Patterns*
DDA	*Data Dependant Analysis*
DDJ	Dose moyenne journalière d'un médicament
ID	Dilution isotopique
DIV	Diagnostic in-vitro
EBMD	Examens de biologie médicale délocalisée
ECDC	*European Center for Disease Prevention and Control*
EDTA	Acide éthylène tétra-acétique
EEQ	Evaluation externe de qualité
ESI	*Electrospray ionization*
ESICM	*European Society of Intensive Care Medicine*
ETD	*Electron transfert dissociation*
FDA	*Food and Drug Administration*
GUM	Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure
HCD	*Higher energy Collisional Dissociation*
HESI	*Heated Electrospray Ionization*
HLB	*Hydrophilic lipophilic balance*
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse de haute résolution
HSP 27	*Heat Shock Protein 27*
HUPO	*Human Proteome Organization*
IDSA	*Infectious Diseases Society of America*
IFCC	*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*
INM	Institute National de Métrologie

IRI	Infection des voies respiratoires inférieures
JCTLM	*Joint Commitee for Traceability in Laboratory Medicine*
LBM	Laboratoire de biologie médicale
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
mAb	Anticorps monoclonal
MCX	*Mixed cation exchange*
MRC	Matériaux de référence certifiés
MS/MS	Spectrométrie de masse tandem
nanoESI	Nano-électrospray
NICE	*National Institute for Health and Care Excellence*
NIH	*National Institutes of Health*
NLR	*NOD-like receptors*
OMS	Orgganisation Mondiale de la Santé
pAb	Anticorps polyclonal
PAMPS	*Pathogen Associated Molecular Patterns*
PICAA	*Peptide Impurity Corrected by Amino acids*
POCT	*Point of care test*
PRM	*Parallel Reaction Monitoring*
PRR	*Pattern Recognition Receptors*
PSAQ	*Protein Standard Absolution Quantification*
QconCAT	Quantification conCATamer
qSOFA	quick SOFA
ROC	*Receiver operating characteristic*
SCCM	*Society of Critical Care Medicine*
SCX	*Strong cation exchange*
SDC	Déoxycholate de sodium
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SIS	*Surgical Infection Society*
SISCAPA	*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*
SOFA	Sequential Organ Failure Assessement
SPE	Extraction en phase solide
SRIS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TF	Facteur tissulaire
TLR	*Toll-like receptors*
UVPD	*Ultraviolet Photodissociation*
VIM	Vocabulaire international de métrologie
VPN	valeurs prédictives négatives
VPP	Valeurs prédictives positives

Introduction générale

Le sepsis est défini comme une réponse dérégulée de l'organisme à une infection, entrainant la perte de fonction des organes et engageant le pronostic vital du patient. En 2017, le sepsis a été classé comme une priorité sanitaire mondiale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a adopté une résolution pour améliorer la prévention, le diagnostic et le traitement clinique du sepsis. Le diagnostic précoce et rapide du sepsis demeure un réel enjeu dans les services de soins intensifs et aux urgences afin de réduire le risque pour les patients. Actuellement, ce diagnostic repose sur une triade d'examens : les signes cliniques, les tests microbiologiques (culture) et le dosage des biomarqueurs dans les fluides biologiques. Cependant, face à des signes cliniques peu spécifiques en raison de sa physiopathologie complexe et face aux délais nécessaires pour les cultures bactériennes, le diagnostic du sepsis reste difficile à établir à un stade précoce où l'enjeu consiste à discriminer l'origine de l'infection. En effet, les origines de l'infection causant un sepsis sont très variées et peuvent être de nature virale, fongique, parasitaire ou bactérienne. Cette situation conduit souvent à la mise en place de traitements antibiotiques probabilistes à large spectre qui ne sont pas toujours appropriés. Une consommation non adaptée d'antibiotiques engendre à la fois des dépenses de santé publique injustifiées, un risque d'effets indésirables liés au traitement et contribue à l'apparition de résistances aux antibiotiques. Or, la résistance aux antibiotiques représente l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale et a été classée comme une priorité importante par l'OMS. Par conséquent, il existe un réel besoin de disposer d'outils permettant d'établir un diagnostic fiable et précoce du sepsis bactérien pour améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients suspectés d'être atteints du sepsis.

La procalcitonine (PCT) est un biomarqueur reconnu pour le diagnostic du sepsis en raison de sa spécificité pour les infections bactériennes. De plus, le dosage de la PCT permet de suivre et d'adapter de manière plus fine le traitement antibiotique des patients atteints de sepsis et d'une infection des voies respiratoires inférieures. Le dosage de la PCT constitue donc un outil précieux pour répondre aux besoins d'un diagnostic précoce du sepsis et d'une meilleure gestion de l'utilisation des antibiotiques.

Afin de répondre à la forte demande des dosages de la PCT, de nombreuses méthodes de dosage ont été développées. La plupart des méthodes actuellement utilisées dans les hôpitaux et les laboratoires de biologie médicale sont des immunoessais entièrement automatisés reposant sur l'utilisation de différents anticorps, réactifs, étalons et techniques de détection. Cette multiplicité peut engendrer des différences parfois importantes entre les résultats fournis par les différentes méthodes de dosage. Cependant, les prises de décision médicales et la stratégie de prise en charge thérapeutique des patients reposent en général sur des valeurs seuil de concentration. Il est donc essentiel de disposer de résultats de mesure fiables et comparables dans le temps et dans l'espace afin d'établir un diagnostic fiable, puis établir un traitement antibiotique approprié. Disposer de mesures comparables permet également d'assurer un suivi cohérent du patient même si celui-ci est

amené à réaliser des examens dans différentes structures n'utilisant pas nécessairement la même technique de dosage de la PCT.

Un moyen privilégié pour assurer la comparabilité des résultats de mesure consiste à raccorder les résultats fournis par les différentes méthodes de dosages à des références communes reconnues internationalement et lorsque cela est possible, raccorder les résultats aux unités du Système International (SI). Le raccordement métrologique des valeurs associées aux matériaux d'étalonnage et de contrôle de qualité par le biais de méthodes de référence et de matériaux de référence certifiés d'ordre supérieur disponibles est exigé par le règlement 2017/746/EU du Parlement européen relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Or, il n'existe actuellement pas de méthode de référence ni de matériau de référence certifié d'ordre supérieur pour le dosage de la PCT.

Afin de répondre à ces exigences, dans un premier temps, nos travaux ont évalué l'état actuel de la comparabilité des résultats obtenus par les différentes méthodes de dosage afin de documenter et mieux comprendre les variabilités observées. Dans un second temps, nos travaux ont permis le développement une méthode de référence candidate d'ordre supérieur pour la quantification absolue de la PCT dans le sérum humain par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplé à la spectrométrie de masse (ID-LC-MS/MS). Ce projet doctoral s'inscrit dans le cadre de deux projets Européens de recherche en métrologie.

La première partie de ce manuscrit est une synthèse bibliographique destinée à placer ce travail de thèse dans un contexte métrologique, clinique et analytique. L'apport de la métrologie en biologie médicale, le sepsis et la résistance aux antibiotiques, le rôle de la procalcitonine dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique du sepsis et les outils analytiques disponibles pour le développement d'une méthode de dosage de la PCT par spectrométrie de masse sont présentés.

La deuxième partie de ce manuscrit est divisée en deux chapitres décrivant les résultats obtenus. A travers un premier article, le premier chapitre expose la méthodologie avec laquelle a été évaluée la comparabilité des résultats fournis par les différentes méthodes de dosage de la PCT. Le second article décrit les différentes activités menées par le groupe de travail WG-PCT de la Fédération Internationale de Biologie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC) pour évaluer la nécessité d'améliorer la comparabilité des résultats et le cas échéant quelle serait la stratégie à adopter. Le second chapitre porte sur les activités expérimentales liées au développement d'une méthode de référence candidate pour le dosage de la PCT. Celui-ci présente dans un premier temps les sélections nécessaires relatives à la mise en œuvre d'une stratégie de quantification d'une protéine par l'approche *bottom-up*. Les développements et optimisations analytiques de la caractérisation des étalons primaires, en accord avec l'état de l'art en métrologie afin d'assurer le raccordement métrologique des résultats de mesure aux unités SI, et de la méthode de quantification de la PCT par ID-LC-MS/MS sont ensuite présentés. Un premier article, reprenant en partie les

optimisations réalisées au niveau de la préparation de l'échantillon et de la caractérisation d'un étalon primaire peptidique, décrit les performances d'une méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain par ID-LC-MS/MS reposant sur des étalons peptidiques. Un second article décrit la caractérisation d'un étalon primaire protéique et les performances de la méthode de référence candidate reposant sur des étalons primaires protéiques.

Enfin, ce manuscrit s'achève sur une conclusion générale faisant la synthèse des résultats obtenus et propose des perspectives aux travaux effectués.

Partie A
Introduction bibliographique

Chapitre I Apport de la métrologie en biologie médicale 7

I.1 Enjeux de la fiabilité des examens de biologie médicale 8

I.2 Assurance qualité en biologie médicale 11

I.3 La métrologie en biologie médicale 15

Chapitre II Sepsis et résistance aux antibiotiques 25

II.1 Sepsis 26

II.2 Résistance aux antibiotiques 40

Chapitre III Procalcitonine 47

III.1 Généralités sur la procalcitonine 48

III.2 Méthode de dosage de la procalcitonine 58

Chapitre IV Quantification de protéines en matrice complexe par ID-LC-MS/MS 67

IV.1 Sérum et protéines du sérum 68

IV.2 Quantification par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse . 71

IV.3 Quantification de protéines par ID LC-MS 79

IV.4 Traitement de l'échantillon 87

Chapitre I
Apport de la métrologie en biologie médicale

I.1 Enjeux de la fiabilité des examens de biologie médicale 8
I.2 Assurance qualité en biologie médicale 11
I.2.1 Contexte normatif et règlementaire 11
I.2.2 Contrôle qualité dans les laboratoires de biologie médicale 13
I.3 La métrologie en biologie médicale 15
I.3.1 Traçabilité métrologique 15
I.3.2 Matériaux de référence certifiés et procédures de mesure de référence 17
I.3.3 Commutabilité 19
I.3.4 Standardisation/Harmonisation 22

I.1 Enjeux de la fiabilité des examens de biologie médicale

La qualité des soins a toujours été un élément crucial dans le domaine de la santé et est devenue une priorité afin d'améliorer la qualité de prise en charge des patients. Elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « le moyen de garantir, à chaque individu, un ensemble d'actes diagnostiques et thérapeutiques qui assureront le meilleur résultat en termes de santé, conformément à l'état actuel de la science médicale, au meilleur coût pour un même résultat, en moindre risque et pour la plus grande satisfaction en termes de procédure, de résultats et de contact humain à l'intérieur du système de soins » (1). L'erreur médicale, définie comme un acte involontaire, une erreur d'exécution, une erreur de planification, une erreur de diagnostic, une déviation d'un protocole de prise en charge, un surdosage de médicaments ou un problème de communication, est l'un des facteurs les plus impactant de la qualité des soins (2). Une étude de 2016 a montré que les erreurs médicales sont la troisième cause de décès aux Etats-Unis, juste derrière les maladies cardio-vasculaires et les cancers avec environ 250 000 décès chaque année (3). De plus, elles représentent un enjeu économique important lié aux surcoûts dans la prise en charge des patients. Ainsi, le coût lié aux erreurs médicales est estimé entre 17 et 29 milliards de dollars américains par an aux Etats-Unis selon une étude menée par Berwick et Leape en 1999 (4). Dans la lutte pour la réduction des erreurs médicales, la majorité des mesures vise particulièrement à diminuer les erreurs humaines et à améliorer le système de communication, que ce soit entre le patient et le personnel de santé ou au sein du système de santé (5). Cependant, peu d'attention est en général accordée aux erreurs d'examens de biologie médicale. Ceci peut être expliqué par le nombre important d'étapes et les délais importants entre la prise en charge des patients, les analyses faites au laboratoire, la communication des résultats et les actions des cliniciens, rendant ainsi l'évaluation des erreurs difficile (6).

Un examen de biologie médicale est défini par le Code de la santé publique (art. L. 62112) comme « un acte médical qui concourt à la prévention, au dépistage, au diagnostic ou à l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, à la décision et à la prise en charge thérapeutiques, à la détermination ou au suivi de l'état physiologique ou physiopathologique de l'être humain, hormis les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques, exécutés par des médecins spécialistes dans ce domaine ». Un rapport publié en 2005 a montré que les résultats de tests de diagnostic *in vitro* influençaient 60 % à 70 % des prises de décision médicale (7). Cependant, l'utilisation d'examens de biologie médicale est extrêmement hétérogène en fonction de la structure clinique et des conditions des patients, et il est difficile de généraliser ces chiffres (8). En effet, une étude basée sur les données de 72 196 patients a montré que seuls 56 % des patients admis aux urgences recevaient une prescription pour au moins un examen de biologie médicale à visée diagnostique tandis que le taux s'élève à 98 % pour les patients hospitalisés (8). En cancérologie et cardiologie, une étude menée aux Etats-Unis et en Allemagne a montré que 66 % des décisions médicales étaient basées sur les examens de biologie médicale (9).

L'ensemble de ces études montre une forte implication des examens de biologie médicale dans la prise en charge des patients. Il est donc important d'évaluer l'impact des erreurs liées aux examens de biologie médicale dans les erreurs médicales pour l'amélioration de la qualité de soin des patients. En effet, ces erreurs peuvent avoir de nombreuses conséquences : erreur de diagnostic, arrêt de traitement ou prescription de traitements inappropriés et susceptibles d'aggraver l'état des patients ou d'augmenter la survenue d'effets indésirables liés au traitement. Selon une étude publiée en 2010, 24,4 % à 30,0 % des erreurs liées aux examens de biologie médicale entrainent des problèmes de soins aux patients et 2,7 % à 12,0 % de ces erreurs provoquent des effets indésirables et des soins inappropriés (10). De plus, elles entraînent généralement des analyses supplémentaires et inutiles, engendrant une augmentation des coûts associés à la prise en charge du patient et une mobilisation injustifiée du personnel médical. De nombreux contrôles qualité interviennent pourtant entre la communication des résultats d'un examen de biologie médicale et l'action réelle sur les patients. Afin de réduire les désagréments causés aux patients par les erreurs liées aux examens de biologie médicale, d'autres mesures de qualité ont été mises en place non seulement au niveau analytique mais également au niveau pré et post-analytique entre la prescription du test, la collecte et la réception des échantillons et la communication des résultats d'un examen de biologie médicale (10,11). En effet, les erreurs liées aux examens de biologie médicale peuvent survenir dans chaque phase de l'examen de biologie médicale :

- La phase pré-analytique comprenant les étapes allant de la prescription de l'examen jusqu'à la mise à disposition de l'échantillon au laboratoire.
- La phase analytique comprenant la mise en application des processus techniques permettant l'obtention d'un résultat d'analyse de biologie médicale.
- La phase post-analytique comprenant la validation et l'interprétation contextuelle du résultat et la communication appropriée du résultat aux cliniciens.

Les phases pré-analytique et post-analytique représentent une source importante des erreurs liées aux examens de biologie médicale (*Figure 1*). En effet, selon une étude de 2007, les phases pré-analytique et post-analytique sont respectivement à l'origine de 61,9 % et 23,1 % des erreurs. Le taux élevé d'erreurs en phase pré-analytique est expliqué par la difficulté de pouvoir contrôler cette phase, car elle est souvent externe au laboratoire, nécessite plusieurs étapes et fait intervenir différents acteurs. La phase analytique est, quant à elle, à l'origine de 15 % des erreurs liées aux examens de biologie médicale. Ce taux d'erreur en phase analytique a considérablement diminué passant de 464 erreurs par million d'examens en 2006 à 617 erreurs par million d'examens en 1996 (12). Ce progrès est lié à une meilleure fiabilité des examens de biologie médicale suite à l'évolution des technologies utilisées pour les méthodes analytiques en laboratoire, l'automatisation et l'harmonisation des méthodes en termes de réactifs et instruments (13). Pourtant, même à faible fréquence, les erreurs en phase analytique peuvent avoir un fort impact sur la prise en charge des patients (14). En effet, la clinique Mayo aux Etats-Unis a montré qu'un biais de 3 % sur le

résultat d'analyse du cholestérol total engendre une augmentation de 10 % du nombre de diagnostics erronés (15).

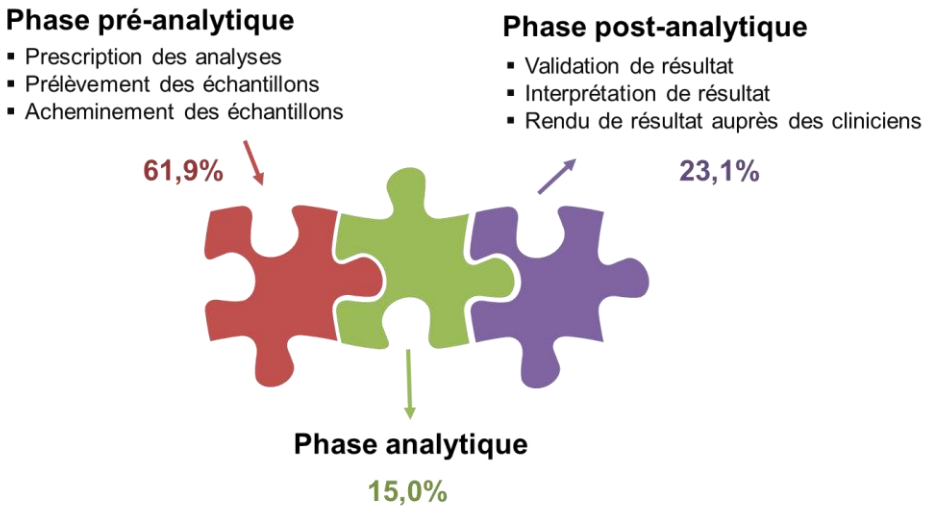


Figure 1. Sources et répartition des erreurs liées aux examens de biologie médicale en 2006 (adapté de *(12)*)

La réalisation d'un examen de biologie médicale est divisée en trois phases : pré-analytique, analytique et post-analytique. Durant chaque phase, des erreurs peuvent se produire. Parmi ces trois phases, la phase pré-analytique introduit 61,9 % des erreurs liées aux examens de biologie médicale devant la phase post-analytique avec 23,1 % et la phase analytique avec 15,0 %.

Par ailleurs, les résultats d'analyse fournis par différents laboratoires utilisant différentes procédures de mesures doivent être comparables pour une bonne prise en charge des patients (16). Les seuils de décision clinique et la stratégie de prise en charge associée à ces seuils sont généralement établis par des experts internationaux en se basant sur des études cliniques, dont les résultats d'analyse sont fournis selon une procédure de mesure donnée. Or, différentes procédures de mesure peuvent coexister sur le marché pour un même analyte. Cela signifie que les recommandations de diagnostic et de prise en charge des patients basées sur une procédure de mesure ne seront pas applicables aux autres procédures de mesure s'il existe une variabilité entre les résultats de mesure (17). De plus, un manque de comparabilité des résultats de mesure associé à une stratégie de mesure différente entre laboratoires et entre pays peut également freiner l'élaboration des guides de santé publique internationaux appropriés (18).

Afin d'améliorer la qualité des soins, nous devons nous assurer de la fiabilité des résultats d'examens de biologie médicale, et de la cohérence et de la comparabilité des résultats obtenus avec différentes méthodes d'analyse et différents laboratoires.

I.2 Assurance qualité en biologie médicale

I.2.1 Contexte normatif et règlementaire

Dans une optique d'amélioration de la fiabilité des examens de biologie médicale, il est possible d'envisager différentes actions relatives à la gestion de la qualité selon les normes internationales et les règlementations. L'organisation internationale de normalisation pour les laboratoires est l'ISO (*International Organization for Standardization*). Plusieurs normes ISO reprises au niveau européen et français visent à assurer la qualité des examens de biologie médicale. Elles s'appliquent non seulement aux laboratoires de biologie médicale (NF EN ISO 15189) mais également aux fabricants de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DIV) (NF EN ISO 17511) et aux laboratoires de référence et d'étalonnage (NF EN ISO/IEC 17025), comme indiqué sur la *Figure 2*.

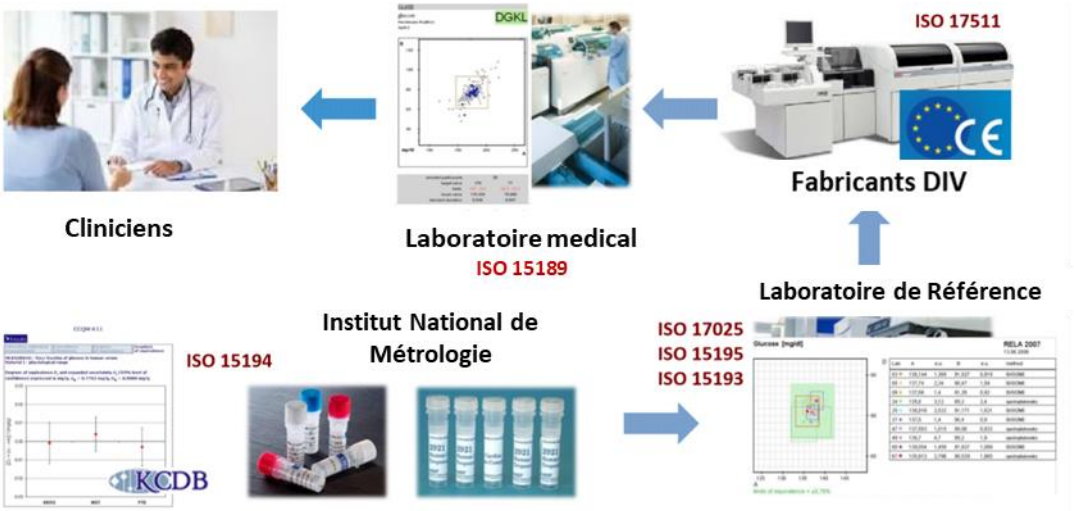


Figure 2. Les différentes normes internationales ISO s'appliquent aux différentes parties prenantes de la chaine de traçabilité métrologique *(19)*

La norme NF EN ISO 15194 définit les exigences concernant les matériaux de référence biologiques. La norme NF EN ISO/IEC 17025 définit les exigences concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. La norme NF EN ISO 15195 définit les exigences relatives à la compétence des laboratoires d'étalonnage utilisant des procédures de mesure de référence en biologie médicale. La norme NF EN ISO 15193 définit les exigences relatives au contenu et à la présentation des procédures de mesure de référence pour le mesurage des grandeurs dans des échantillons biologiques. Quant aux fabricants de DIV, la norme NF EN ISO 17511 définit les exigences pour établir la traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux étalons, aux matériaux de contrôle de la justesse et aux échantillons humains. Au dernier niveau de la chaine de traçabilité métrologique, les LBM doivent respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189.

La norme NF EN ISO/IEC 17025, dont la dernière version a été publiée en 2017, concerne tous les laboratoires effectuant des étalonnages et des essais, y compris l'échantillonnage. Cette norme partage de nombreux points communs avec la norme NF EN ISO 9001, une norme internationale décrivant les exigences relatives au management de la qualité, mais elle inclut une partie concernant les exigences techniques spécifiques

relatives aux essais et étalonnages (personnel, équipement, validation de méthode, traçabilité des mesures…). L'accréditation selon la norme NF EN ISO/IEC 17025 n'est pas obligatoire pour les laboratoires d'étalonnage.

La norme NF EN ISO 17511 décrit les exigences relatives à l'établissement de la traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux étalons et aux matériaux de contrôle de la justesse utilisés par les fabricants de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DIV). Cette norme a été révisée en 2020 afin de décrire des procédés de raccordement alternatifs à l'utilisation de méthodes de référence et de matériaux de référence certifiés lorsque ceux-ci ne sont pas disponibles. En plus des exigences relatives à la norme NF EN ISO 17511, tout dispositif médical de DIV devra prochainement être conforme au règlement 2017/746/EU du Parlement européen, qui remplacera la directive européenne 98/79/CE, pour pouvoir être mis sur le marché de l'Union Européenne. Ce règlement décrit les exigences techniques pour permettre une reconnaissance mutuelle au sein de l'Union Européenne et disposer du marquage CE (conformités à toutes les directives ou règlements concernés) apposé par les organismes notifiés. Comme la norme NF EN ISO 17511 et la directive 98/79/CE, le règlement 2017/746/EU impose que les valeurs attribuées aux étalons et matériaux de contrôle soient établies par des procédures de mesure de référence et/ou des matériaux de référence disponibles avec le plus haut niveau métrologique possible.

La norme NF EN ISO 15189 détaille les exigences relatives à la qualité et à la compétence des laboratoires de biologie médicale (LBM). Cette norme est largement basée sur les normes NF EN ISO/IEC 17025 et NF EN ISO 9001. Ces exigences imposent aux LBM de réaliser non seulement des contrôles de qualité interne (CQI) mais également de participer aux évaluations externes de qualité (EEQ). De plus, selon cette norme, les LMB doivent assurer la traçabilité métrologique des résultats rendus et évaluer les incertitudes de mesure. Pour les examens de biologie médicale délocalisée (EBMD) la norme NF EN ISO 15189 est complétée par la norme NF EN ISO 22870 décrivant les exigences relatives à l'évaluation des compétences du personnel réalisant les EBMD et à la comparabilité des résultats obtenus par les EBMD à d'autres systèmes au sein du LBM.

De plus, les laboratoires réalisant des mesures de référence et les instituts nationaux de métrologie peuvent choisir d'assurer la conformité de leurs activités par rapport aux exigences de la norme NF EN ISO 15195, ainsi que la norme NF EN ISO 15193 sur les procédures de mesure de référence et la norme NF EN ISO 15194 pour la production de matériaux de référence certifiés. Une autre organisation internationale de normalisation pour les laboratoires est le CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institutes*), qui développe des guides et des recommandations pour la gestion de la qualité. Le processus de rédaction de ces documents est identique à celui des normes ISO, en se basant sur le consensus obtenu au sein des groupes de travail. Il peut exister également des normes/règlementations qui sont spécifiques à chaque pays ou régions.

L'application des exigences de l'ensemble de ces normes permet non seulement de fournir une assurance supplémentaire aux patients et aux cliniciens en garantissant la qualité de la mesure, mais également d'améliorer la fiabilité des examens de biologie médicale. En effet, selon une étude autrichienne, l'implémentation du système de qualité selon la norme ISO 15189 ou ISO 9001 a permis une amélioration significative des performances analytiques. Une réduction significative des erreurs a été observée dans les laboratoires après l'accréditation (0,7 % après l'accréditation contre 1,3 % avant l'accréditation) (20).

Concernant les LBM en France, différentes démarches ont été implémentées afin d'assurer la qualité des examens réalisés et la fiabilité des résultats fournis. Dans le cadre de la réforme de la biologie prévue par la loi « Hôpitaux, Patients, Santé et Territoire, HPST », l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 a initié l'exigence d'accréditation pour tous les LBM (accréditation établie ou démarche d'accréditation engagée). L'accréditation des LBM a été ensuite rendue obligatoire en 2013 par le Code de la santé publique (Article L. 6221-1) : « Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation ». L'accréditation selon la norme ISO 15189 est délivrée sur demande du LBM par le Comité français d'accréditation (COFRAC), unique organisme compétent en matière d'accréditation en France. Elle porte sur toutes les phases de l'ensemble des examens de biologie médicale réalisés, non seulement sur la phase analytique mais également sur les phases pré-analytiques et post-analytiques. Dans les autres pays européens, l'accréditation de tout ou partie de l'activité des LBM est de plus en plus exigée car elle facilite la reconnaissance mutuelle des prestations réalisées par les organismes accrédités à l'échelle européenne. Elle est devenue obligatoire dans plusieurs Etats Européens. Cependant, certains Etats ont fait le choix de restreindre l'obligation d'accréditation à certaines analyses, comme la Belgique (analyses moléculaires), la République Tchèque (analyses génétiques), l'Allemagne (dépistage néonatal), l'Irlande (analyses d'immunohématologie) et la Serbie (recherche des agents mutagènes du génome humain en conséquence de radioactivité). Seuls trois Etats membres de l'UE, dont la Hongrie, la Lettonie et La France, ont fait le choix d'accréditer la totalité des examens de biologie médicale (21).

I.2.2 Contrôle qualité dans les laboratoires de biologie médicale

Le processus de contrôle qualité fait partie de la gestion de la qualité et est exigé par la norme NF EN ISO 15189 dans les LBM. L'utilisation du contrôle qualité a pour but « de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue » et ainsi de corriger tous problèmes éventuels durant la phase analytique. Il y a deux types de contrôle qualité : CQI et EEQ.

Le CQI est une évaluation réalisée au sein du laboratoire pour vérifier la conformité du processus analytique par rapport aux critères de performances et d'acceptabilité établis préalablement. Il est préférable que les caractéristiques des échantillons de contrôle soient

les plus proches possibles de celles des échantillons biologiques analysés et couvrent plusieurs niveaux de concentration pour une vérification de la totalité de la gamme de concentration de mesure (22). La principale vocation des CQI consiste à détecter une éventuelle dérive dans les performances d'un dispositif de DIV et dans certains cas évaluer la fidélité intermédiaire des dosages.

L'EEQ est une évaluation du LBM par rapport à l'ensemble de ses pairs, organisée par un organisme extérieur, elle consiste à envoyer le même échantillon à l'ensemble des laboratoires inscrits à cette EEQ. Le terme test d'aptitude ou « comparaison inter laboratoire » est parfois utilisé pour remplacer le terme EEQ. La participation aux EEQ est obligatoire pour les LBM afin d'identifier un défaut de performance des dispositifs de DIV utilisés. En France, les EEQ ont tout d'abord été préconisées dans le guide GBEA sous la forme de Contrôle de Qualité National, puis exigées par la norme NF EN ISO 15189 : « Le laboratoire doit participer à des comparaisons inter-laboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité. La direction du laboratoire doit surveiller les résultats de l'évaluation externe de la qualité et participer à la mise en œuvre des actions correctives lorsque les critères de maîtrise ne sont pas respectés ».

Les organismes d'EEQ produisent et fournissent le même échantillon de contrôle à tous les laboratoires participants dans le but de juger la comparabilité des résultats entre participants. Il est possible distinguer différentes catégories d'EEQ selon que la commutabilité de l'échantillon de contrôle (capacité à avoir le même comportement d'échantillons natifs de patients, voir section A.I.3.3) est connue ou non, selon que la valeur cible est déterminée par une procédure de mesure de référence ou non, et selon que l'échantillon est analysé une ou plusieurs fois (*Tableau 1*).

Tableau 1. Différentes catégories d'évaluations externes de qualité *(23)*

Catégorie d'EEQ	Caractéristiques de l'échantillon de contrôle		
	Commutabilité de l'échantillon contrôle	Valeur cible selon la procédure de référence	Répétabilité de mesure
1	✓	✓	✓
2	✓	✓	✗
3	✓	✗	✓
4	✓	✗	✗
5	✗	✗	✓
6	✗	✗	✗

En fonction du choix de l'échantillon de contrôle utilisé, l'objectif d'une EEQ peut être différent. Dans le cas idéal, l'échantillon de contrôle utilisé est commutable selon les recommandations de la norme NF EN ISO 15189 (voir section A.I.3.3) et il existe une

procédure de mesure de référence pour déterminer la valeur cible de l'échantillon de contrôle. C'est le cas des EEQ de catégories 1 et 2 qui vont permettre une évaluation de la justesse des procédures de mesure par rapport à une procédure de mesure de référence. Cependant, dans la plupart des cas, il est difficile de mener des EEQ de catégories 1 et 2 car il n'existe pas de procédures de mesure de référence disponibles pour tous les analytes et la commutabilité des échantillons de contrôle est rarement évaluée. Dans le cas des EEQ de catégories 3 et 4, où une méthode de référence n'a pas été utilisée pour déterminer les valeurs cibles, mais où la commutabilité de l'échantillon de contrôle est démontrée, la comparabilité des résultats fournis par les différents laboratoires peut être évaluée, même s'ils n'utilisent pas la même méthode de dosage. Il n'est en revanche pas possible d'évaluer la justesse des résultats et la valeur cible associée à l'échantillon de contrôle est une valeur consensuelle qui correspond soit à la moyenne des résultats produits par tous les participants, soit à la moyenne des résultats produits par les participants utilisant une méthode donnée ou un groupe de méthodes (groupe de pairs). L'inconvénient de cette approche est que la différence entre le résultat fourni par un laboratoire et la valeur cible ne peut pas être interprétée en termes de biais car la valeur consensuelle est susceptible d'être biaisée. Cela est par exemple le cas, lorsque la majorité des résultats présente une erreur systématique par rapport à la concentration réelle de l'échantillon. Les deux dernières catégories 5 et 6 correspondent à l'utilisation des EEQ utilisant des échantillons de contrôle non commutables. La comparaison des résultats entre les différents laboratoires ne peut être évaluée qu'au sein d'un groupe de pairs, c'est-à-dire les laboratoires qui utilisent une même procédure de mesure. Les EEQ de catégories 5 et 6 sont les plus fréquentes (24) et ne permettent pas d'évaluer la comparabilité des résultats obtenus entre différentes procédures de mesure : elles permettent uniquement de comparer les résultats d'un laboratoire avec ceux de ces pairs, ce qui permet d'estimer la reproductibilité d'une procédure de mesure. De plus, si le nombre des mesures est répété (catégories 1, 3 et 5), la répétabilité moyenne peut être évaluée.

Selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189, les LBM doivent assurer la comparabilité des résultats de mesure avec leurs pairs via les EEQ mais également assurer la traçabilité de leurs résultats de mesure.

I.3 La métrologie en biologie médicale

I.3.1 Traçabilité métrologique

Dans le contexte règlementaire décrit précédemment, la traçabilité métrologique, c'est-à-dire le raccordement des résultats de mesure à un étalon national ou international, est exigée par la norme NF EN ISO 15189 pour les LBM, la norme NF EN ISO 17511 et le règlement européen 2017/746/EU pour les fabricants de DIV. La traçabilité métrologique est définie dans le guide NF ISO/IEC 99:2007 plus connu sous le Vocabulaire International de Métrologie (VIM) JCGM 200 : 2012 comme la « propriété d'un résultat de mesure selon

laquelle ce résultat peut être relié à une référence par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue et documentée d'étalonnage dont chacun contribue à l'incertitude de mesure » (25). La traçabilité s'appuie donc sur la notion d'étalonnage, dont la définition (VIM) est comme « une opération qui dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesure associées qui sont fournies par des étalons et les indications correspondantes avec les incertitudes associées, puis utilise en une seconde étape cette information pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une indication » (26).

La chaîne de traçabilité métrologique pour les analyses en biologie médicale est constituée d'une hiérarchie d'étalonnage répartie en trois niveaux (*Figure 3*). Les LBM délivrant les résultats de mesure des patients constituent le premier niveau de cette chaîne. Le niveau intermédiaire implique les fabricants de dispositifs médicaux de DIV. Enfin, les instituts nationaux de métrologie et les laboratoires de référence nationaux constituent le dernier niveau. La traçabilité des résultats rendus par un LBM dépend donc de la manière avec laquelle la traçabilité est établie aux niveaux supérieurs.

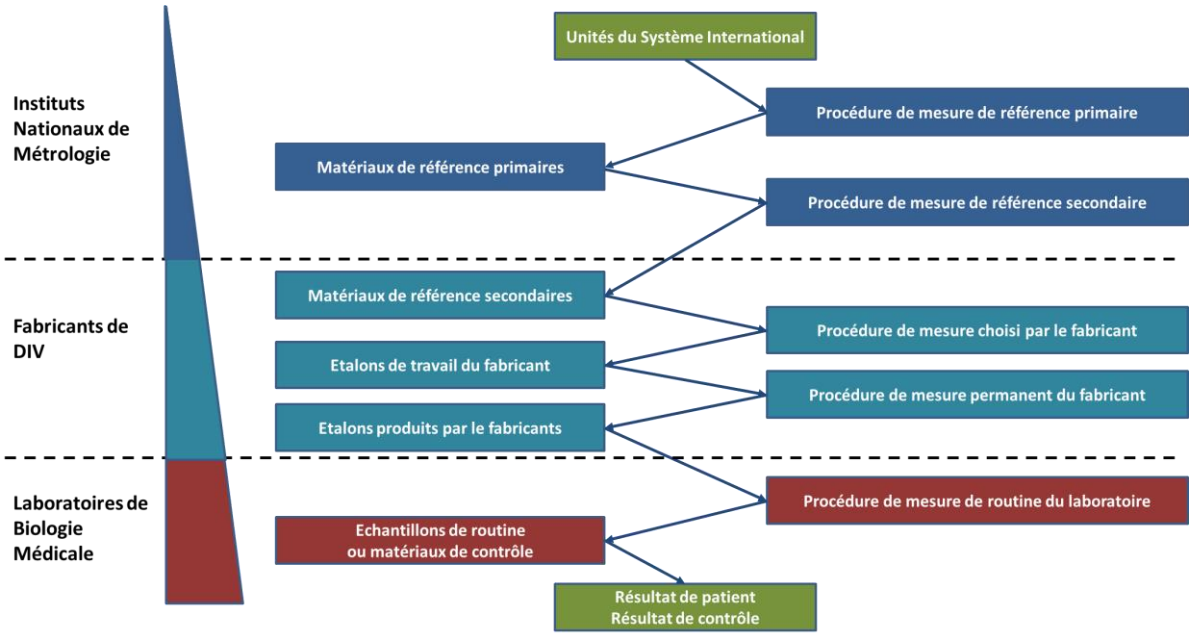


Figure 3. Chaîne de traçabilité métrologique

Une chaine de traçabilité est constituée d'une succession d'étalons et d'étalonnages reliant le résultat de mesure à une référence nationale ou internationale. Chaque étalonnage contribue aux incertitudes de mesure finales. (DIV : diagnostic in vitro)

La procédure de mesure primaire occupe le niveau métrologique le plus élevé de la chaîne de traçabilité et permet le raccordement des résultats aux unités SI. Cette procédure permet d'assigner des valeurs à des matériaux de référence primaires, dont la pureté est connue avec une incertitude associée. Ce matériau est à son tour utilisé pour étalonner la procédure de mesure de référence secondaire. Pour étalonner leur procédure de mesure, les fabricants de dispositif médicaux de DIV doivent, lorsqu'ils sont disponibles, utiliser des

matériaux de référence secondaires certifiés par la procédure de mesure de référence secondaire. Généralement, les fabricants n'utilisent pas directement les matériaux de référence secondaires disponibles pour l'étalonnage de la procédure de mesure commercialisée, mais produisent des étalons de transfert, ainsi que des étalons qui seront commercialisés et utilisés dans les LBM. Cette hiérarchie permet donc d'assurer la traçabilité métrologique des résultats de mesure dans les LBM. Il est primordial d'assurer la documentation de chaque étalonnage et le lien ininterrompu jusqu'à la référence. Si une étape (procédure de mesure ou étalon) est manquante, toutes les mesures situées au-dessous de cette étape ne seront pas traçables aux unités SI.

L'incertitude de mesure doit être estimée selon une méthode définie et être incluse dans chaque étape d'étalonnage de la chaîne de traçabilité métrologique. Par effet de cascade, l'incertitude de mesure à un niveau donné de la chaîne de traçabilité métrologique prend en compte l'ensemble des incertitudes de mesure des niveaux supérieures. Celle-ci sera donc de plus en plus grande en descendant la chaîne de traçabilité (*Figure 3*). Selon les recommandations COFRAC, l'incertitude de mesure peut être déterminée selon différentes méthodes (27). Une première méthode est décrite par le guide pour l'expression de l'incertitude de mesure communément appelé GUM (28). La méthode GUM est une méthode de référence qui est basée sur l'établissement d'un modèle mathématique prenant en compte toutes les composantes d'incertitude du processus de mesure. Il faut donc modéliser et quantifier préalablement l'ensemble des paramètres intervenant dans le calcul du résultat. D'autres méthodes s'appuyant sur les résultats d'évaluation des CIQ sont également utilisées. Il existe des approches combinant les incertitudes liées à la fidélité intermédiaire (estimée via les CIQ), les incertitudes associées aux modèles d'étalonnage et l'incertitude associée à la justesse de mesure (établie à partir des matériaux de référence ou par une procédure de référence d'incertitude connue). Il existe également des approches combinant les incertitudes liées à la fidélité intermédiaire (obtenue par les évaluations CIQ) et à la justesse (obtenue par les évaluations EEQ) et des approches combinant les incertitudes liées à la fidélité intermédiaire (obtenue par les CIQ) et les incertitudes liées aux étalons du système analytique (étalons fournisseurs).

Dans le but d'assurer et d'améliorer la fiabilité des examens de biologie médicale et la traçabilité métrologique aux unités SI des résultats fournis aux patients, il est nécessaire donc d'avoir des matériaux de référence certifiés et des procédures de mesure de référence.

I.3.2 Matériaux de référence certifiés et procédures de mesure de référence

Un matériau de référence est un matériau dont les propriétés spécifiques sont suffisamment homogènes et stables. Un matériau de référence certifié (MRC) est défini dans le VIM JCGM 200 : 2012 comme « un matériau de référence, accompagné d'une documentation délivrée par un organisme faisant autorité et fournissant une ou plusieurs valeurs de propriétés spécifiées avec les incertitudes et les traçabilités associées, en utilisant

des procédures valables » (25). Les MRC peuvent être séparés en deux catégories : les MRC primaires et secondaires. Un MRC primaire est un matériau sans matrice contenant un analyte d'intérêt pur, ou un mélange d'analytes d'intérêt, sous forme lyophilisée ou en solution et dont la concentration/fraction du ou des analytes d'intérêt est connue avec une incertitude associée. Comme précédemment, un MRC primaire est le premier maillon de la chaîne de traçabilité mettant en jeu les différents étalons utilisés entre la procédure de mesure de référence secondaire et la procédure de mesure de routine. Afin d'obtenir une incertitude minimale satisfaisante pour les résultats de patient ou de contrôle en bas de la chaîne de traçabilité, il est important donc d'assurer une incertitude très faible pour le MRC.

Un MRC secondaire est généralement un matériau en matrice qui peut être utilisé non seulement pour étalonner les procédures de mesure de fabricants afin d'assurer une traçabilité métrologique du résultat de mesure, mais également pour évaluer la justesse et/ou la comparabilité des résultats obtenus entre les différentes procédures de mesure (via une évaluation EEQ). Dans les deux cas, une caractéristique indispensable des MRC secondaires est la commutabilité afin d'assurer la capacité de ces matériaux à mimer un échantillon réel (voir I.3.3). Comme pour tous matériaux de référence, une valeur de référence pour un analyte d'intérêt ou un mélange d'analytes d'intérêt doit être déterminée avec une incertitude associée.

Une procédure de mesure de référence est définie dans le VIM JCGM 200 : 2012 comme une « procédure de mesure considérée comme fournissant des résultats de mesure adaptés à leur usage prévu pour l'évaluation de la justesse des valeurs mesurées obtenues à partir d'autres procédures de mesure pour des grandeurs de la même nature, pour un étalonnage ou pour la caractérisation de matériaux de référence » (25). De même que les matériaux de référence, il existe deux catégories : les procédures de mesure de référence primaires et secondaires.

La procédure de mesure primaire permet d'obtenir « un résultat de mesure sans relation avec un étalon d'une grandeur de même nature » (25). Ce sont des procédures utilisées pour caractériser les puretés des étalons primaires ou définir la fraction d'une solution. A ce jour, les méthodes suivantes sont considérées comme des méthodes primaires pour déterminer la quantité de matière dans un échantillon :

- La gravimétrie, qui consiste à peser la quantité de matière. Elle est souvent utilisée pour la préparation des étalons en solution.
- La titrimétrie volumique, qui consiste à mesurer la quantité de matière d'un échantillon par le volume d'une solution de réactif titrant ayant une concentration connue.
- La coulométrie, qui consiste à quantifier la quantité de matière d'un échantillon en mesurant la quantité d'électricité consommée ou produite lors d'une réaction d'oxydoréduction.

- La calorimétrie, qui consiste à quantifier la quantité de matière par un calorimètre thermodynamique isolé en mesurant la quantité de chaleur dégagée ou absorbée d'un échantillon dans certaines conditions.
- La dilution isotopique couplée à la spectrométrie de masse, qui consiste à déterminer la quantité de matière d'un échantillon via un rapport de signaux détectés entre l'analyte à quantifier et un étalon interne marqué isotopiquement. En dehors du cadre d'une méthode primaire, elle peut également être utilisée comme une méthode secondaire dans le cadre d'une quantification d'un échantillon en matrice. Cette méthode sera détaillée dans la section A.IV.3.2.2.
- L'analyse par activation de neutrons, qui est une méthode d'analyse élémentaire qui consiste à identifier les isotopes radioactifs créés à partir des éléments à doser après avoir irradié l'échantillon par un flux de particules appropriées, neutrons, particules chargées.
- La spectrométrie à cavité optique, qui consiste à détecter les effets induits par l'absorption de la lumière laser d'un échantillon placé à l'intérieur d'une cavité hautement réfléchissante.

Les matériaux de référence ainsi que les procédures de mesure de référence disponibles en biologie médicale sont répertoriés par le Joint Commitee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), créé en 2002 suite à l'application de la Directive européenne 98/79/EC. Environ 4000 analytes sont mesurés en routine dans les LBM (29). Pourtant, la majorité de ces analytes font l'objet d'examens dont les résultats ne présentent pas encore de traçabilité métrologique en raison de l'absence de matériaux de référence certifiés ou de procédures de mesure de référence reconnues internationalement. En effet, selon la base de données du JCTLM actualisée en avril 2019, seulement 303 matériaux de référence certifiés pour 170 analytes différents et 201 procédures de mesure de référence pour 90 analytes différents sont référencés. 40 MRC (pour 29 protéines) et 23 procédures de mesure (pour 19 protéines) sont disponibles pour des analytes de type protéique (30).

I.3.3 Commutabilité

La commutabilité est définie dans le VIM comme « la propriété d'un matériau de référence, exprimée par l'étroitesse de l'accord entre, d'une part, la relation entre les résultats de mesure obtenus pour une grandeur déterminée de ce matériau en utilisant deux procédures de mesure données et, d'autre part, la relation entre les résultats de mesure pour d'autres matériaux spécifiés » (25). En fait, la commutabilité caractérise l'équivalence de la relation mathématique entre les résultats de mesure obtenus en analysant d'une part un matériau de référence et d'autre part des échantillons natifs de patients analysés avec un panel donné de procédures de mesure. Si un matériau de référence est démontré commutable pour un panel donné de procédures de mesure de performances analytiques équivalentes, il peut alors être utilisé pour étalonner ces procédures, à condition que

certaines exigences soient respectées telles que sa stabilité, son homogénéité et les performances analytiques de la méthode de référence utilisée pour certifier la concentration de l'analyte. Le résultat de mesure obtenu avec l'une de ces procédures pour un échantillon donné est alors équivalent à ceux obtenus avec les autres procédures au sein de ce panel si les procédures concernées présentent une sélectivité et une fidélité équivalentes. En revanche, si le matériau de référence est non commutable, les différentes procédures de mesures ne peuvent pas produire des résultats équivalents pour un échantillon de patient donné et ce même si les fabricants montrent un raccordement métrologique des résultats de mesure. Par exemple, une étude menée dans 10 laboratoires en Espagne a montré un désaccord entre les résultats de mesure de 10 analytes sur les 26 analysés. La principale raison est la non-commutabilité des matériaux de référence certifiés utilisés pour établir le raccordement métrologique des valeurs associées aux étalons (31). Un matériau de référence peut également être utilisé comme échantillon de contrôle de qualité pour évaluer l'exactitude des résultats de mesure. Dans ce cas, il est également impératif que le matériau utilisé soit commutable. En effet, un contrôle national de qualité mené en France par l'ANSM en 2012, qui impliquait tous les LBM réalisant des dosages de créatinine, a montré que l'utilisation d'échantillons de contrôle non commutables pouvait entrainer un biais de 50 % par rapport à la valeur réelle pour une méthode donnée (32).

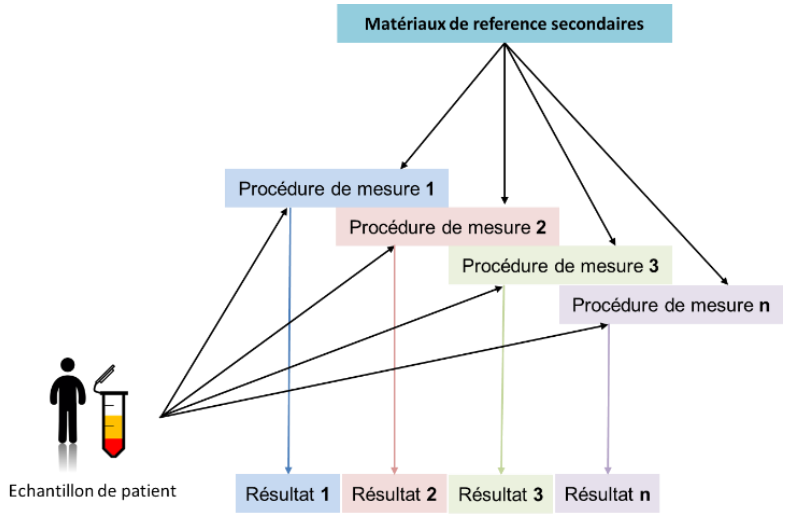


Figure 4. Influence de matériaux de référence secondaires non-commutables

Matériau de référence secondaire utilisé en tant qu'étalon pour étalonner les procédures de mesure du fabricant de méthode de routine (procédures de mesure 1, 2, …, n), si le matériau de référence n'est pas commutable avec les échantillons de patients, des résultats de mesure (résultat 1, 2, …, n) non équivalents peuvent être produits. Il est donc primordial que le matériau de référence soit commutable pour chaque procédure de mesure afin d'assurer la comparabilité des résultats.

La commutabilité d'un matériau de référence est une caractéristique inhérente à un matériau et dépend des procédures de mesures impliquées. Par conséquence, un matériau de référence peut être commutable pour une procédure mais pas pour une autre. L'évaluation de la commutabilité d'un matériau de référence repose donc sur la construction d'une relation numérique entre les résultats de mesures sur des échantillons natifs par un panel de procédures de mesure pour lequel on souhaite évaluer la commutabilité de ce matériau de référence. Le matériau est considéré commutable si son comportement est comparable à celui des échantillons natifs, c'est-à-dire s'il se trouve, soit dans un intervalle de prédiction à 95 % de la distribution des échantillons natifs (*Figure 5.A*) selon les recommandations CLSI C53-A (33), soit dans un intervalle d'acceptation établie préalablement selon les recommandations du groupe de travail IFCC sur la commutabilité (*Figure 5.B*) (34). L'intervalle d'acceptation dépend non seulement de l'implication en clinique de l'analyte mais également de l'utilisation finale des matériaux à évaluer.

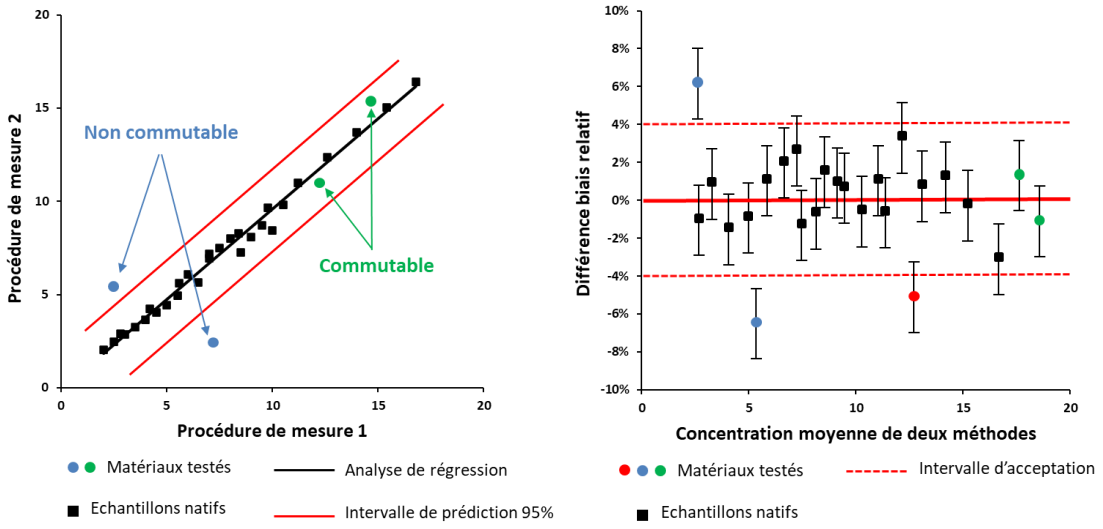


Figure 5. Principe de l'évaluation de la commutabilité d'un matériau de référence

(A) Par l'approche de régression linéaire selon les recommandations CLSI C53-A : une régression linéaire est établie à partir des résultats de mesure par deux procédures de mesure sur au moins 20-25 échantillons natifs. Seuls les matériaux de références compris dans l'intervalle de prédiction à 95% sont commutables (Points verts). Pour les matériaux de référence non commutables (Points bleus), la relation entre les résultats obtenus de deux procédures de mesure est différente de celle observée pour les échantillons natifs.
(B) Par l'approche de différence biais relatif selon les guidelines IFCC WG-C : la différence biais relatif est obtenue à partir des résultats de mesure par deux procédures de mesure sur au moins 20-25 échantillons natifs. Seuls les matériaux de référence compris dans l'intervalle d'acceptation sont commutables (Points verts).

La prédiction de la commutabilité d'un matériau n'est pas possible. Seul, un échantillon de patient frais non modifié est commutable par définition. Toutefois, il est difficile de collecter

un volume suffisant qui permette d'assurer la disponibilité prolongée d'un étalon secondaire ou de permettre l'analyse du même échantillon par l'ensemble des participants d'un contrôle externe de qualité dans le cas d'un échantillon de contrôle de qualité. Le recours à un mélange de plusieurs échantillons natifs est donc souvent une nécessité mais peut engendrer des effets de matrice. Par ailleurs, de nombreuses autres altérations de la matrice sont également susceptibles de compromettre la commutabilité de l'échantillon. Par exemple, le processus de lyophilisation (35,36), l'ajout d'agents stabilisants (37) ou l'ajout de composés exogènes afin d'augmenter la concentration de l'analyte d'intérêt peuvent engendrer des effets de matrices susceptibles d'impacter certaines méthodes plus que d'autres.

I.3.4 Standardisation/Harmonisation

Bien que l'ensemble des termes métrologiques soient définis dans le VIM, la communauté de la « biologie médicale » a en parallèle défini/mis en œuvre certains concepts tels que la standardisation et l'harmonisation. Bien que ces notions ne soient pas définies dans le VIM, elles peuvent parfois se rapprocher de certaines définitions.

Le processus de standardisation et d'harmonisation consiste à assurer la comparabilité des résultats entre les procédures de mesure. Dans ce manuscrit, les termes « standardisation » et « harmonisation » sont issus d'une traduction littérale des termes anglophones « standardization » et « harmonization » utilisés pour les résultats d'examens de biologie médicale.

La comparabilité des résultats de mesures est obtenue grâce à une chaîne de traçabilité métrologique. Le processus de standardisation assure une traçabilité métrologique complète aux unités du SI ou à tout autre étalon d'ordre supérieur alors que le processus d'harmonisation assure une traçabilité métrologique des résultats de mesure à un étalon consensuel dont la valeur est assignée par une procédure de mesure désignée qui n'est pas une procédure d'ordre supérieur. Le processus d'harmonisation est considéré comme une alternative du processus de standardisation.

Le processus de standardisation des mesures permet non seulement d'avoir une interprétation clinique correcte et une comparabilité des résultats d'analyse à la fois dans le temps et dans l'espace, mais également de pouvoir comparer les résultats des études cliniques ou épidémiologiques menées dans différents pays. Cela permet d'améliorer le système de santé. Par exemple, l'implémentation de la chaîne de traçabilité pour les mesures de cholestérol a contribué à réduire les coûts de 100 millions de dollars par an en diminuant la variabilité entre les résultats de 18 % à moins de 5 % (38). La standardisation est un processus global et souvent long qui nécessite les contributions de plusieurs parties prenantes : les INMs et les laboratoires de référence et d'étalonnage, les fabricants de DIV, les organisateurs d'EEQ, les LBM, les cliniciens, les biologistes et les autorités de santé (39).

De plus, la standardisation est accomplie quand les deux conditions additionnelles suivantes sont réunies : la définition claire du mesurande afin de s'assurer que les différentes méthodes mesurent le même analyte et les connaissances techniques permettant de développer des matériaux de référence et des procédures de mesure de référence présentant des performances analytiques appropriées (18). A ce jour, il est possible de raccorder les résultats de mesure aux unités SI pour les analytes de petite taille comme certaines vitamines ou électrolytes car la définition du mesurande est moins complexe. Cependant, dans le cas d'analytes plus complexes pouvant être présents sous différentes formes (e.g. protéines avec différents degrés de structure et des modifications post traductionnelles), la définition du mesurande devient délicate. Par conséquent, en fonction de la sélectivité des différentes procédures de mesure impliquées, différentes formes peuvent être mesurées. Dans ces situations, le mesurande est défini par consensus entre plusieurs parties prenantes. Cependant, dans la plupart des cas, même si le mesurande est bien défini, la traçabilité des résultats peut ne pas être assurée aux unités SI (18). En effet, un matériau pur de l'analyte peut être produit mais la mesure et la certification de sa pureté n'est pas toujours possible en raison des limites et contraintes techniques. Dans ce cas, l'harmonisation constitue une approche alternative pouvant être implémentée plus facilement pour établir la comparabilité des résultats sans pour autant établir la traçabilité des résultats aux unités SI (40).

Chapitre II
Sepsis et résistance aux antibiotiques

II.1 Sepsis 26
II.1.1 Historique et définition 26
II.1.2 Epidémiologie 30
II.1.3 Etiologie 32
II.1.4 Physiopathologie et conséquences du sepsis 32
II.1.5 Diagnostic du sepsis 36
II.1.6 Prise en charge thérapeutique des patients 39
II.2 Résistance aux antibiotiques 40
II.2.1 Antibiothérapie 40
II.2.2 Résistance aux antibiotiques 42
II.2.3 Consommation des antibiotiques et risque de développer une résistance aux antibiotiques 42
II.2.4 Antibiothérapie et résistance aux antibiotiques dans le cadre du sepsis 45

II.1 Sepsis

II.1.1 Historique et définition

En Grec ancien, le terme sepsis dérive du mot grec ‘‘putréfaction’’ qui signifie la décomposition des matières organiques, végétales ou animales par la présence de bactéries (41). Le sepsis a été décrit médicalement pour la première fois par Hippocrate dans son corpus hippocratique entre les années 460-370 av. J.-C. comme une dégradation dangereuse et odorante des tissus biologiques dans le corps humain (42,43). Plus tard, Celsus (1er siècle) et Galen (2ème siècle) ont décrit les signes d’une inflammation sous forme de vasodilatation périphérique, de fièvre, de douleur, d’augmentation de la perméabilité capillaire et de dysfonctionnement d’organes (44). En 1879-1880, Louis Pasteur a montré pour la première fois la présence de bactéries dans la circulation sanguine chez les patients présentant une septicémie puerpérale. La première définition moderne et scientifique du sepsis a été proposée par le Dr. Schottmuller en 1914. Le sepsis est alors défini comme une dissémination dans la circulation sanguine d’agents pathogènes à partir d’un foyer infectieux provoquant des symptômes systémiques dans les organes lointains (45). Pourtant, le sepsis reste difficile à définir du fait de sa complexité, et sa définition a évolué dans le temps avec le progrès des connaissances médicales et de la compréhension de sa physiopathologie.

En 1991, le Collège Américain des pneumologues (ACCP pour *American College of Chest Physicians*) et la Société de médecine des soins intensifs (SCCM pour *Society of Critical Care Medicine*) ont défini le sepsis comme une réponse inflammatoire systémique de l’organisme à une infection. Une conférence de consensus a également proposé une classification dont l’objectif était de différencier les processus infectieux et non infectieux (*Figure 6*) (46). Selon cette classification, quatre conditions ont été définies selon leur sévérité : le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS), le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique.

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique est déclenché par différentes conditions infectieuses ou non infectieuses. Il est diagnostiqué quand le patient présente au moins deux des éléments clinico-biologiques suivants :

- Une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C,
- Une fréquence cardiaque supérieure à 90 battements/minute,
- Une fréquence respiratoire supérieure à 20/min ou une pression artérielle en CO_2 inférieure à 32 mmHg,
- Une numération de leucocytes supérieure à 12000/µL ou inférieure à 4000/µL ou il y a plus de 10 % des formes immatures des leucocytes.

Le sepsis est, quant à lui, une situation clinique qui regroupe à la fois le SRIS et une infection probable. Le sepsis sévère est diagnostiqué lorsqu’un sepsis est accompagné d’une défaillance d’organe, une hypoperfusion ou une hypotension. Enfin, le choc septique est un

sepsis sévère associé à une hypotension réfractaire et/ou à la nécessité d'introduire des vasopresseurs et/ou à une lactatémie supérieure 4 mmol/L.

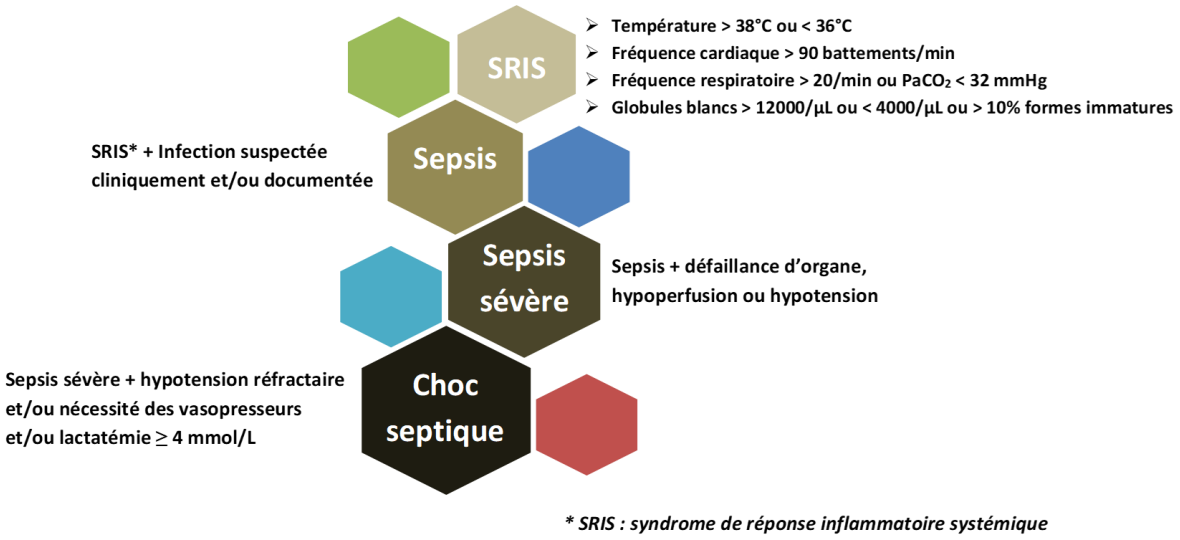


Figure 6. Classification des conditions infectieuses ou non-infectieuses liées à un sepsis selon le premier consensus international en 1991 *(46)*.

Quatre conditions sont présentées, classées en fonction de leur sévérité. La première condition est le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Lorsqu'il est accompagné d'une infection, le diagnostic du sepsis est établi. Le sepsis peut s'aggraver et évoluer vers deux formes plus sévères : le sepsis sévère et le choc septique.

La première définition de 1991 décrite ci-dessus a permis aux cliniciens de faciliter le diagnostic du sepsis par les éléments cliniques principaux. Pourtant elle présente des limitations. En effet, l'évaluation de « deux éléments sur quatre » pour déterminer le SRIS est arbitraire et non spécifique selon Mayr *et al.* (47), en particulier en service de réanimation où la majorité des patients présente ces éléments clinico-biologiques. Par ailleurs, dans certains cas, les patients ont à l'évidence des signes d'une infection grave mais des critères de SRIS non remplis. De plus, l'évaluation des biomarqueurs comme l'interleukine IL-6, la procalcitonine ou la protéine C-réactive (CRP) n'est pas abordée dans cette définition (47).

Cette classification a été actualisée lors de la deuxième conférence internationale de définition du sepsis en 2001, réunissant les experts de cinq sociétés : l'ACCP, la SCCM, la société européenne de médecine de soins intensifs (ESICM pour *European Society of Intensive Care Medicine*), la société américaine thoracique (ATS pour *American Thoracic Society)* et la société des infections chirurgicales *(SIS pour Surgical Infection Society)* (48). Ce deuxième consensus a introduit un système de classification des patients par stade de gravité, et définit le sepsis comme une situation clinique associée à une lésion d'organe, définition similaire à celle du sepsis sévère élaborée en 1991. Pourtant les nouveaux critères diagnostiques ne modifient pas complètement ceux proposées en 1991. Par ailleurs, la

deuxième définition a introduit une confusion dans la classification entre le sepsis et le sepsis sévère (43).

Une troisième définition internationale du sepsis (SEPSIS-3), basée sur le dysfonctionnement d'organe et le niveau de mortalité observé, a été présentée lors d'un groupe de travail des sociétés ESICM et SCCM en 2016 (49) (*Figure 7*). Ainsi, le sepsis est défini comme une réponse dérégulée de l'organisme à une infection entrainant la perte de fonction des organes et un risque vital pour le patient. Selon cette nouvelle définition, il n'y a plus de distinction entre le sepsis et le sepsis sévère, la défaillance d'organe est incluse dans la définition du sepsis. En pratique, le dysfonctionnement d'organe est identifié à l'aide d'un score d'évaluation séquentielle des défaillances d'organes (SOFA pour Sequential Organ Failure Assessement) calculé en évaluant la gravité de l'altération des fonctions vitales principales du patient : fonction respiratoire, coagulation, fonction hépatique, fonction cardiovasculaire, fonction neurologique et fonction rénale (*Tableau 2*). Une augmentation d'au moins 2 points du score SOFA, en supposant que le score SOFA de base est zéro en l'absence de dysfonction d'organe préexistante, aigue ou chronique, permet de mettre en évidence un sepsis. Selon la définition SEPSIS-3, le choc septique est une complication grave du sepsis, et est caractérisé par une défaillance hémodynamique avec nécessité d'administrer des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg ou une concentration sanguine d'acide lactique supérieure à 2 mmol/L malgré un remplissage vasculaire initial bien conduit.

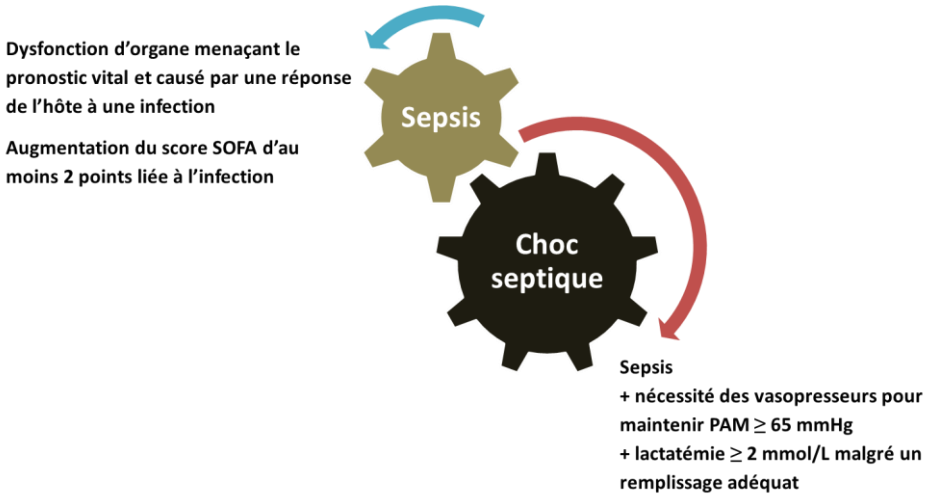


Figure 7. Classification des états septiques selon la troisième définition internationale SEPSIS-3 en 2016 *(49)*

La définition SEPSIS-3 classe le sepsis en deux catégories (sepsis et choc septique) selon le dysfonctionnement d'organe et le niveau de mortalité observé chez les patients. Le sepsis est diagnostiqué lorsqu'il y a une augmentation de 2 points du score d'évaluation séquentielle des défaillances d'organes (SOFA) obtenu à partir de l'évaluation des fonctions vitales principales du patient. Le choc septique, est diagnostiqué lorsque le sepsis est accompagné d'une défaillance hémodynamique.

Tableau 2. Calcul du score SOFA à partir de l'évaluation des fonctions vitales principales

Score SOFA	0 point	1 point	2 points	3 points	4 points
Fonction respiratoire					
PaO2/FiO2, mmHg (kPa)	≥ 400 (53,3)	< 400 (53,3)	< 300 (40)	< 200 (26,7) et VA	< 100 (13,3) + VA
Coagulation					
Plaquettes, x 10^3/µL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Fonction hépatique					
Bilirubine, mg/dL (µmol/L)	< 1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
Fonction cardiovasculaire					
Hypotension (mmHg pour la pression, µg/kg/min pour les amines)	PAM ≥ 70	PAM < 70	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose)	Dopamine > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradrénaline ≤ 0,1	Dopamine > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradrénaline > 0,1
Fonction neurologique					
Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Fonction rénale					
Créatinine, mg/L (µmol/L)	< 12 (110)	12-19 (110-170)	20-34 (171-299)	35-49 (300-440)	> 50 (440)
Diurèse, mL/jour				< 500	< 220

PaO2 : pression artérielle en oxygène ; FiO2 : fraction inspirée en oxygène ;
VA : ventilation assistée ; PAM : pression artérielle moyenne (estimée par (PAS + 2xPAD)/3) ;
PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ;
Amines (dopamine, dobutamine, adrénaline, noradrénaline) : dose en µg/kg/min

L'évaluation du score SOFA est appliquée en routine en réanimation pour le diagnostic du sepsis. Ce score est facilement calculé mais il nécessite de réaliser des prélèvements multiples. Cette procédure n'est donc pas compatible avec un besoin de diagnostic rapide en cas de sepsis. Par conséquent, le groupe d'experts réuni dans le groupe de travail sur la définition du SEPSIS-3 a également proposé un second score SOFA permettant de diagnostiquer rapidement les patients à risque et de débuter précocement une antibiothérapie (qSOFA pour quick SOFA). Le score qSOFA est déterminé à partir de trois variables cliniques simples : une pression artérielle systolique inférieure ou égale à 100 mmHg, une fréquence respiratoire supérieure ou égale à 22/min, et une confusion. Un score qSOFA supérieur ou égal à 2 s'associe à un risque de sepsis qui doit être confirmé par la suite en déterminant le score SOFA. Une étude européenne menée dans 30 centres hospitaliers français, espagnols et suisses a confirmé la supériorité des critères SOFA et qSOFA par rapport aux critères SRIS dans la prédiction de la mortalité (surface sous la courbe sensibilité/spécificité (ROC pour Receiver Operating Characteristic) de 0,77 pour les critères SOFA et 0,80 pour les critères qSOFA, contre 0,65 pour les critères SRIS) (50). Selon les auteurs, un score qSOFA inférieur à 2 est associé à un taux de mortalité de 3 % contre 24 % dans le groupe de patients présentant un score qSOFA supérieur à 2.

II.1.2 Epidémiologie

Le sepsis a été classé en 2017 comme une priorité sanitaire mondiale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en adoptant une résolution pour améliorer la prévention, le diagnostic et le traitement clinique du sepsis. Le nombre de cas de sepsis a été estimé à 48,9 millions dans le monde en 2017 (51). En 2002, le sepsis représentait environ 6 % à 30 % des cas des patients admis dans les services de soins intensifs selon une étude menée chez 3147 patients dans 24 pays européens (52). Selon une étude menée en Angleterre dans 189 unités de soins intensifs, l'incidence moyenne du sepsis et du choc septique classés selon la définition Sepsis-3 est de 101,8 et 19,3 cas pour 100000 habitants, respectivement (53). Cependant, l'incidence du sepsis varie en fonction de différents facteurs tels que l'âge, le sexe, l'ethnie et les facteurs de comorbidité. L'étude de Rudd *et al.* a montré que l'incidence du sepsis était légèrement plus élevée chez la femme que chez l'homme (51). Le sepsis est deux fois plus fréquent chez la population noire que chez la population blanche selon différentes études menées aux Etats-Unis (54–56), ce qui est principalement expliqué par la différence de l'état de santé et du niveau social entre ces deux populations (56). De plus, le sepsis est souvent associé à d'autres maladies comorbides telles que le diabète, l'insuffisance cardiaque, la maladie pulmonaire chronique, le cancer ou l'immunodépression (57,58).

En dépit des progrès réalisés dans le domaine de l'antibiothérapie et de la prise en charge des défaillances viscérales, le taux de mortalité du sepsis reste élevé. En effet, le sepsis est l'une des premières causes de mortalité à l'échelle mondiale avec 11,0 millions de morts en 2017, ce qui représente environ 19,7 % des décès toutes causes confondues (51). Ce taux de mortalité du sepsis est variable en fonction de l'âge. En effet, le taux de mortalité atteint plus de 70 % chez les enfants en bas âge et plus de 50 % chez les personnes âgées (51). Il est également variable en fonction de la sévérité du sepsis, atteignant 15 % à 25 % pour les patients atteints de sepsis et 30 % à 50 % pour les patients en cas de choc septique (59,60). Le taux de mortalité est particulièrement élevé dans les pays à faible et moyen revenu qui se situent principalement dans les régions d'Afrique subsaharienne, d'Asie et d'Amérique du sud (*Figure 8*) (51). Cela peut être expliqué par un accès moindre aux soins et des stratégies de santé publique non optimales dans la gestion et la prise en charge thérapeutique du sepsis.

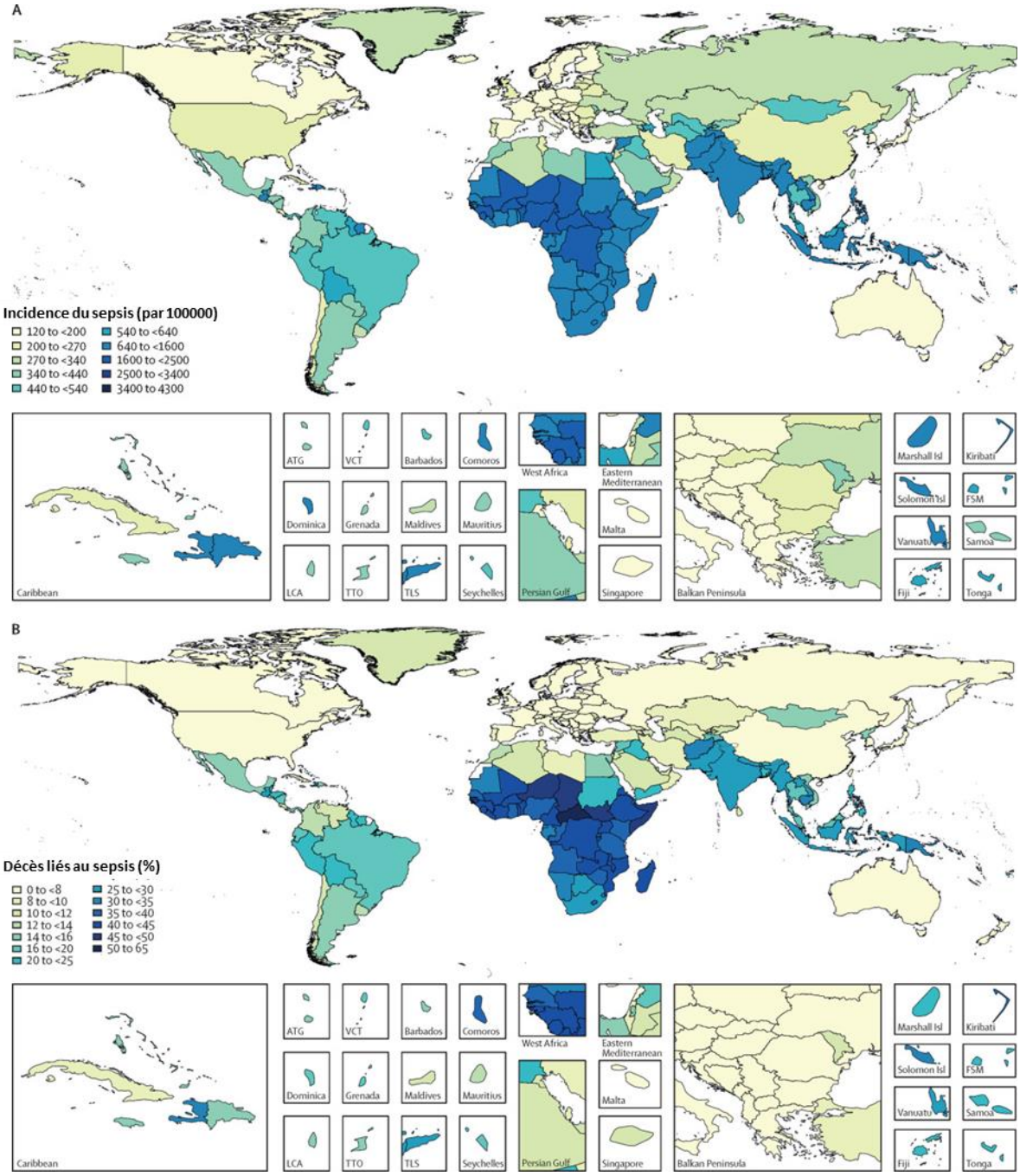


Figure 8. Incidence (A) et taux de mortalité (B) du sepsis dans le monde (selon Rudd et al. 2020 *(51)*)

Selon les données collectées en 2017, l'incidence et le taux de mortalité du sepsis sont plus élevés chez les pays à faibles et moyens revenus. Ces pays se situent principalement en Afrique subsaharienne, en Asie et en Amérique du Sud.

La durée de séjour hospitalier liée au sepsis augmente également avec la sévérité du sepsis. En effet, selon une étude statistique de données recueillies en 2013 aux Etats-Unis, la durée de séjour hospitalier est de 4,5 jours pour le sepsis, 6,5 jours pour le sepsis sévère et 16,5 jours pour le choc septique (61). Les coûts associés au sepsis représentaient environ 8,8% du budget total des soins hospitaliers aux Etats-Unis en 2017, la plus couteuse

pathologie traitée à l'hôpital, et représentait un coût de 38,2 milliards dollars (62). Ces dépenses ont tendance à augmenter au cours du temps du fait du vieillissement de la population, de l'augmentation de l'incidence des maladies chroniques, des thérapies d'immunosuppression, des transplantations, des chimiothérapies et des procédures invasives (63).

II.1.3 Etiologie

Le sepsis est défini comme un syndrome qui désigne toute réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave. Il peut donc survenir chez les patients atteints de différentes maladies telles que la maladie diarrhéique, l'infection des voies respiratoires, la méningite. Chez les patients atteints du sepsis, les maladies diarrhéiques sont les premières causes du sepsis devant les infections des voies respiratoires inférieures (9,2 millions de cas en 2017 chez les deux sexes tout âge confondu). Les infections bactériennes représentent les causes les plus fréquentes du sepsis, devant les virus et les parasites (64). La majorité des patients atteints d'un sepsis bactérien est infectée par des bactéries à Gram positif. En effet, selon une étude menée sur 211 patients dans un service des urgences aux Etats-Unis entre 2005 et 2007, les bactéries à Gram positif ont été retrouvées chez 61 % des patients infectés (65). Husebye *et al.* ont également montré un taux d'infection supérieur causé par les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (59 % contre 41 %) (66). Parmi les bactéries à Gram positif, Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis sont les souches les plus fréquentes avec 20,5 % et 10,8 % des tests positifs respectivement (67). Quant aux bactéries à Gram négatif, les plus courantes sont les différentes souches de Pseudomonas, dont la souche Pseudomonas aeruginosa et Escherichia coli avec 19,9 % et 16,0 % respectivement (47).

II.1.4 Physiopathologie et conséquences du sepsis

II.1.4.1 Physiopathologie du sepsis

La physiopathologie du sepsis est complexe à établir car elle implique plusieurs éléments de réponse anti-inflammatoire en cascade allant de la reconnaissance d'agents infectieux (bactérie à Gram négatif et à Gram positif, champignons, virus ou parasites) aux réponses de l'organisme hôte. Au cours des états infectieux, il y a une activation de nombreux systèmes cellulaires (macrophages, leucocytes, plaquettes, cellules endothéliales, …) et humoraux (complément, coagulation, protéases, …) qui entraînent des conséquences cliniques importantes, en particulier une coagulation disséminée intravasculaire, une hypotension réfractaire et une défaillance multi viscérale. La physiopathologie du sepsis est illustrée dans la *Figure 9*. La première réponse rapide et efficace de l'organisme hôte sur ces agents pathogènes est l'activation de la réponse immunitaire innée. Celle-ci implique principalement des macrophages, monocytes, granulocytes, cellules dendritiques et cellules lymphocytes cytotoxiques naturels du système immunitaire (68).

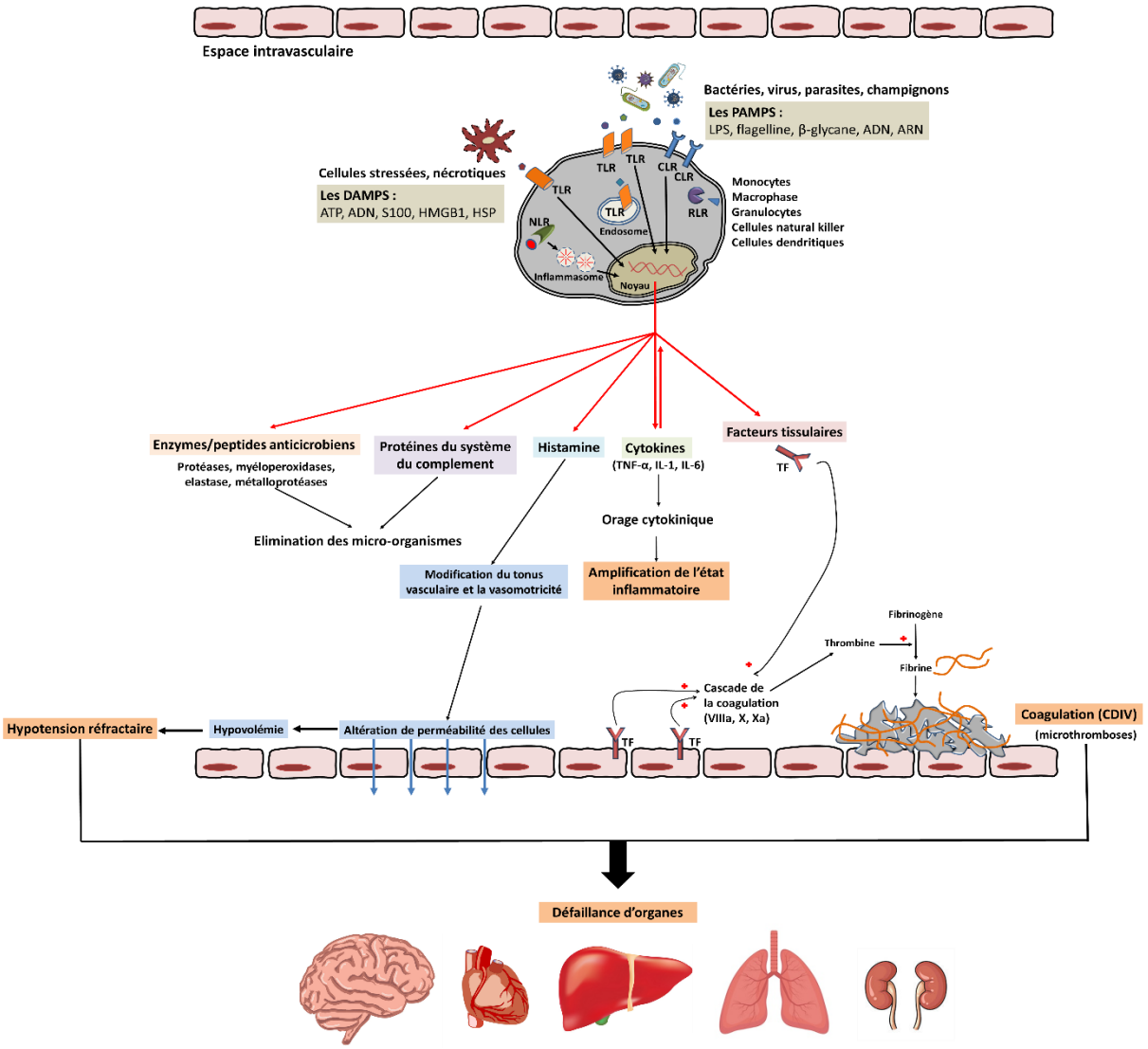


Figure 9. Physiopathologie du sepsis depuis la reconnaissance des agents pathogènes jusqu'aux conséquences cliniques manifestées (adapté selon *(69)*)

Les cellules du système immunitaire sont les premières barrières suite à la détection des PAMPS et des DAMPS. L'activation des récepteurs se situant sur les cellules immunitaires entraîne la libération de nombreux médiateurs circulants issus des cellules immunitaires et des cellules tissulaires tels que les cytokines, les composants du système du complément, les enzymes et les peptides antimicrobiens. Ces médiateurs vont déclencher de nombreuses conséquences cliniques telles que la coagulation, l'hypotension et la défaillance d'organes.

Cette activation se déclenche non seulement par la détection des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes pathogènes, appelés PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) mais également des produits libérés par les tissus endommagés de l'organisme hôte, motifs moléculaires associés aux dégâts appelées DAMPS (Damage Associated Molecular Patterns). Le terme PAMPS est proposé par Charles Janeway en 1989 pour caractériser des molécules d'origine bactérienne, fongique ou virale. Ce sont des éléments se situant à la surface des micro-organismes tels que les endotoxines (lipopolysaccharides), β-glycane, flagelline, lipoprotéines, peptidoglycanes ou à l'intérieur

des micro-organismes lorsqu'ils sont dégradés comme l'ADN ou l'ARN. Ces éléments sont phylogénétiquement conservés et caractéristiques des micro-organismes au cours de l'évolution (70). Contrairement au terme PAMPS, le terme DAMPS est proposé par Polly Matzinger en 1994 via le concept de « signal en danger » pour caractériser des molécules libérées par les lésions de la matrice extracellulaire (fragments d'acide hyaluronique, sulfate d'héparine) ou les cellules stressées/nécrotiques de l'organisme hôte tel que l'ATP, l'ADN mitochrondrial, la HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), la protéine S100, les protéines de choc thermique (HSP) (70).

Les structures moléculaires PAMPS et DAMPS sont reconnues par des récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*) des monocytes dans la circulation sanguine et des macrophages au niveau tissulaire. Ces récepteurs peuvent être soit membranaires (*Toll-like receptors* TLR et *C-type lectin receptors* CLR) soit intracellulaires (NOD-like receptors NLR et RIG-I-like receptors RLR). Les récepteurs TLR sont exprimés à la surface cellulaire ou dans des compartiments intra-cellulaires. Parmi les récepteurs LTR, le récepteur LTR-4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, le récepteur LTR-2 reconnaît les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif et le récepteur LTR-7 reconnaît les ARN viraux (71). Les récepteurs CLR fixent la partie glucidique des glycoprotéines qui joue un rôle d'ancrage de divers agents pathogènes. Quant aux récepteurs cytoplasmiques NLR, ils reconnaissent des composants intra-cellulaires des micro-organismes pour recruter un complexe multiprotéique (inflammasome) qui déclenche la production des cytokines inflammatoires tels que les interleukine (IL-1β et IL-18) qui sont impliquées dans la mort cellulaire programmée (41).

L'activation des récepteurs PRR entraîne la libération de nombreux médiateurs circulants issus des cellules immunitaires et des cellules tissulaires tels que les cytokines, les composants du système du complément, les enzymes et les peptides antimicrobiens qui participent activement au déclenchement de la réponse inflammatoire. Les cytokines sont des composés solubles ou membranaires permettant la communication entre les cellules. Les cytokines ciblent des cellules de l'immunité innée, mais également des organes comme le foie pour la production de CRP ou l'hypothalamus pour déclencher la fièvre et les cellules endothéliales pour le processus de la coagulation. On distingue plusieurs types de cytokines : des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 et IFNα, β, γ), des cytokines chimio-attractantes (chimiokines CXCL8), et des cytokines régulatrices de l'inflammation (IL-10, TGFβ). Le deuxième type de médiateur est représenté par des protéines circulantes plasmatiques du système du complément, qui déclenchent les trois voies d'activation complémentaires convergeant vers la formation d'un complexe d'attaque membranaire permettant la lyse des microorganismes infectieux. Les enzymes et peptides antimicrobiens sont, quant à eux, libérés par les polynucléaires et les mastocytes du système immunitaire adaptatif, telles que les protéases, les myélopéroxidases, les élastases et les métalloprotéases. Ces protéines peuvent agir de façon directe ou indirecte pour éliminer des micro-organismes. De plus, d'autres médiateurs tels que l'histamine libérée par les

polynucléaires basophiles et les mastocytes provoquent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité et la substance P produite par les mastocytes est responsable du signal de douleur.

II.1.4.2 Manifestations cliniques du sepsis

Les signes cliniques initiaux du sepsis sont ceux d'une infection aiguë ou progressive ou d'un dysfonctionnement d'organes (72). Les principaux signes cliniques sont énumérés dans les définitions du sepsis et du choc septique (voir section A.II.1.1). Ils comportent fréquemment une fièvre ou une hypothermie, une tachycardie, une polypnée, une pâleur ou une rougeur cutanée et des troubles neurologiques (confusion, agitation voire coma) (73). En fonction des délais du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique, le sepsis entraine différentes conséquences pouvant menacer le pronostic vital du patient, telles que l'hypotension, la coagulation et la défaillance multiviscérale.

Au cours de l'inflammation, l'activation cellulaire et la libération des médiateurs de l'inflammation des cellules immunitaires telles que les cytokines (IL1, TNFα), l'histamine, la bradykinine et la thrombine régulent le tonus vasculaire et la vasomotricité des cellules endothéliales des vaisseaux. Des modifications caractéristiques des cellules endothéliales durant l'état septique ont été rapportées, telles que la contraction des muscles, le gonflement et la séparation de la matrice extracellulaire sous-jacente (74). Ces modifications entraînent une augmentation de la perméabilité capillaire, une défaillance cardiocirculatoire associée à une hypovolémie absolue ou relative et par conséquent une hypotension (diminution de la pression artérielle), nécessitant le traitement symptomatique initial par le remplissage et l'administration des vasoconstricteurs. Par conséquence, une mauvaise distribution des débits sanguins dans l'ensemble de l'organisme provoque une diminution de la perfusion tissulaire, une altération de la microcirculation et une dysfonction d'organes.

La coagulation est activée dès qu'il y a une infection. Sous l'action des molécules du complément et de cytokines (surtout IL-6) produites lors de la réaction inflammatoire par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires, le nombre de facteurs tissulaires (TF) augmente et active la cascade de la coagulation (*Figure 9*). De plus, l'adhésion des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales réduit la capacité du vaisseau à prévenir la formation des thrombines. Ces phénomènes sont responsables de l'activation massive de la coagulation. Au cours du sepsis, l'activité fibrinolytique est fortement réduite par l'augmentation de la synthèse des inhibiteurs de l'activateur de plasminogène de type 1 (PAI-1) par les cellules endothéliales et les monocytes. Ainsi, le système de régulation devient débordé, ce qui entraine l'apparition d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), qui est caractérisée par une activation généralisée de la coagulation sanguine dans un système vasculaire anatomiquement intact (75). Le sepsis est la cause principale de CIVD aigüe, représentant 14 % à 32 % des cas(76). Par conséquent, des caillots sanguins se forment dans la circulation pouvant bloquer de petits vaisseaux sanguins dans les organes

ou les membres. Cela entraine une diminution de la perfusion sanguine (réduction du débit en oxygène et accumulation du dioxyde de carbone et des déchets dans l'organisme).

La diminution de la perfusion sanguine provoque un dysfonctionnement et parfois une défaillance d'un ou de plusieurs organes, dont les reins, les poumons, le foie, le cerveau et le cœur. La mortalité augmente en présence d'une défaillance multiviscérale, car chaque organe défaillant augmente de 15 à 20 % le taux de mortalité (77). La défaillance multiviscérale est rapportée comme un phénomène adaptatif et protecteur de l'organisme hôte à l'agression afin d'éviter la mort des cellules (74). En effet, quand l'organisme se rétablit après une infection, les cellules retrouvent au fur et à mesure l'ensemble de leurs activités normales, ce qui entraine une récupération progressive des fonctions d'organes chez les survivants (78,79).

II.1.5 Diagnostic du sepsis

Le diagnostic du sepsis repose principalement sur les signes cliniques du patient, les tests diagnostiques bactériologiques ou le dosage de biomarqueurs du sepsis.

Les manifestions cliniques du sepsis présentées précédemment sont souvent atypiques et confondues en raison de sa physiopathologie complexe. Par conséquent, il est difficile d'établir un diagnostic approprié du sepsis basé uniquement sur l'évaluation clinique du patient.

Les tests bactériologiques sont considérés comme des méthodes de référence dans la recherche d'un foyer infectieux pour confirmer la présence de souches bactériennes. Selon les recommandations issues de la campagne « Survivre au Sepsis » (Surviving Sepsis Campaign) qui a pour but d'améliorer le délai de diagnostic et de traitement, il est préconisé d'effectuer rapidement des prélèvements microbiologiques (moins de 45 minutes) avant d'initier une antibiothérapie afin d'éviter les résultats faux-négatifs (80). En effet, il a été montré que l'agent pathogène n'est pas retrouvé dans 30 % des cas étudiés lorsque des traitements antibiotiques ont été administrés avant le test bactériologique (81). De plus, il est également recommandé d'effectuer des prélèvements sur d'autres portes d'entrée des agents pathogènes afin de déterminer le site de l'infection, à conditions de ne pas provoquer un retard important dans l'initiation du traitement. Les principaux sites d'infection rapportés sont pulmonaires (35 %), hépato-digestifs (25 %), urinaires (13 %), liées à un cathéter (5 %) (82). Un test bactériologique permet non seulement d'identifier l'agent pathogène, mais également de tester la résistance aux antibiotiques afin d'adapter le traitement à l'étiologie de l'infection. Pourtant, l'inconvénient majeur du test bactériologique est le délai d'obtention du résultat. En effet, les résultats ne sont disponibles que 24 à 48 heures après le prélèvement d'échantillon en raison du délai d'incubation nécessaire à la culture bactérienne. De plus, le test microbiologique est positif chez seulement 60 % des patients atteints du sepsis (52).

Le dosage de biomarqueurs du sepsis représente alors un outil efficace pour aider les cliniciens dans la prise en charge des patients grâce à la facilité d'accès aux tests et la rapidité des tests. Selon l'Institut national américain de la santé (NIH), un biomarqueur est défini comme une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique (83). Historiquement, en 1948 la protéine de Bence-Jones, une chaîne légère de l'immunoglobuline, a été identifiée chez 75 % des patients atteints d'un myélome (84). Dans le domaine de la cancérologie, l'alpha-foetoprotéine et l'antigène carcino-embryonnaire ont été découverts comme biomarqueurs de cancer dans les années 1960 (85). L'amélioration des performances des techniques de dosage et la baisse de leur coût facilitent les recherches et la mise en place de nombreux biomarqueurs dans la pratique clinique. De plus, avec l'évolution de la connaissance médicale et la prise en charge des patients, les biomarqueurs favorisent le passage d'une approche thérapeutique traditionnelle à une approche ciblée (médecine personnalisée). Il existe différents types de biomarqueurs en fonction de leur utilité : les biomarqueurs pronostiques qui prédisent les caractéristiques évolutives des maladies, les biomarqueurs diagnostiques qui aident à différencier un statut malade d'un état sain et à stratifier les patients et les biomarqueurs prédictifs qui prédisent l'efficacité d'un traitement pour orienter la décision thérapeutique. Un biomarqueur est considéré comme idéal quand il reflète les anomalies de la condition physiologique de façon spécifique, sensible et corrèle étroitement avec l'évolution clinique du patient avant et durant le traitement (86). Un biomarqueur idéal doit, dans la mesure du possible, pouvoir être mesuré avec un coût raisonnable, ne pas nécessité de prélèvement invasif pour le patient, ne pas être influencé par l'état du patient (âge, sexe, ethnie, exposition environnementale, médication) (87). La performance d'un biomarqueur pour le diagnostic est souvent interprétée par les paramètres tels que la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives (VPP et VPN), et les valeurs de la courbe caractéristique de performance d'un test (ROC pour receiver operating characteristic). Les valeurs de sensibilité et spécificité sont déterminées dans une population de patients où le statut septique ou non septique est déjà connu dans le but de comparer les performances de différents biomarqueurs. Quant à la courbe ROC, elle permet de déterminer le seuil de concentration ou la combinaison optimale entre la spécificité et la sensibilité. Les valeurs prédictives sont utilisées pour évaluer la performance d'un biomarqueur en situation réelle car les cliniciens vont évaluer si la maladie est présente ou non chez un patient en interprétant les résultats avec la prévalence de la maladie dans la population (88). Dans le cadre du sepsis, les biomarqueurs circulants font l'objet d'une attention croissante depuis plusieurs années afin de pallier les difficultés rencontrées en pratique clinique pour le diagnostic du sepsis et la distinction entre les différentes causes du sepsis (bactérienne, virale ou parasitaire). En raison des nombreux processus physiopathologiques impliqués (voir section A.II.1.4.1), il est difficile de définir un biomarqueur idéal du sepsis. Le forum international sur le sepsis (The International Sepsis

Forum) de 2005 a élaboré un cadre systématique pour l'identification et la validation de biomarqueurs du sepsis (89). Le rapport proposait la prise en compte des trois caractéristiques de performance pour valider un biomarqueur : la molécule réellement mesurée par les essais, la capacité de discriminer les patients atteints des patients non atteints du sepsis, la capacité de guider les décisions cliniques pour améliorer l'état du patient. Selon une revue publiée en 2010 analysant 3 370 études, il existe plus de 178 biomarqueurs évalués pour le diagnostic du sepsis. Cependant, la plupart de ces biomarqueurs ne sont pas suffisamment spécifiques et sensibles pour une utilisation en routine en clinique (90). Une autre étude menée en 2016 a identifié 7 biomarqueurs (procalcitonine, présepsine, protéine C-réactive, interleukine-6, protéine de liaison au lipopolysaccharide LBP, récepteur soluble de déclenchement de type 1 exprimé sur les cellules myéloïdes sTREM-1, neutrophile nCD64) étudiés dans au moins 4 études cliniques effectuant des analyses statistiques (91). L'intérêt de la plupart de ces biomarqueurs a également été confirmé par une revue de Teggert *et al* basée sur 119 études et méta-analyses (92). La complexité du processus physiopathologique du sepsis rend difficile l'identification d'un biomarqueur unique pour le diagnostic de toutes les formes de sepsis (88). La recherche clinique s'oriente vers la combinaison de plusieurs biomarqueurs afin de mieux apprécier les diverses facettes du sepsis (93,94). Cependant, la plupart de ces biomarqueurs ne sont pas couramment dosés en pratique clinique de routine. Seules la CRP et la PCT, deux biomarqueurs bien établis, sont couramment utilisées dans de nombreux hôpitaux (95). Notamment, l'usage de la PCT s'est largement répandu du fait de sa meilleure capacité de diagnostic du sepsis et son utilité pour guider le traitement antibiotique. Pourtant, avec son important développement, la fiabilité de ses résultats obtenus à travers les différentes plateformes de mesure a été remise en question (voir section B.I.1). C'est en raison de son intérêt majeur en clinique, que la fiabilité et la comparabilité des dosages de la PCT feront l'objet de cette thèse.

Il y a en effet un réel besoin de disposer de résultats rapides et fiables des tests de diagnostic afin d'instaurer une prise en charge thérapeutique appropriée rapidement et de réduire ainsi le taux de mortalité associé au sepsis (58). En effet, compte tenu de l'évolution rapide du sepsis vers ses formes les plus sévères, le diagnostic du sepsis doit être le plus précoce possible afin d'administrer le plus rapidement possible un traitement approprié. La plupart des décès liés au sepsis surviennent chez les patients déjà atteints du sepsis lors de leur admission à l'hôpital (96). Dans une étude rétrospective de patients présentant une hypotension admis dans les services de soins intensifs entre 1989 et 2004, Kumar et ses collègues ont montré une diminution du taux de survie de 7,6 % par heure en l'absence de traitement antibiotique (97) (*Figure 10*).

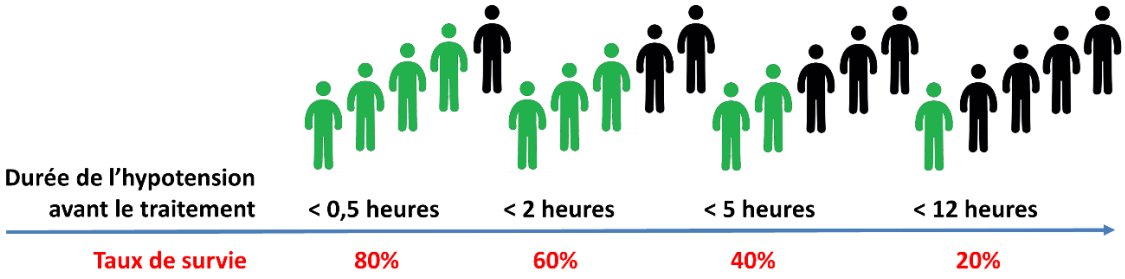


Figure 10. **Taux de survie en fonction du délai d'administration d'un traitement chez les patients atteints de sepsis présentant une hypotension (Adapté de *(97)*)**

Le taux de survie est de 80 % si les patients reçoivent leur traitement pendant les 30 premières minutes de la période d'hypotension. Ce taux de survie diminue à 20 % si le traitement n'est pas initié au bout de 12h.

II.1.6 Prise en charge thérapeutique des patients

Afin de réduire le risque d'évolution vers une forme grave en l'absence de diagnostic précoce, la prise en charge des patients atteints de sepsis repose principalement sur un traitement anti-infectieux probabiliste (antibiothérapie) précoce et un traitement symptomatique de la défaillance cardiovasculaire (prise en charge hémodynamique et des autres dysfonctions si elles sont présentes).

Une antibiothérapie efficace demeure un élément clé dans la prise en charge du sepsis bactérien (97). Celle-ci est caractérisée par deux éléments importants : le délai d'administration et le choix du traitement antibiotique. L'antibiothérapie doit être administrée dans les plus brefs délais suivant le diagnostic du sepsis (de préférence en moins d'une heure) selon les recommandations NICE NG51 (Nice Guideline 2016) et de la campagne « Survivre au Sepsis » (98). Tout retard dans l'initiation de l'antibiothérapie ou un choix inapproprié du traitement constituent des facteurs de risque de mortalité pour les patients. En effet, environ 23 % des décès liés au sepsis sont causés par ces soins non optimaux (58). Le choix du traitement initial est donc important et repose sur l'analyse de différents éléments telle que la connaissance de l'historique du patient (immunodépression, sida, toxicomanie intraveineuse, patients neutropéniques,…), du contexte clinique, des comorbidités et éventuellement des résistances aux antibiotiques (99). L'absence de diagnostic précoce entraine souvent l'administration d'une antibiothérapie probabiliste initiale. Afin de minimiser le risque d'échec, ce traitement doit avoir un spectre suffisamment large pour couvrir un maximum d'agents potentiellement responsables avant l'identification microbiologique. Cependant, l'antibiothérapie doit être ajustée dès réception des premiers résultats microbiologiques, afin d'administrer un traitement optimal au patient.

La prise en charge hémodynamique est effectuée par une réanimation liquidienne afin d'éviter une hypoperfusion prolongée et de prévenir une dysfonction d'organe (80). Le protocole de la prise en charge hémodynamique initiale, communément appelée « Early

goal-directed therapy » est recommandé par la campagne « Survivre au Sepsis » durant les six premières heures (100). Selon ces recommandations, l'objectif de la réanimation liquidienne est d'augmenter la pression artérielle moyenne à au moins 65 mm Hg, de faire disparaître des signes périphériques de choc et de diminuer la concentration du lactate artériel. Le premier choix des solutés de remplissage pour la réanimation liquidienne est l'utilisation de cristalloïdes, qui sont des solutions salines (sérum physiologique 0,9 %) dont l'usage est favorisé par leur faible cout et leur faible risque allergique (101). De plus, un traitement par vasopresseurs à faible dose peut être utilisé en complément pour atteindre l'objectif de la réanimation liquidienne.

La prise en charge thérapeutique serait donc plus rapide et plus efficace et réduirait l'évolution vers des formes sévères si le sepsis était correctement diagnostiqué dès l'admission du patient par une évaluation étroite entre les signes cliniques et le résultat de tests de diagnostic. De plus, cela permettrait d'ajuster au plus tôt le traitement antibiotique, et ainsi réduire tout abus des traitements antibiotiques à large spectre favorisant la propagation de bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

II.2 Résistance aux antibiotiques

II.2.1 Antibiothérapie

Les antibiotiques sont des molécules produites naturellement par des micro-organismes ou des molécules de synthèse capables d'inhiber la réplication d'une bactérie ou de la tuer. La découverte de la pénicilline par Alexandre Fleming en 1928 fut une véritable avancée dans l'histoire de la médecine et de l'antibiothérapie. Entre 1940 et 1952, de nouvelles classes thérapeutiques d'antibiotiques avec différentes cibles ont été découvertes et ont permis de sauver des millions de vies chaque année (102) (*Figure 11*). Les principaux mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques sont l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, la destruction de la membrane cytoplasmique, l'inhibition de la synthèse de l'ADN bactérien, l'inhibition de la synthèse des protéines et le blocage de l'acide folique (*Figure 12*).

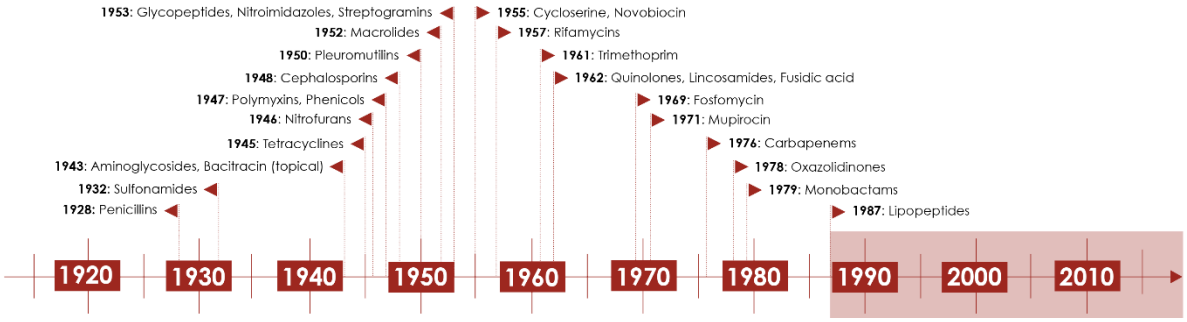


Figure 11. Découverte de différentes classes thérapeutiques d'antibiotiques dans le temps (selon reactgroup.org).

Après la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexandre Fleming, de nombreuses classes thérapeutiques d'antibiotiques ont été développées et mises sur le marché. Depuis la découverte de la dernière classe d'antibiotique (lipopeptides) en 1987, peu de recherche et développement sur de nouveaux antibiotiques ont abouti en raison du manque d'investissement financier.

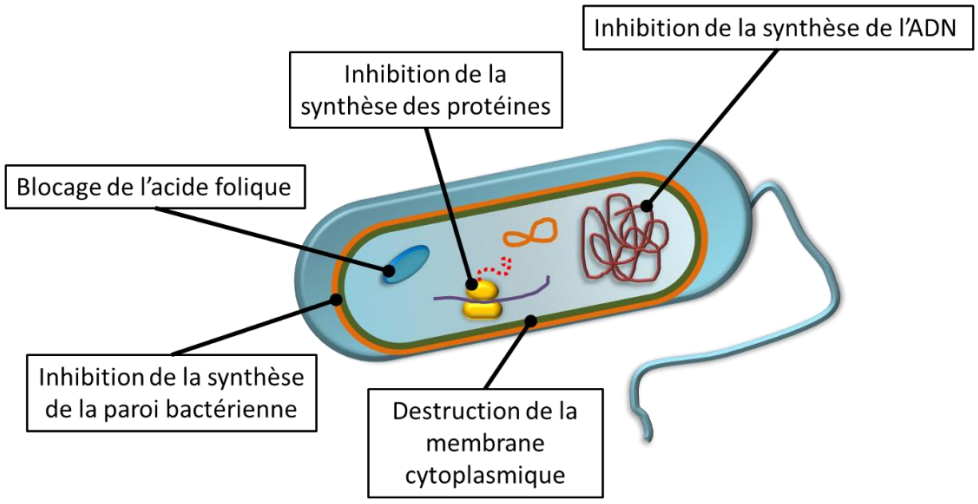


***Figure 12*. Mécanismes d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques agissent sur l'une des étapes essentielles de la réplication des bactéries, entrainant la mort de celles-ci.

Depuis la découverte de la dernière classe d'antibiotiques (lipopeptides) en 1987, aucune nouvelle classe thérapeutique n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché en raison du faible investissement des industries pharmaceutiques et biotechnologiques dans ce domaine (103). Il y a donc un réel manque d'innovation dans le développement de nouvelles molécules antibiotiques. Selon le rapport réalisé par l'OMS en 2019, seulement 15 molécules antibiotiques sur 49 en cours de développement sont innovantes (104).

II.2.2 Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel permettant aux microorganismes de résister à l'action d'un ou plusieurs agents antibiotiques. Pourtant, celle-ci devient préoccupante pour la santé mondiale, particulièrement avec l'apparition de résistances chez des bactéries auparavant sensibles aux antibiotiques. Parmi les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques illustrés dans la *Figure 13*, comprenant l'imperméabilité à l'antibiotique, la modification de la cible de l'antibiotique, l'expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux, l'inactivation de l'antibiotique par des enzymes est couramment rencontrée (105). Le nombre d'enzymes responsables de la destruction des antibiotiques ne cesse d'augmenter au cours du temps, il est désormais possible d'en compter plusieurs centaines. L'exemple le plus parlant est la destruction des antibiotiques de classe β-lactame (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes), représentant la classe la plus consommée, par l'enzyme β-lactamase (106,107).

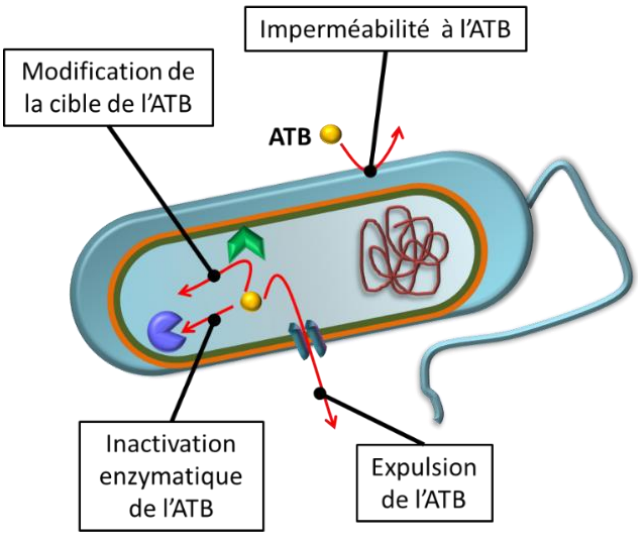


Figure 13. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (ATB)

La résistance aux antibiotiques se manifeste soit par la diminution de la concentration des ATB à l'intérieur des bactéries soit par la modification de la cible de l'ATB, soit, plus fréquemment, par la destruction des ATB par des enzymes.

II.2.3 Consommation des antibiotiques et risque de développer une résistance aux antibiotiques

La consommation des médicaments est évaluée par un indicateur de mesure international défini comme la dose moyenne journalière d'un médicament (DDJ) dans son indication principale pour un adulte de 70 kg. La consommation mondiale d'antibiotiques était de 21,1 milliards de DDJ en 2000 et a augmenté de 65 % entre 2000 et 2015, pour atteindre 34,8 milliards de DDJ (108). Parmi les pays à revenu élevé les plus gros consommateurs d'antibiotiques sont les Etats-Unis, la France et l'Italie. Quant aux pays à faible et moyen revenu, la consommation d'antibiotiques est la plus élevée en Chine, en Inde

et au Pakistan (108). Comme la consommation annuelle d'un pays dépend de la taille de sa population, un nouveau paramètre DDJ par 1000 habitants a été introduit. Les six premiers pays les plus consommateur par 1000 habitants en 2015 sont la Turquie, la Tunisie, l'Espagne, la Grèce, l'Algérie et la Roumanie (108). En parallèle de ces données de consommation, plusieurs études ont montré que 30 % à 50 % des prescriptions d'antibiotiques ne sont pas adaptées en termes d'indication thérapeutique, de dosage et de durée de traitement (109,110). L'utilisation inappropriée des antibiotiques peut entrainer des effets indésirables pour les patients, prolonger la durée d'hospitalisation, augmenter le coût de la prise en charge ainsi que le risque d'apparition des souches résistantes aux antibiotiques (111). Une utilisation adéquate et un accès équitable aux antibiotiques représentent donc un enjeu important. L'OMS a introduit en 2017 une classification dénommée « AWaRe » qui classifie les antibiotiques en trois catégories : « Access », « Watch » et « Reserve » dans le but de limiter la propagation de la résistance aux antibiotiques et d'assurer une utilisation plus sûre et plus efficace de ces médicaments. Les antibiotiques de la catégorie dite « Access » sont des antibiotiques dont l'accessibilité est essentielle avec un faible coût et une qualité élevée. Elle regroupe des antibiotiques à spectre étroit avec faible risque de développer une résistance aux antibiotiques. Ces antibiotiques sont efficaces pour traiter une large gamme d'agents pathogènes fréquemment identifiés. Les antibiotiques de la catégorie « Watch » sont des antibiotiques à utiliser sélectivement du fait de leur risque élevé de provoquer une résistance aux antibiotiques. La dernière catégorie « Reserve » regroupe des antibiotiques de dernier choix dont l'utilisation doit être maitrisée de manière optimale pour éviter l'apparition de résistance aux antibiotiques. Ce sont des antibiotiques réservés aux infections causées par des agents pathogènes multi-résistants pour lesquels les traitements alternatifs ne sont pas efficaces. Dans une étude publiée en 2020, les auteurs ont évalué la consommation d'antibiotiques de ces trois catégories entre 2000 et 2015 dans 76 pays (112). Les antibiotiques de la catégorie « Access » représentent environ 60 % de la consommation totale des antibiotiques avec de fortes disparités selon les pays. La consommation de la catégorie « Access » est la plus élevée en Algérie (83,7 %) et la plus faible au Japon (13,9 %). Les antibiotiques de la catégorie « Watch » représentent 38,6 % de la consommation totale des antibiotiques avec une consommation élevée au Japon (83,9 %) et faible en Algérie (16,3 %). Enfin, les antibiotiques de la catégorie « Reserve » représentent moins de 1,0 % de la consommation totale des antibiotiques. Entre 2000 et 2015, la consommation globale des antibiotiques de la catégorie « Access » et « Watch » a augmenté de 26,2 % et 90,9 %, respectivement. L'augmentation de la consommation d'antibiotiques de la catégorie « Access » n'est pas identique dans tous les pays et est particulièrement importante dans les pays à faible et moyen revenu (45,3 %) par rapport aux pays à revenu élevé (14,8 %). Quant aux antibiotiques de la catégorie « Watch » avec un risque élevé d'engendrer une résistance aux antibiotiques, la consommation a plus fortement augmentée dans les pays à faible et moyen revenu (+ 165 %). Selon les auteurs, cette forte augmentation peut être expliquée par le développement économique facilitant l'accès aux antibiotiques à large spectre et par

une stratégie de vente libre pour les antibiotiques des catégories dites « Access » et « Watch » et des stratégies d'organisation locale de la santé portant moins attention à la résistance aux antibiotiques.

La surconsommation des antibiotiques à travers le monde et les faibles avancées dans la recherche et le développement de nouvelles classes d'antibiotiques contribuent fortement à augmenter le risque d'apparition des nouvelles souches résistantes aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques ne cesse de se développer et est considérée comme l'une des plus graves menaces de santé publique au niveau mondial (113). En effet, la conséquence de ce phénomène peut être sévère car les patients atteints d'infection due à des agents bactériens résistants sont exposés à un risque accru de dégradation clinique et de mortalité. Selon les données du réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net) du centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC pour *European Center for Disease Prevention and Control*), plus de 670 000 infections sont causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques à l'échelle européenne avec environ 33 000 décès chaque année (114). En 2013, le nombre de personnes infectées par des bactéries résistantes est estimé à environ 2 millions avec 23 000 morts liés à la résistance aux antibiotiques chaque année aux Etats-Unis avec un surcoût de 20 milliards de dollars chaque année (115). Les données relatives au phénomène de résistance aux antibiotiques issues de 66 pays et collectées entre 1999 et 2017 sont rapportées sur le site « resistancemap.cddep.org ». La résistance aux antibiotiques est variable selon les pays ou les régions. En effet, la résistance aux antibiotiques augmente dans les pays à faible et moyen revenu, tandis qu'elle reste stable dans les pays à revenu élevé (116). Si le nombre d'infections continue à augmenter au rythme actuel, il est estimé que le nombre de décès causés par la résistance aux antibiotiques atteindra 10 millions par an d'ici 2050 dans le monde (117). Sur le plan économique, le coût annuel lié à la résistance aux antibiotiques est estimé à environ 1,1 milliards d'euros en Europe (118).

Bien que naturel, le phénomène de résistance aux antibiotiques est accéléré par l'utilisation non appropriée des antibiotiques. La maîtrise de l'émergence de nouvelles souches bactériennes résistantes aux antibiotiques repose donc à la fois sur une surveillance de l'exposition aux antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques en elle-même. A travers le monde, de nombreux plans d'action et stratégies ont été élaborés dans le but d'améliorer l'utilisation des antibiotiques à travers la mise en place de plusieurs plans ayant pour objectifs la sensibilisation et l'éducation du public et des fournisseurs, la surveillance, la prévention et le développement de programmes d'individualisation d'antibiothérapie (116). Jusqu'à présent, seuls 93 pays parmi les 194 pays membres de l'OMS ont construit des plans nationaux d'action pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (*Figure 14*). Un effort important est encore nécessaire pour élaborer les plans d'action dans chaque pays et en particulier dans les pays les plus consommateurs d'antibiotiques.

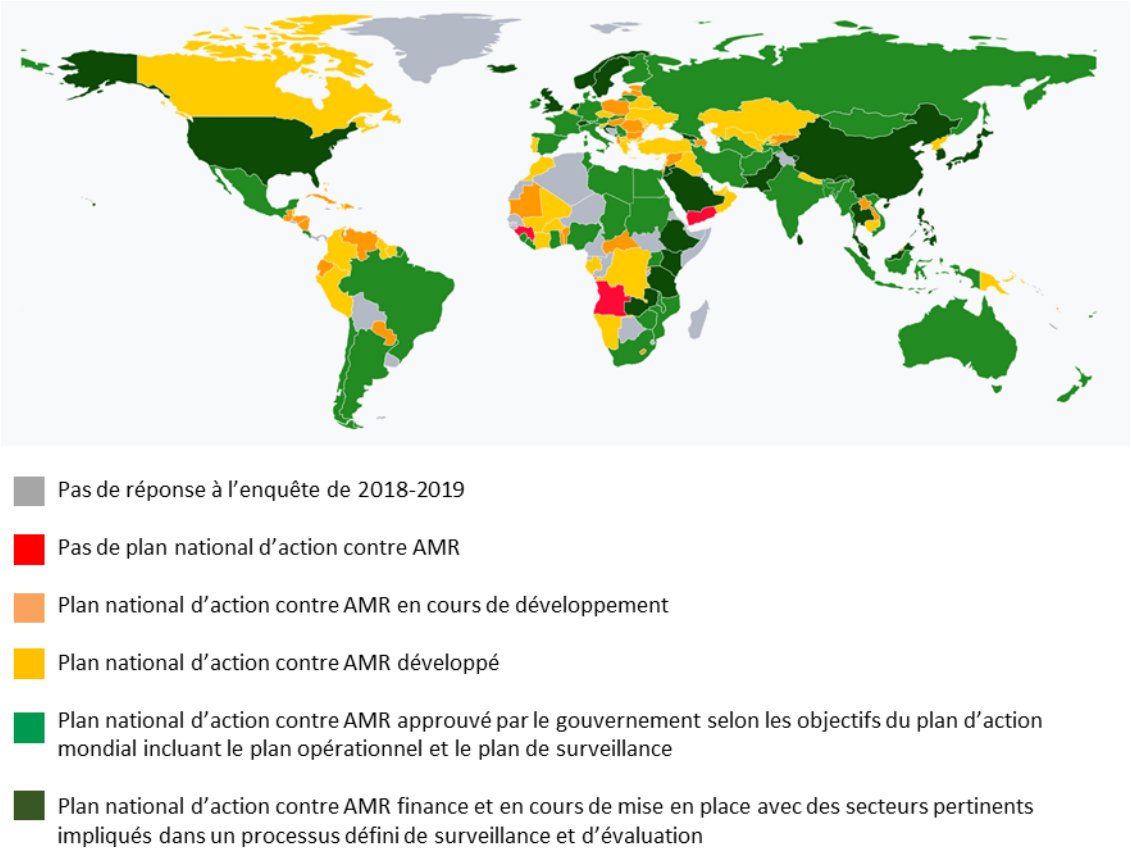


Figure 14. Cartographie des plans nationaux d'action pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (enquête de 2018-2019 menée par l'OMS).

La majorité des pays est impliquée dans l'établissement de plans nationaux d'action pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. Seulement 50% des pays ont un plan national d'action établi. (AMR : résistance aux antimicrobiens)

II.2.4 Antibiothérapie et résistance aux antibiotiques dans le cadre du sepsis

Comme décrit précédemment, l'antibiothérapie joue un rôle clé pour la survie des patients dans le cadre de la prise en charge thérapeutique de patients atteints de sepsis bactérien. Pourtant, le manque de spécificité des signes cliniques et le manque d'un diagnostic précoce amènent les médecins à prescrire des antibiotiques à large spectre en première intention. En effet, 30 % à 60 % des antibiotiques prescrits en cas de sepsis dans les services de soins intensifs sont prescrits de façon inappropriée (sous-optimale ou non nécessaire) (119). Une surconsommation ou une consommation non-adaptée d'antibiotiques dans le cas du traitement du sepsis pourrait donc être réduite en présence d'un diagnostic précoce plus fiable et ainsi contribuer non seulement à la réduction d'effets indésirables et de surcouts liés à un traitement antibiotique inadapté mais également au ralentissement de l'émergence de bactéries multirésistantes.

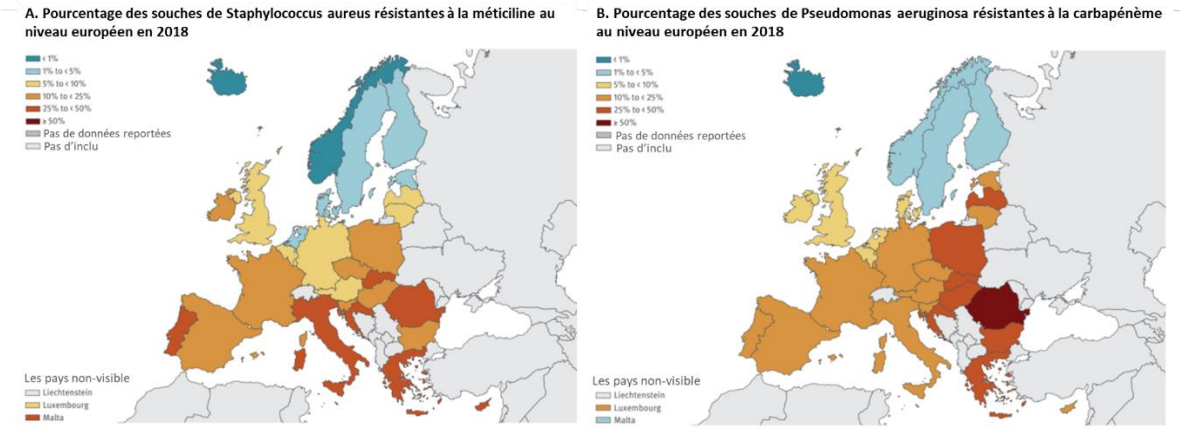


Figure 15. Cartographie de la résistance aux antibiotiques pour deux souches Staphylococcus aureus (A) et Pseudomonas aeruginosa (B) (ECDC 2018).

Le taux de résistance aux antibiotques des deux souches, les plus rapportées dans le cadre du sepsis, sont présentés. Ces taux sont élevés dans le sud de l'Europe et beaucoup plus faible dans le nord de l'Europe.

La résistance aux antibiotiques est particulièrement préoccupante pour deux souches de bactéries : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (une souche du genre Pseudomonas). Leur résistance aux antibiotiques à l'échelle européenne est illustrée dans la *Figure 15*. Les taux de résistance aux antibiotiques sont plus élevés dans les pays du sud de l'Europe, et plus faibles dans le nord de l'Europe. Comme évoqué précédemment, ces deux souches bactériennes sont parmi les plus fréquemment rencontrées en cas de sepsis. La résistance de la souche *Staphylococcus aureus* a débuté peu de temps après l'introduction des pénicillines et a été amplifiée par la surconsommation des antibiotiques avec le développement d'une résistance aux pénicillines observée dès 1942 (120). Plus tard, cette souche bactérienne a développé des résistances aux méticillines, fluoroquinolones et vancomycines (120). *Pseudomonas aeruginosa*, devient, quant à elle, de plus en plus résistante, notamment aux carbapénèmes et aux fluoroquinolones (121,122). Les dosages des biomarqueurs spécifiques des infections bactériennes peuvent apporter une aide importante dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques en rationalisant l'utilisation de traitements antibiotiques lors du diagnostic et du suivi des patients. Dans le cadre du sepsis, de nombreuses études ont déjà mis en évidence l'intérêt des dosages de la procalcitonine en milieu hospitalier pour éviter la surconsommation d'antibiotiques et les conséquences qui en découleraient (voir A.III.1.3) (123).

Chapitre III
Procalcitonine

III.1 Généralités sur la procalcitonine 48
III.1.1 Structure et biogenèse de la procalcitonine 48
III.1.2 Production de la procalcitonine en cas de sepsis d'origine bactérienne 49
III.1.3 Utilisation de la PCT pour le diagnostic du sepsis, la stratification des patients et l'antibiothérapie 52
III.1.4 Bénéfices des dosages de la PCT dans la gestion et la prise en charge des patients 55
III.1.5 Limites des dosages de la PCT 57
III.2 Méthode de dosage de la procalcitonine 58
III.2.1 Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale 58
III.2.2 Autres méthodes de dosage de la PCT 65

III.1 Généralités sur la procalcitonine

III.1.1 Structure et biogenèse de la procalcitonine

La procalcitonine (PCT), une pro-hormone de l'hormone calcitonine, a été découverte par Moya *et al*. en 1975 (124). Sa structure moléculaire complète a été décrite neuf ans plus tard par Maruna *et al.* (125). La PCT est une protéine ayant une masse moléculaire de 12,7 kDa, composée de 116 acides aminés et possédant un pont disulfure (*Figure 16*).

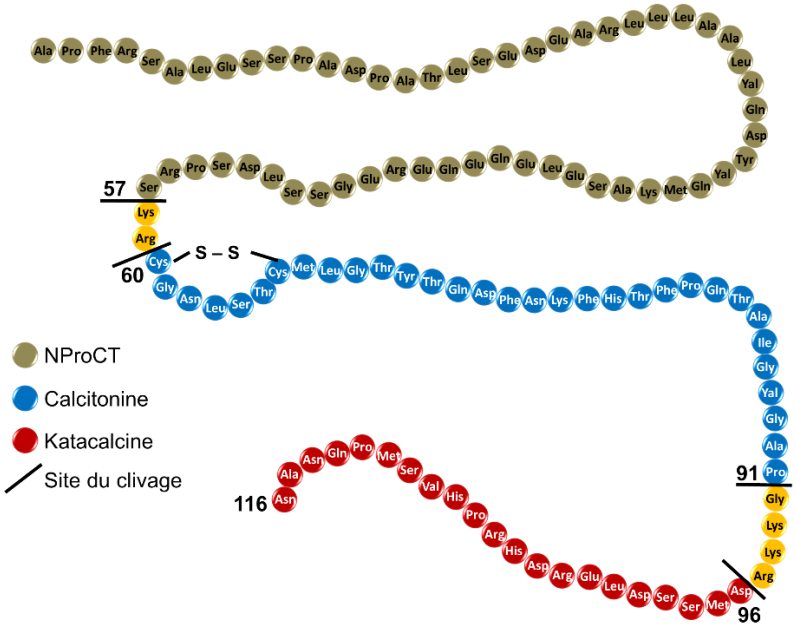


Figure 16. **Séquence d'acides aminés de la PCT humaine** (adapté selon Maruna et al, 2000 ***(125)***

La PCT, une prohormone de l'hormone calcitonine, est composée de 116 acides aminés et possède un pont disulfure (S-S). Lors de la libération dans la circulation sanguine, la PCT est clivée à différentes positions de la séquence d'acide aminé pour former la calcitonine (segment en bleu), la katacalcine (segment en rouge) et la partie N-terminal NProCT (segment en vert).

En conditions physiologiques, la PCT est principalement produite dans les cellules C de la glande thyroïdienne (126). Dans ces cellules, la transcription du gène CALC-I situé sur le bras court du chromosome 11 est responsable de la synthèse de la pré-procalcitonine, une forme de la PCT avec un peptide signal de 25 acides aminés en N-terminal, elle-même dégradée en PCT par l'endopeptidase dans le réticulum endoplasmique. La PCT subit ensuite une protéolyse intra-cellulaire sous l'action de l'enzyme de convertase des prohormones pour donner la calcitonine, un segment de 32 acides aminés situé dans la zone centrale de la PCT, la katacalcine, un segment de 21 acides aminés situé en C-terminal de la PCT et la NProCT, un segment de 57 acides aminés situé en N-terminal de la PCT (127). Dans les conditions physiologiques, la PCT est présente en très faible concentration (< 0,05 ng/mL) dans le sang. La *Figure 17* illustre les différents produits de clivage présents dans le sang dans ces conditions.

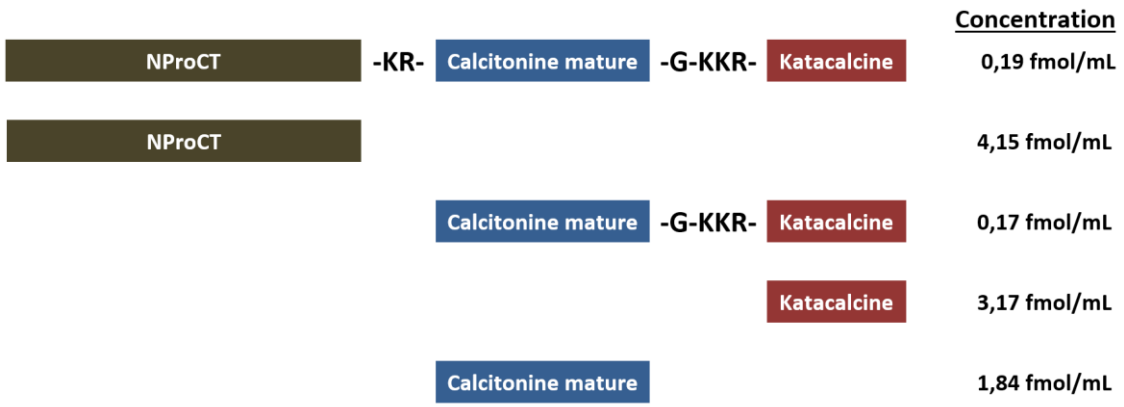


Figure 17. **Différentes formes circulantes de la PCT, ainsi que leurs concentrations respectives dans le sang en conditions physiologiques (adapté selon Becker et al., 2004)**

A l'état normal, la quasi-totalité de la PCT est clivée en NProCT, calcitonine et katacalcine. Par conséquent, les différentes formes de clivage de la PCT sont détectées dans la circulation sanguine. Une forme issue d'un clivage non complet, calcitonine-GKKR-katacalcine est également observée.

III.1.2 Production de la procalcitonine en cas de sepsis d'origine bactérienne

Contrairement aux conditions non-infectieuses où la PCT est sécrétée principalement par la glande thyroïdienne, la PCT est produite par d'autres organes lors d'infections bactériennes (*Figure 18*). En effet, l'augmentation de la concentration de la PCT a été observée chez des sujets thyroïdectomisés infectés, ce qui a permis d'exclure l'hypothèse d'une synthèse thyroïdienne exclusive au cours du sepsis (128). De plus, une étude in vitro a mis en évidence la présence de la PCT ou d'ARN messager codant pour la PCT dans les cellules mononucléées de la circulation sanguine sous la stimulation de toxines produites par des bactéries et les médiateurs d'inflammation (129). En cas de sepsis, la PCT est produite de façon ubiquitaire par tous les organes du corps infectés. Une augmentation de la transcription du gène CALC-1 et une production importante de la PCT par un grand nombre d'organes ont été observées par Müller *et al.* (130). La PCT produite lors d'une infection présente la particularité d'être libérée sous sa forme non clivée dans la circulation sanguine. Cependant, deux autres isoformes de la PCT, correspondant à la perte d'un ou de deux acides aminés en N-terminal ont également été observées. Parmi ces trois formes circulantes de la PCT, la forme majoritaire observée est la forme où les deux acides aminés N-terminaux ont été clivés, et est appelée PCT [3-116] (131,132).

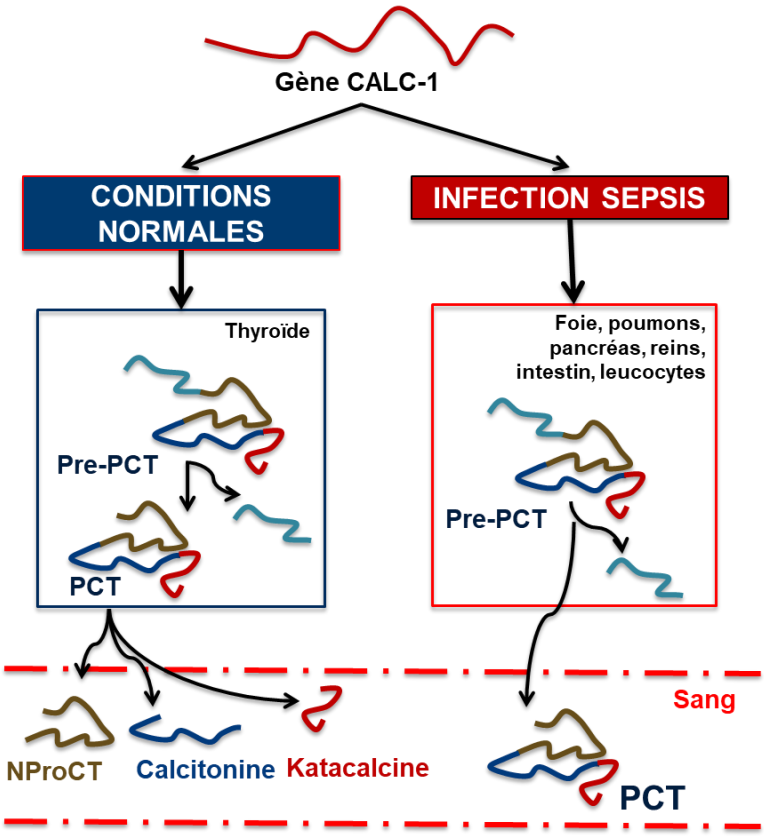


Figure 18. Production de la PCT dans les conditions physiologiques et en cas de sepsis bactérien (adapté de *(133)*)

Le peptide signal de la préprohormone Pre-PCT est clivé pour donner la PCT. Dans des conditions physiologiques la PCT est produite principalement dans les cellules C de la glande thyroïdienne et est quasi-totalement clivée en NProCT, Calcitonine et Katacalcine sous l'action de l'enzyme convertase. Dans le cas d'une infection bactérienne, la préprohormone Pre-PCT est produite dans de nombreux tissus et organes. La PCT issue du clivage de Pre-PCT est libérée directement dans la circulation sanguine sous forme intacte. Ainsi, la PCT est surexprimée en cas d'infection bactérienne.

Dans deux études cinétiques de différents biomarqueurs tels que IL-6, IL-10, TNF-α, CRP et PCT, menées chez des volontaires sains après une injection intraveineuse d'endotoxine *Escherichia coli* ou *Acinebacter baumanii* (129,134), les interleukines IL-6, IL-10 et le facteur TNF-α atteignent leur concentration maximale deux heures après le stimuli bactérien. Cependant la concentration diminue rapidement pour atteindre la concentration de base au bout de 24 heures pour l'IL-10 ($t_{1/2}$ = 2,7-4,5h) et le TNF-α ($t_{1/2}$ = 0,5h) ou au bout de 3 jours pour l'IL-6 ($t_{1/2}$ = 15,5h) (*Figure 19*) (135,136). La concentration de la CRP augmente légèrement six à sept heures après l'infection pour atteindre un maximum en 48 à 72 heures et retourner progressivement à la normale au bout d'une semaine ($t_{1/2}$ = 12h). La PCT est quant à elle détectable quatre heures après l'infection, atteint son pic en 12 heures avec une concentration 3000 fois supérieure à la concentration basale puis se maintient à une concentration stable entre la douzième et la vingt-quatrième heure. La concentration de la PCT reste élevée tant que l'infection persiste. La demi-vie plasmatique de la PCT est

d'environ 22,5 heures. La concentration de la PCT reflète donc l'évolution clinique du patient lors d'une infection bactérienne.

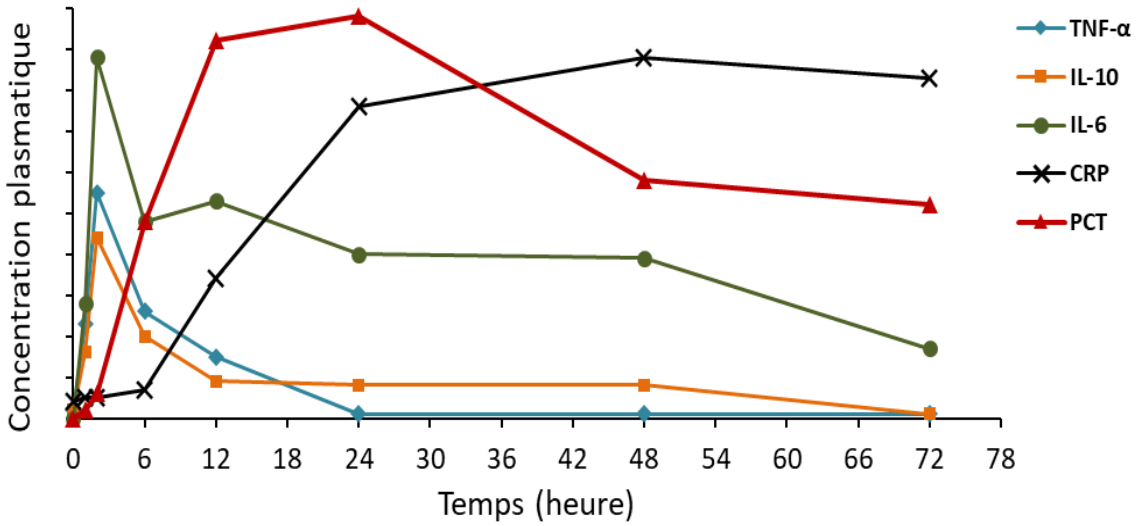


Figure 19. Cinétique de différents biomarqueurs suite à un stimulus bactérien *(137)*

A la suite d'un stimulus par une injection d'endotoxine, les concentrations d'IL-6, TNF-α, IL-10 augmentent rapidement pour atteindre la concentration maximale au bout de 2 heures, puis diminuent rapidement vers l'état basal au bout de 72 heures. La concentration de CRP augmente 6 heures après l'injection et atteint la concentration maximale entre 48 heures et 72 heures, puis elle revient à la concentration normale au bout d'une semaine. La concentration de la PCT augmente 2 heures après le stimulus et atteint son pic de concentration maximale en 12 à 24 heures. La concentration de la PCT reste élevée tant que l'infection persiste. Concentration plasmatique exprimée en ng/mL (PCT), µg/mL (CRP), pg/mL (IL-6, IL-10, TNF-α).

Par ailleurs, il est important de noter que la production de la PCT n'est pas stimulée par les agents pathogènes d'origine virale. En effet, les cytokines telles que l'interféron-gamma INF-γ produit lors d'une infection virale inhibe la production de la PCT (133). Une étude observationnelle rétrospective de Cuquemelle *et al.* réalisée sur 52 patients de services des soins intensifs a montré que la concentration moyenne de la PCT dans le sang reste très faible, inférieure à 0,5 ng/mL chez les patients ayant développé une infection virale, tandis qu'elle augmentait fortement dans le cas d'une infection bactérienne (29,5 ng/mL) (138).

La PCT est donc un biomarqueur plus spécifique des infections bactériennes par rapport aux autres biomarqueurs et sa cinétique est en accord avec l'évolution clinique du patient (139). Parmi les indicateurs couramment utilisés en service de soins intensifs pour le diagnostic du sepsis, tels que la numération des globules blancs, la CRP, le lactate et la PCT, la supériorité de la PCT dans le diagnostic du sepsis bactérien a été suggérée dans plusieurs travaux. En effet, Müller *et al.* ont montré qu'une concentration de la PCT supérieure à 1,0 ng/mL est associée à une spécificité et une sensitivité supérieures (94 % et 89 %, respectivement) au lactate, à la CRP et à l'IL-6 dans le diagnostic du sepsis dans les services

des soins intensifs (140). De plus, une méta-analyse basée sur les données de 22 études cliniques avec 138 patients présentant une suspicion d'infection a montré une capacité supérieure de la PCT par rapport à la CRP pour le diagnostic de l'infection bactérienne (141). Une méta-analyse a rapporté une sensibilité et spécificité moyenne de respectivement 0,77 et 0,79 dans le diagnostic du sepsis en synthétisant les données de 30 études cliniques impliquant 3 244 patients hospitalisés entre 1996 et 2004 (142). Les auteurs ont conclu que la PCT est un indicateur efficace dans le diagnostic précoce du sepsis.

III.1.3 Utilisation de la PCT pour le diagnostic du sepsis, la stratification des patients et l'antibiothérapie

Grâce à une excellente corrélation entre la concentration de la PCT et l'évolution clinique du patient en cas de sepsis, la PCT fait partie des trois biomarqueurs utilisés en routine avec la CRP et le lactate pour le diagnostic du sepsis d'origine bactérienne et la stratification des patients (15,5 % des prescriptions biomarqueurs du sepsis) (95). Le taux d'utilisation de la PCT par rapport aux autres biomarqueurs du sepsis augmente chaque année (7,1 % en 2012, 11,3 % en 2013 et 22,1 % en 2014) (95). La spécificité de la PCT pour le sepsis d'origine bactérienne permet également son utilisation comme un outil efficace pour aider les cliniciens dans la gestion du traitement antibiotique.

- **Implication des dosages de la PCT dans le diagnostic du sepsis et la stratification des patients**

En plus de la spécificité élevée de ce biomarqueur pour le diagnostic du sepsis bactérien, il a été montré que le niveau de concentration de la PCT est également révélateur de la sévérité du sepsis. En effet, une étude basée sur les dosages de la PCT chez 78 patients a permis non seulement d'identifier le sepsis bactérien chez 60 patients mais également de distinguer les différents niveaux de sévérité du sepsis (14 cas de sepsis, 21 cas de sepsis sévère et 25 cas de choc septique) (143). De plus, une étude de Vincent et Beumier réalisée en 2013 a montré une forte corrélation entre la concentration de la PCT et les scores de sévérité tels que SOFA, APACHE (*Acute physiology and Chronic Hearth Disease Classification System II*) et SAPS (*Simplified Acute Physiology Score*), qui sont principalement basés sur les signes cliniques et les résultats des tests de fonctions physiologiques (144). Les différents niveaux de seuil de concentration de la PCT permettant la stratification des patients selon la sévérité classée d'après la deuxième définition du sepsis sont de 0,5 ng/mL pour le sepsis, 2 ng/mL pour le sepsis sévère et 10 ng/mL pour le choc septique (145) (*Figure 20*). Les seuils de concentration n'ont pas été révisés suite à la troisième définition.

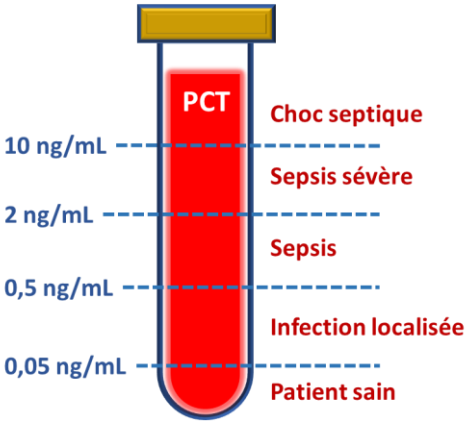


***Figure 20. Stratification des patients en fonction de la concentration de* la PCT** (145).

La concentration de la PCT reste faible, inférieure à 0,05 ng/mL chez les sujets sains. Le diagnostic du sepsis est établi si la concentration de la PCT est supérieure à 0,5 ng/mL. Le patient est en cas de sepsis sévère lorsque la concentration de la PCT est supérieure à 2 ng/mL et en cas de choc septique si celle-ci est supérieure à 10 ng/mL.

Il a également été montré que l'utilisation des dosages de la PCT dans le contexte du sepsis permettait de prédire la mortalité des patients. Une étude observationnelle a été conduite dans 13 services de soins intensifs aux Etats-Unis avec 646 patients de 2010 à 2014 pour étudier la relation entre les concentrations de la PCT et la mortalité des patients. L'étude a montré que le taux de mortalité à 28 jours est deux fois plus important chez les patients dont la concentration de la PCT n'a pas diminuée de plus de 80 % quatre jours après un diagnostic du sepsis sévère ou un choc septique (146).

Il existe également des recommandations établissant des seuils cliniques de la PCT dans le cas spécifique du diagnostic de l'infection des voies respiratoires inférieures (IRI ou LRTI pour Lower Respiratory Tract Infection en anglais). Pour ces patients, une concentration de la PCT inférieure à 0,25 ng/mL dans le sang indique une faible probabilité de souffrir d'une infection bactérienne (147).

❖ **Implication des dosages de la PCT dans la gestion du traitement antibiotique**

La spécificité de la PCT pour le diagnostic du sepsis bactérien a développé son utilisation pour aider à guider la prescription d'antibiotiques chez les patients atteints du sepsis. Les algorithmes de décisions thérapeutiques guidées par la concentration de la PCT dans le cas d'infections bactériennes en réanimation sont présentés dans la *Figure 21*. Les recommandations sont de ne pas initier de traitement antibiotique lorsque la concentration de la PCT est inférieure à 0,5 ng/mL, avec une recommandation d'autant plus forte si la concentration de la PCT est en-dessous de 0,25 ng/mL. Au contraire, il est fortement recommandé d'administrer les antibiotiques quand la concentration de la PCT est supérieure à 1 ng/mL. De plus, le suivi de la concentration de la PCT dans le temps permet également d'adapter le traitement antibiotique. En effet, un arrêt du traitement antibiotique est

souhaitable si la concentration de la PCT est inférieure à 0,5 ng/mL ou si sa décroissance excède 80 % par rapport au pic maximal de la concentration plasmatique/sérique. Dans le cas contraire, il est recommandé de maintenir ce traitement antibiotique. Un changement de stratégie d'antibiothérapie est fortement recommandé si la concentration de la PCT continue à augmenter et si celle-ci est supérieure à 0,5 ng/mL.

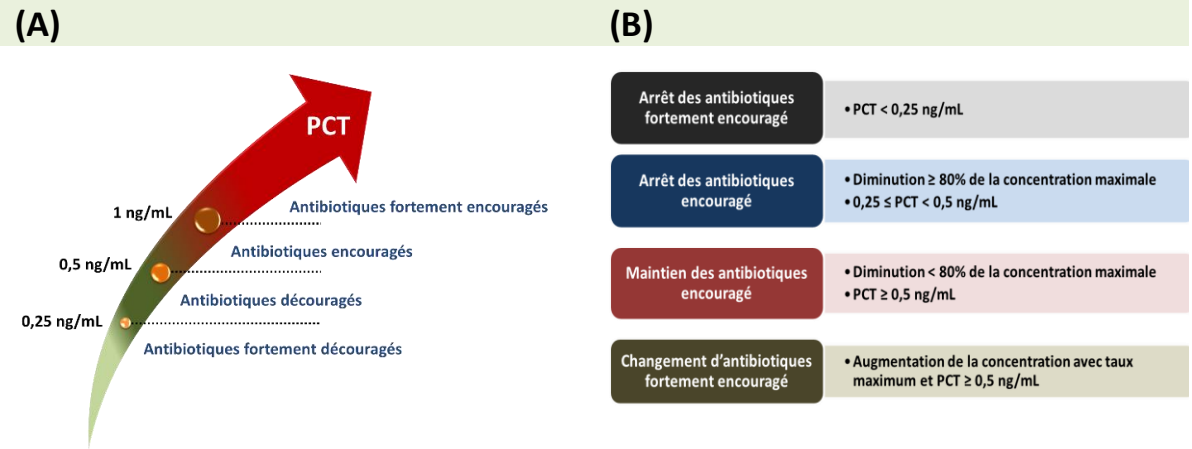


Figure 21. Recommandations pour l'initiation d'une antibiothérapie (A) et le suivi thérapeutique en dehors des situations d'urgence thérapeutique (méningite, choc septique) (B) en fonction de la concentration de la PCT *(148)*.

En complément des signes cliniques, les dosages de la PCT sont intégrés dans le parcours de soin du patient atteint du sepsis dans le but d'aider les cliniciens pour l'initiation du traitement antibiotique et le suivi du traitement antibiotique. En fonction de la concentration mesurée de la PCT, il est conseillé d'initier, de maintenir ou d'arrêter le traitement antibiotique.

L'implémentation de ces algorithmes de décision thérapeutique dans la gestion du traitement antibiotique chez les patients atteints du sepsis est mentionnée par certaines recommandations internationales, telles que l'agence américaine de la recherche et de la qualité des soins de santé (AHRQ pour *Agency for Healthcare Research and Quality*), la société américaine des maladies infectieuses (IDSA pour *Infectious Diseases Society of America*) et l'institut national pour l'excellence de la santé et des soins au Royaume-Uni (NICE pour *National Institute for Health and Care Excellence*) (*Tableau 3*). Ces recommandations ont été établies par l'évaluation des résultats d'essais cliniques. En fonction des critères et de la qualité des études cliniques inclus dans chaque évaluation, les recommandations peuvent néanmoins être différentes. Dans le cas où il s'agit d'interrompre le traitement antibiotique chez les patients atteints du sepsis, l'inclusion d'un dosage de la PCT dans l'algorithme de décision thérapeutique est préconisée dans les recommandations AHRQ 2012 et IDSA 2016, mais ne l'est pas dans les recommandations NICE 2016 en raison d'un niveau de preuve insuffisant. Ces recommandations portent également sur l'utilisation des dosages de la PCT dans la gestion et la prise en charge thérapeutique des patients atteints de l'infection IRI (*Tableau 3*).

Tableau 3. Recommandations pour l'utilisation des dosages de la PCT dans le traitement antibiotique chez les patients atteints de sepsis ou d'infection des voies respiratoires inférieures *(149–152)*

	Arrêt du traitement chez les patients sepsis	Début du traitement chez les patients IRI	Arrêt du traitement chez les patients IRI
AHRQ 2012	Recommandé Niveau de preuve élevé	Recommandé Niveau de preuve élevé	Recommandé Niveau de preuve élevé
IDSA 2016	Recommandé Niveau de preuve faible	Non recommandé Niveau de preuve modéré	Recommandé Niveau de preuve faible
NICE 2016	Non recommandé Niveau de preuve insuffisant	Recommandé Niveau de preuve modéré	Recommandé Niveau de preuve modéré

III.1.4 Bénéfices des dosages de la PCT dans la gestion et la prise en charge des patients

Les données cliniques ont montré que l'utilisation des dosages de la PCT est associée à de nombreux bénéfices non seulement pour les patients (réduction de la durée du traitement antibiotique, réduction des effets indésirables liés au traitement, réduction de la durée d'hospitalisation) mais également pour le système de santé (réduction des coûts).

Le dosage de la PCT est un outil efficace pour confirmer une prescription appropriée et ainsi réduire l'utilisation inappropriée et la durée du traitement antibiotique et ses effets indésirables. L'étude de Nobre *et al.* a montré une réduction de la durée du traitement antibiotique de dix jours à six jours chez les patients atteints de sepsis sévère et de choc septique en utilisant les algorithmes de décision thérapeutique basés sur les dosages de la PCT (153). Dans une étude randomisée (PRORATA) menée dans sept services de soins intensifs en France et incluant 621 patients suspectés d'infections bactériennes, une réduction de la durée de traitement antibiotique de 2,7 jours a été rapportée chez les patients traités selon le protocole basé sur le dosage de la PCT (148). De plus, une étude randomisée menée entre 2009 et 2013 chez des patients atteints du sepsis admis aux services des soins intensifs aux Pays-Bas a montré une réduction de la consommation journalière des antibiotiques de 2,69 doses définies journalières, ainsi qu'une diminution de la durée de traitement de 1,22 jours en utilisant des algorithmes de décision thérapeutique incluant les dosages de la PCT. Ces patients ont également présenté un risque de mortalité moins élevé que ceux du groupe de contrôle (154). Dans le cas particulier des infections IRI, le dosage de la PCT montre également un réel bénéfice en termes de réduction de durée de traitement antibiotique et des effets indésirables associés. En effet, selon une étude observationnelle (PROREAL) menée dans 14 centres hospitaliers en Europe et aux Etats-Unis avec 1520 patients, l'implémentation des algorithmes de décision thérapeutique basés sur

les concentrations de la PCT a permis de réduire la durée de traitement antibiotique (5,9 jours au lieu de 7,4 jours) et les effets secondaires liés au traitement (nausée, diarrhée, vomissement, réactions allergiques) sans augmenter les risques de complication tels que le syndrome de détresse respiratoire aigüe ou l'empyème (155). Une autre revue avec 6708 participants a montré une réduction de 2,4 jours de traitement antibiotique chez les patients souffrant d'infection aigüe des voies respiratoires (inférieures et supérieures) en utilisant les dosages de la PCT pour guider le traitement (156). Ces derniers permettent donc de réduire la durée du traitement antibiotique, de réduire les effets indésirables liés au traitement et potentiellement de ralentir l'apparition de nouvelles souches résistantes aux antibiotiques (157). Au contraire, une étude multicentrique randomisée (PROACT) avec 1656 patients présentant une suspicion d'infection IRI, a montré que la durée de traitement antibiotique n'était pas différente entre deux groupes de patients avec ou sans les dosages de la PCT (158). Cependant, les auteurs ont souligné certaines limites de cette étude telles que le manque d'expérience des cliniciens dans l'utilisation des dosages de la PCT et la non-disponibilité du résultat de la PCT avant la prise de décision dans certaines situations.

En ce qui concerne la durée d'hospitalisation, une étude rétrospective menée par Balk et al. chez 132 112 patients admis dans les services des soins intensifs aux Etats-Unis, dont 33 569 patients ont reçu des dosages de la PCT dès le premier jour d'hospitalisation, a montré une réduction significative de 1,1 jours de la durée totale d'hospitalisation chez les patients suivis par les dosages de la PCT (159). Au contraire, deux études de Christ-Crain et al. n'ont pas confirmé ce bénéfice sur la durée du séjour hospitalier chez les patients ayant eu recours aux dosages de la PCT (160,161). Cependant, les dosages de la PCT ont été réalisés par des méthodes semi-quantitatives, dont la performance analytique peut être remise en question.

L'apport économique des dosages de la PCT est quant à lui plus controversé. En effet, selon une étude de Christ-Crain et al., l'utilisation du dosage de la PCT n'apporte pas de bénéfices d'un point de vue strictement économique. L'algorithme de décision thérapeutique basé sur la concentration de la PCT a permis de réduire les coûts liés au traitement antibiotique grâce à la réduction de la durée du traitement. Cependant, le prix des dosages initiaux et répétés de la PCT excède celui du traitement antibiotique, ce qui entraine un surcoût dans le groupe guidé par les dosages de la PCT par rapport au groupe contrôle (290 dollars US versus 190 dollars US, respectivement) (161). Une étude récente de *Kip et al.* a également rapporté un surcoût de 2 704 euros par an chez les patients dont le parcours de soins est guidé par la concentration de la PCT dans les services de soins intensifs aux Pays-Bas (162). Au contraire, une étude de Balk *et al.* a rapporté une diminution significative du coût hospitalier de 2 759 dollars US, ce qui représente environ 10 % du coût total d'hospitalisation, chez le groupe de patients avec prescription du dosage de la PCT (159). Une autre étude a montré que l'intégration des dosages de la PCT dans la prise en charge des patients atteints du sepsis ou d'IRI permet de réduire le coût hospitalier de 49 % et 23 %, respectivement (163). Par conséquent, il est difficile d'évaluer le rapport coût-

bénéfice des dosages de la PCT car ils sont sur-prescrits dans certaines situations ou parfois prescrits systématiquement sans être en accord avec les manifestations cliniques chez les patients. En effet, une étude de Salinas *et al.* menée dans 57 hôpitaux en Espagne a rapporté que 44,1 % des 142 644 dosages de la PCT réalisés en 2016 auraient pu être évités, entraînant une réduction des coût de 594 390 dollars (164).

Bien que certaines études n'aient pas observé les mêmes bénéfices apportés par les dosages de la PCT, en particulier en ce qui concerne la réduction du coût financier, de nombreuses études, montrent un grand intérêt de ces dosages dans le diagnostic du sepsis et la prise en charge thérapeutique.

III.1.5 Limites des dosages de la PCT

Dans certaines situations d'infection bactérienne, la concentration de la PCT dans la circulation sanguine reste très faible sans augmentation notable. Les cas connus de faux négatifs sont présentés dans le *Tableau 4*.

Tableau 4. Situation de faux négatifs des dosages de la PCT

Situation	Etudes
Infection localisée (abcès des parties molles, appendicite aigüe non compliquée, arthrite, ostéomyélite)	(165)
Dosage chez les patients sous antibiothérapie efficace	(166)

Par ailleurs, la spécificité des dosages de la PCT pour l'infection bactérienne n'est pas parfaite (spécificité de 0,79), et il est recommandé d'interpréter le résultat de dosage de la PCT étroitement avec le contexte clinique (142). En effet, il existe des situations cliniques non infectieuses où une augmentation non spécifique de la PCT dans la circulation sanguine est observée (167,168). Les cas connus de faux positifs sont présentés dans le *Tableau 5*.

Tableau 5. Situations de faux positif des dosages de la PCT

Situation	Etudes
Nouveau-nés dans les premiers jours suivant la naissance	(169)
Insuffisance rénale préterminale ou en cas des séances itératives d'hémodialyse	(167)
Cancer médullaire de la thyroïde, cancer à petites cellules du poumon, carcinoïde	(168)
Syndrome d'activation macrophagique	(170)
Traumatisme	(171)
Maladie de Kawasaki	(172)
Traitement antirejet par des globulines anti-thymocytes	(173)
Syndrome hyper immunoglobuline IgD	(141)
Infection virale Covid-19	(174)

III.2 Méthode de dosage de la procalcitonine

III.2.1 Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale

A l'heure actuelle, de nombreuses méthodes sont commercialisées pour la quantification de la PCT. Ce sont exclusivement des immunoessais dont les caractéristiques sont décrites dans le *Tableau 6*.

Tableau 6. Caractéristiques des méthodes de dosage de la PCT disponibles commercialement

Immunoessai (Compagnie)	Date de la première autorisation	Type d'autorisation	Predicate Device	Instrument	Principe technique	Anticorps	Volume d'échantillon type de matrice	Gamme de mesure (ng/mL)
BRAHMS PCT LIA (BRAHMS Diagnostica)	2005	FDA 510(k) - Marquage CE	Endotoxin Activity Assay	Luminomètre	Immunoluminométrie	Deux mAb anti PCT	20 µL Se, P	0.3-500
BRAHMS PCT Sensitive Kryptor (BRAHMS diagnostica)	2009	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT LIA	Kryptor Test System	Time-resolved amplified cryptate emission (TRACE) immunoassay	Sheep anti-PCT pAb cryptate labeled Mouse anti-PCT mAb XL665 labeled	50 µL Se, H, E	0.02-50
Architect BRAHMS PCT (Abbott)	2017	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Architect i2000SR	Chimiluminescence	mAb anti-PCT mAb anti-PCT conjugué l'acridinium	100 µL Se, L, K2	0.02-100
Vidas BRAHMS PCT (Biomérieux)	2009	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT LIA	Vidas	Fluorescence	mAb anti-PCT mAb anti-PCT conjugué l'alkaline phosphatase	200 µL Se, L	0.05-200
Liaison BRAHMS PCT II Gen (Diasorin)	2015	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Vidas	Liaison	Chimiluminescence	mAb anti-PCT katacalcine mAb conjugué à l'isoluminol	225 µL Se, L	0.02-100
Lumipulse G BRAHMS PCT (Fujirebio)	2016	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Lumipulse G system	Chimiluminescence	mAb anti-PCT mAb anti-PCT calcitonine mAb anti-PCT conjugué à l'alkaline phosphatase	60 µL Se, N, L, K2	0.02-100
Elecsys BRAHMS PCT (Roche Diagnostics)	2009	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Cobas e 411	Chimiluminescence	mAb anti-PCT greffé aux biotines mAb conjugué au ruthenium	30 µL Se, K2, K3, L	0.02-100
Atellica IM BRAHMS PCT (Siemens healthcare)	2018	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Atellica IM	Chimiluminescence	mAb anti-PCT conjugué à l'ester d'acridiniummAb anti-PCT greffé à l'unité fluorescent	100 µL Se, E, L, N	0.04-50

Alinity I BRAHMS PCT (Abbott)	n.c	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Alinity i	Chimiluminescence	mAb anti-PCT mAb anti-PCT conjugué à l'ester d'acridinium	150 µL Se, E, H	0.02-100
Advia Centuar BRAHMS PCT (Siemens)	2011	Marquage CE	n.c	Advia centaur XP and CP	Chimiluminescence	mAb anti-PCT conjugué à l'ester d'acridinium mAb anti-PCT greffé à l'unité fluorescent	100 µL Se, E, H	0.02-75
Vitros BRAHMS PCT (Ortho Clincal Diagnostics)	n.c	Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	VITROS 3600	Chimiluminescence	mAb anti-PCT greffé aux biotines mAb anti-PCT greffé à la peroxydase de raifort	60 µL Se, E, L	0.02-100
Access PCT (Beckman Coulter)	2019	Marquage CE	BRAHMS PCT Vidas	UniCel DXI or Access	Chimiluminescence	mAb anti-PCT mAb anti-PCT conjugué à l'alkaline phosphatase	35 µL Se, L, K2	0.01-100
Diazyme PCT (Diazyme Laboratories)	2017	FDA 510(k) – Marquage CE	BRAHMS PCT Vidas	Olympus Beckman AU400 chemistry	Immunotubidimétrie	mAb anti-PCT	15 µL Se, E, L	0.2-52
Maglumi PCT (Shenzhen)	n.c	Marquage CE	n.c	Maglumi	Chimiluminescence	mAb anti-PCTmAb anti-PCT conjugé à l'ABEI	40 µL Se, E, Ewb	0.13-100
Diasys PCT FS (Diasys Diagnostic GmbH)	2020	Marquage CE	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Cobas c501 chemistry analyzer	Immunotubidimétrie	pAb anti-PCT	10 µL Se, L	0.2-50

mAb : anticorps monoclonal ; pAb : anticorps polyclonal ;
Se : sérum ; P : plasma ; H : plasma hépariné ; E : plasma EDTA ; L : plasma hépariné au lithium; K2 : plasma K2EDTA ; N : plasma hépariné au sodium ; K3 : plasma K3EDTA ; Ewb : sang total EDTA

Les immunoessais reposent sur le principe de reconnaissance immunologique spécifique entre un antigène et un anticorps pour former un complexe antigène-anticorps dans le but de quantifier l'antigène dans un échantillon donné. Le choix de l'anticorps représente donc une étape importante dans le développement et s'avère crucial pour les performances de la méthode. Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser un agent étranger (appelé antigène) de manière spécifique. Il existe deux types d'anticorps : les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux. Chaque type d'anticorps possède des caractéristiques différentes en termes de spécificité et de sensibilité. La plupart des méthodes de dosage de la PCT utilisent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent spécifiquement un seul épitope de l'antigène. Ce type d'anticorps est donc plus spécifique mais aussi plus difficile à produire. Les anticorps polyclonaux, implémentés par seulement deux méthodes (Brahms Kryptor et Diasys Petia essais), reconnaissent différents épitopes de l'antigène et sa reconnaissance est moins impactée par de petits changements structuraux d'un épitope. Ce dernier est donc plus sensible, mais il présente plus de risque d'avoir des réactions croisées. En général, que ce soit avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, le dosage de la PCT implique l'utilisation de deux anticorps : un anticorps de capture anti-PCT et un anticorps de détection anti-PCT. L'anticorps de capture est souvent directement greffé sur un support tel que les billes magnétiques, la paroi de la plaque de titration ou indirectement via le complexe streptavidine-biotine (Elecsys Brahms, Vitros Brahms). Après la reconnaissance entre l'anticorps et l'antigène, l'anticorps de détection portant une enzyme ou un réactif qui sert à la détection est ajouté pour former un complexe anticorps-antigène-anticorps. Dans certaines méthodes de dosage telles que Lumipulse G Brahms, Atellica IM Brahms, Advia Centuar Brahms, un troisième anticorps est utilisé pour amplifier les signaux à détecter. Le principe de l'immunoessai est illustré sur la *Figure 22*.

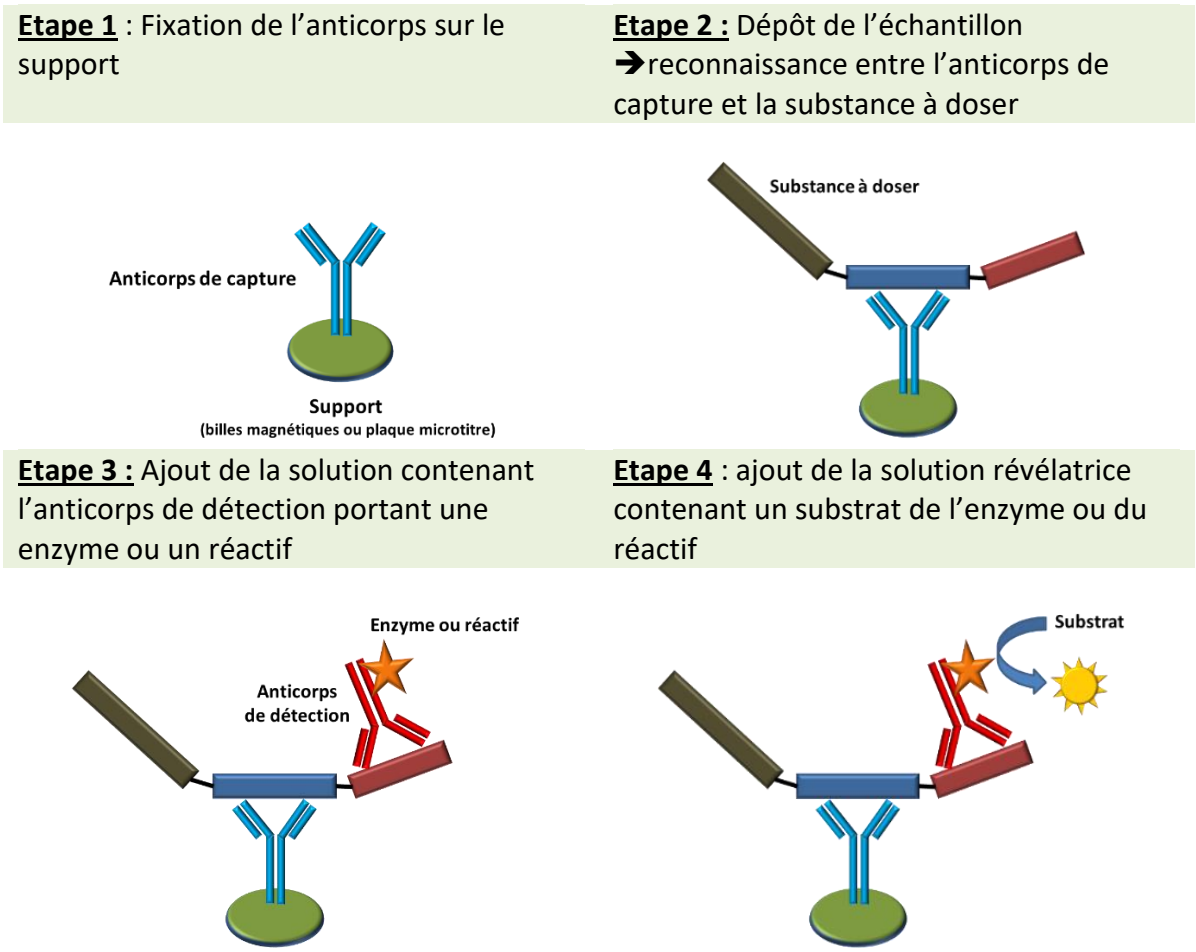


Figure 22 : Illustration des différentes étapes d'un dosage immunoessai

La première étape consiste à fixer sur un support, l'anticorps de capture. Ensuite, l'échantillon est déposé. L'anticorps de capture reconnait alors le ou les épitopes de la substance à doser. La troisième étape consiste à ajouter une solution contenant l'anticorps de détection. Cet anticorps de détection greffé d'une enzyme ou d'un réactif se fixe en général sur un autre épitope de la substance à doser. La dernière étape consiste à ajouter une solution révélatrice contenant un substrat de l'enzyme ou du réactif pour générer les signaux à mesurer.

Les méthodes de dosage de la PCT se distinguent non seulement par le type d'anticorps utilisé mais également par d'autres caractéristiques techniques telles que la technique de détection, l'enzyme et les réactifs. Les techniques de détection des méthodes de dosage de la PCT utilisées en routine appartiennent à quatre catégories différentes : la chimiluminescence, la turbidimétrie, la fluorescence et la technique dite « *time resolved amplified cryptate emission* ».

La chimiluminescence est la technique de détection la plus utilisée pour quantifier la PCT en routine. Elle est implémentée dans les essais Architect Brahms, Liasion Brahms, Lumipulse Brahms, Advia Brahms, Atellica Brahms, Beckman Access et Maglumi. Le principe de la chimiluminescence est l'émission d'un photon lors du retour d'un état excité à l'état

stable (désexcitation) du produit généré au cours de la réaction chimique (souvent une oxydation). La détection par chimiluminescence est considérée comme la plus sensible avec une large gamme dynamique de détection grâce à un très faible bruit de fond (175). Les techniques reposant sur la chimiluminescence peuvent impliquer différents types de réactions chimiques : une réaction d'oxydation directe du réactif greffé sur l'anticorps, une réaction d'oxydation catalysée par l'enzyme greffée sur l'anticorps ou une réaction d'oxydoréduction du réactif greffé sur l'anticorps. La réaction d'oxydation directe est abondamment utilisée dans les immunoessais utilisés en routine. Dans ce cas, le réactif est greffé directement sur l'anticorps et est oxydé en présence de peroxyde d'hydrogène. Le réactif acridinium (Architect Brahms, Atellica Brahms et Advia Brahms) ou le réactif isoluminol (Liaison Brahms, Maglumi essai) sont les plus couramment utilisés. L'intensité des signaux obtenus par le réactif luminol est 100 fois moins importante que celle obtenue avec le réactif acridinium. Quant à la réaction d'oxydation catalysée par l'enzyme greffée sur l'anticorps, l'enzyme permet d'amplifier la réaction pour générer un produit intermédiaire instable. Cette méthode est techniquement similaire à la technique de dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (ELISA pour enzyme-linked immunosorbent assay), mais à la place des substrats chromogènes, les substrats luminescents sont utilisés. L'enzyme utilisée peut-être la phosphatase alcaline (Lumipulse Brahms, Access essais) ou la peroxydase de raifort (Vitros Brahms). Chaque enzyme a son propre substrat, le substrat dit « AMPPD » est utilisé pour les essais reposant sur la phosphatase alcaline et le luminol est utilisé pour les essais reposant sur la peroxydase de raifort. La dernière sous-catégorie de techniques basées sur la chimiluminescence consiste à greffer un complexe de ruthénium sur l'anticorps. Le complexe ruthénium subit une réaction électrochimique pour générer un complexe instable qui émet de la lumière quand il revient à l'état de base. Cette technique est implémentée dans la méthode Elecsys Brahms.

La technique par fluorescence est basée sur le décalage de Stokes entre la longueur d'onde utilisée pour exciter le fluorophore et la longueur d'onde de détection à laquelle la lumière est émise par le fluorophore. Le marqueur fluorescent peut-être greffé directement sur l'anticorps de détection ou généré grâce à la réaction entre l'enzyme et le substrat. La méthode Vidas Brahms quantifie la PCT dans le sérum/plasma par cette technique en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline greffée sur l'anticorps de détection.

La technique de turbidimétrie consiste à mesurer la turbidité d'une suspension grâce à un spectromètre par la diminution de l'intensité du rayon lumineux incident. Cette technique met en jeu une précipitation entre l'analyte à quantifier et les anticorps de précipitation. Cette technique est utilisée pour le dosage de la PCT avec les méthodes Diazyme et Diasys PETIA. Ces deux méthodes présentent une sensibilité inférieure par rapport aux autres méthodes de dosage de la PCT (176).

La technique dite « time resolved amplified cryptate emission » est utilisée dans la méthode Brahms Kryptor. Elle consiste à mesurer les lumières émises par le complexe

antigène-anticorps pendant un temps prolongé par rapport au temps d'émission de base. Le principe est basé sur la transmission de l'énergie non radiative entre deux entités appelées le donneur et l'accepteur qui sont greffées sur deux anticorps différents. Quand l'anticorps de l'entité accepteur n'est pas lié à la PCT, l'accepteur émet de la lumière pendant un temps très court de l'ordre de la nanoseconde sous l'excitation d'un laser à azote. Quand il y a une reconnaissance entre les anticorps et la PCT pour former un complexe, sous l'excitation, il se produit un transfert d'énergie de l'entité donneuse. Les lumières émises sont donc amplifiées et prolongées de l'ordre de la microseconde. Le signal mesuré durant ce temps prolongé est proportionnel à la quantité de la PCT dans l'échantillon.

Parmi les méthodes de dosage de la PCT, la méthode Brahms Kryptor a été la première méthode approuvée par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA pour *Food and Drug Administration*) pour son utilisation dans le diagnostic du sepsis. Cette méthode a été utilisée pour établir les seuils de décision clinique dans le cadre du diagnostic du sepsis. La méthode Vidas Brahms a été, quant à elle, approuvée par la FDA pour son utilisation afin de guider le traitement antibiotique chez les patients atteints du sepsis et de l'infection IRI. La plupart des méthodes de dosage de la PCT partagent la même désignation « Brahms PCT » (*Tableau 6*), développée par la société Brahms GmbH dans le but d'améliorer la comparabilité des résultats de mesure entre ces méthodes. En effet, ces méthodes sont étalonnées par un même étalon fourni par le fabricant Brahms GmbH, les résultats obtenus par ces méthodes sont donc raccordés à cet étalon commun. Tandis que les autres méthodes telles que la méthode Diazyme PCT, Access PCT, Maglumi et Diasys PCT qui n'appartiennent pas à la désignation Brahms PCT, utilisent leur propre étalon pour étalonner leurs propres méthodes, les résultats obtenus par ces méthodes ne sont pas donc traçables au même étalon que les méthodes de type « Brahms ». Par conséquent, les résultats obtenus par différentes méthodes de routine ne sont pas harmonisés vers un étalon commun, comme dans le cas des méthodes Brahms PCT.

Le temps d'analyse de ces immunoessais est relativement court, moins de 30 minutes, cependant ce temps est augmenté par les différentes étapes d'un examen de biologie médicale classique. Afin de répondre au besoin de diagnostic précoce et de gagner du temps sur le processus décisionnel clinique pour le diagnostic du sepsis, des méthodes d'analyse délocalisées dites « *point of care tests* » (POCT) ont été développées (*Tableau 7*). Le principal avantage des POCT est de réaliser des tests à proximité directe du patient en déposant des gouttes de sang sur un lecteur d'analyse et d'obtenir directement le résultat dans un délai d'environ 20 minutes. De plus, un autre avantage des POCT est que ces tests peuvent être réalisés par du personnel non nécessairement formé en laboratoire d'analyse de biologie médicale (177).

Tableau 7. Les tests dits « Point of care » POCT disponible pour le dosage de la PCT

Tests 'Point of care' (Fabricant)
BRAHMS PCT Direct (Thermo Scientific)
BRAHMS PCT Samsung IB (Samsung)
AQT90 Flex PCT (Radiometer)
One step test PCT (Getein)
iChroma PCT (Boditech)
ABSOGEN PCT (Bumyoungbio)
TIRF POCT (Helmholtz Zentrum Müchen)
Diazyme PCT POC Test Kit (Diazyme Laboratories)

La PCT est quantifiée par un nombre important de méthodes immunoessais en routine. Cependant, ces méthodes se différencient par de nombreuses caractéristiques techniques et performances. Ces différences pourraient être une source de variabilité des résultats obtenus par ces méthodes.

III.2.2 Autres méthodes de dosage de la PCT

Au cours des dernières années, la quantification de la PCT dans les matrices biologiques (sérum, plasma) a fait le sujet de nombreux travaux de recherche (178–182). Ces méthodes utilisent des anticorps pour purifier sélectivement la PCT et quantifient par différentes techniques telles que l'électrochimie, la résonance des plasmons, l'interférométrie photonique, entre autres. Parmi ces projets, il est important de noter deux projets de quantification par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance (LC-MS). Le premier projet a été mené par Krastins *et al.* en 2013 (183). Les auteurs ont développé une méthode de quantification simultanée d'un panel de biomarqueurs de nombreuses pathologies dans le sérum et le plasma, dont la PCT. Dans cette étude, une limite de détection de 1 ng/mL a été obtenue à partir d'un volume d'essai d'1 mL de sérum/plasma suivi d'une étape d'immuno-extraction des protéines d'intérêt et d'une digestion enzymatique par la trypsine avant l'analyse par LC-MS (183). Le second projet de quantification de la PCT par LC-MS a été mené par Dubois *et al.* en 2019. Une limite de quantification de 0,1 ng/mL a été observée avec un volume de prise d'essai de 100 µL seulement (184). Contrairement au premier projet, l'étape de préparation de l'échantillon est principalement réalisée au niveau peptidique après la digestion enzymatique des protéines en utilisant les anticorps anti-peptides de type SISCAPA. Ces différentes approches de préparation des échantillons et d'analyse par LC-MS seront détaillées dans la section A.IV.4.

Chapitre IV
Quantification de protéines en matrice complexe par ID-LC-MS/MS

IV.1 Sérum et protéines du sérum 68
IV.2 Quantification par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.. 71
IV.2.1 Séparation par chromatographie en phase liquide 71
IV.2.2 Détection par spectrométrie de masse 72
IV.3 Quantification de protéines par ID LC-MS 79
IV.3.1 Approches protéomiques 79
IV.3.2 Stratégie de quantification de la PCT 82
IV.4 Traitement de l'échantillon 87
IV.4.1 Dénaturation des protéines 91
IV.4.2 Précipitation des protéines 91
IV.4.3 Ultrafiltration des protéines 92
IV.4.4 Extraction en phase solide 93
IV.4.5 Déplétion des protéines 94
IV.4.6 Immunoaffinité 95

IV.1 Sérum et protéines du sérum

Les matrices biologiques telles que le sang (sérum/plasma), l'urine et le liquide céphalorachidien sont des sources très riches en informations qui reflètent l'état physiologique et physiopathologique de l'organisme. L'analyse des composés circulants dans ces matrices est un outil très efficace pour le diagnostic, le pronostic, et le suivi du traitement de différentes maladies (185). La détection et la quantification des protéines d'intérêt biologique et clinique, souvent présentes en faible concentration, représentent un défi en raison de la présence de milliers d'autres protéines à des concentrations étendues sur une très large gamme dans ces fluides biologiques. Le degré de complexité dépend du type de matrices biologiques utilisées. En effet, la concentration journalière des protéines secrétées dans l'urine est d'environ 10 à 300 mg/1,5L/jour (186), la concentration protéique dans le liquide céphalorachidien est d'environ de 0,25 mg/mL (187), tandis que la concentration protéique dans le sérum/plasma est de l'ordre de 60 – 80 mg/mL (188). Une étude réalisée avec plus de 20 000 échantillons de patients a permis d'estimer que la concentration totale de protéines sériques se situe entre 22 et 102 mg/mL (189). Le sang total, le plasma et le sérum sont considérés comme les matrices les plus utilisées dans les analyses en biologie médicale (190), car elles contiennent la plupart des protéines produites dans le corps (191) et elles fournissent les informations les plus complètes concernant les conditions physiologiques et pathologiques d'un individu. Cependant, la complexité de la composition de ces matrices présente de nombreux obstacles dans le développement de la méthode d'analyse. Selon le dernier rapport du projet sur le protéome plasmatique humain (dit The Human Plasma Proteome Project) publié en 2017 par l'organisation du protéome humain (HUPO), plus de 4 800 protéines ont été détectées dans le plasma humain ce qui représente environ 20 % de la totalité de protéines humaines (192,193). Un autre challenge pour l'étude des protéines sériques/plasmatiques est la large gamme dynamique, jusqu'à 12 ordres de grandeur, entre les protéines les plus abondantes et les moins abondantes (194,195). L'albumine est la protéine la plus abondante et représentante plus de 50 % des protéines sanguines. Les dix protéines les plus abondantes telles que l'albumine, les immunoglobulines G, A et M, la transferrine, le fibrinogène, l'α-2-macroglobuline, l'α-1-antitrypsine, le complément C3 et l'haptoglobine représentent presque 90 % de la quantité totale des protéines plasmatiques/sériques (196) (*Figure 23*). Douze autres protéines représentent 90 % des 10 % restant (196). Un nombre important de protéines présentant un intérêt clinique sont donc des protéines de faible abondance, et font partie de la fraction représentant moins de 1 % des protéines totales.

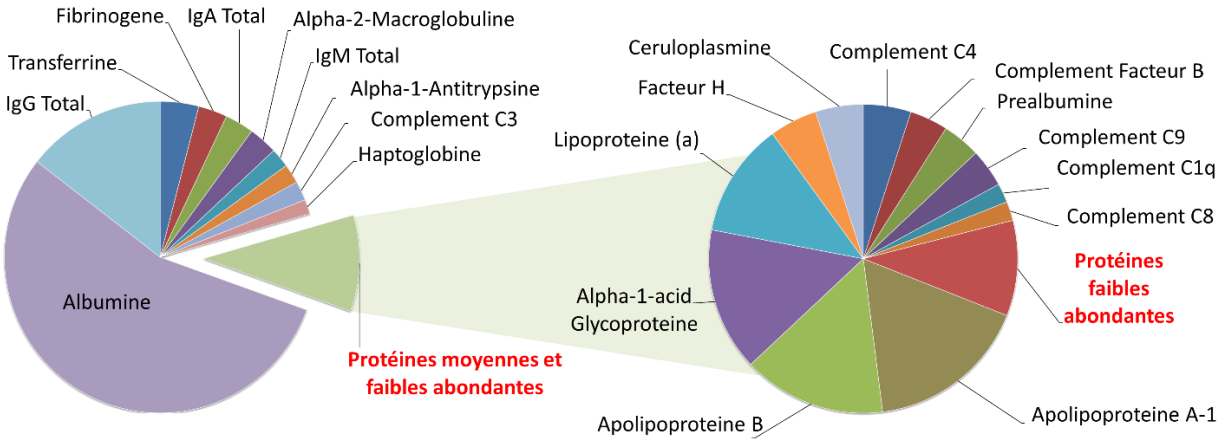
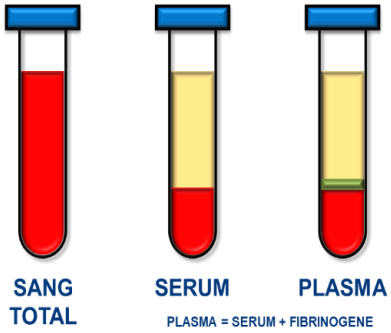


Figure 23. Distribution des protéines sériques/plasmatiques

L'albumine est la protéine la plus abondante avec plus de 50 % de la quantité totale des protéines sériques/plasmatiques. Les protéines de moyenne et faible abondance ne représentent que 10 % de la quantité totale des protéines. La plupart des biomarqueurs sont des protéines de faible abondance présentes dans la fraction représentant 1 % de la quantité totale de protéine.

Outre les protéines, les matrices sériques/plasmatiques contiennent également d'autres composés tels que les sucres (~0,8 mg/mL) et les lipides (~6 mg/mL). Ce sont des composés qui peuvent potentiellement générer des interactions indésirables lors de la préparation d'échantillon et des effets suppresseurs dans la détection en spectrométrie de masse (186).

Le choix de matrice entre sérum ou plasma est important car ces deux matrices présentent des caractéristiques différentes (*Figure 24*). Pour la préparation du sérum, le sang total est prélevé dans un tube sec, dans lequel le sang coagule rapidement pour donner un caillot contenant de la fibrine et des cellules sanguines telles que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Après une centrifugation, la structure de départ de coagulum est perdue pour créer deux phases : une phase liquide appelée sérum et phase solide appelée agrégat, qui contient de la fibrine et des cellules sanguines. Quant au plasma, il est obtenu par un prélèvement de sang total dans un tube contenant des agents anti-coagulants afin d'empêcher la coagulation. Après centrifugation, les cellules sanguines sont culottées au fond du tube, tandis que le surnageant correspond au plasma. Par conséquent, contrairement au sérum, le plasma contient des fibrinogènes et des agents anti-coagulants. Les agents anti-coagulants, les plus couramment utilisés sont l'acide éthylène tétra-acétique (EDTA), le citrate de sodium ou l'héparine de lithium. Le choix des agents anti-coagulants est important car il peut impacter le résultat d'analyse. En effet, selon une étude de Hsieh *et al.* sur les protéines plasmatiques de faibles masses moléculaires (< 24 KDa), plus de 78 % du nombre de pics observés par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF a un coefficient de variation supérieur à 20 % entre les trois types d'agents (EDTA, héparine et citrate). (197).



Sérum	Plasma
Sans anticoagulants	Anticoagulants nécessaires
Sans fibrinogène	Présence de fibrinogène
Sans cellules sanguines	Possible présence de plaquettes et de globules blancs

Figure 24. Comparaison du sérum et du plasma

Le sérum est obtenu après une centrifugation du sang total prélevé pour séparer le liquide de l'agrégat contenant de la fibrine et des cellules sanguines. Le plasma est obtenu après une centrifugation du sang total recueilli dans un tube contenant des agents anti-coagulants. Par rapport au sérum, le plasma contient en plus des protéines fibrinogènes et des facteurs de coagulation.

Dans le cas idéal, si les agents anticoagulants n'interfèrent pas dans le processus d'analyse, le plasma est considéré comme la matrice la plus représentative de l'échantillon réel (198). Le sérum est une matrice plus souvent utilisée que le plasma pour les dosages en routine dans les pays de l'Europe du Nord, selon les données de 2016 (198). Cependant, le choix entre le sérum et le plasma joue un rôle important dans les analyses en LC-MS et immunoessais (199,200). Pour un analyte donné, une différence entre les résultats peut être observée entre ces deux types de matrices. En effet, une étude réalisée sur une cohorte de 36 patients dans les services de soins intensifs a montré que parmi les 55 biomarqueurs protéiques de l'inflammation, seulement 10 biomarqueurs sont quantifiés de façon équivalente entre le sérum et le plasma (200). De plus, les auteurs ont également montré que les concentrations mesurées de 22 protéines ne sont pas bien corrélées entre ces deux types de matrices (200). Le type de matrice peut également influencer la stabilité des analytes qui est un facteur critique pour les analyses de biologie médicale. En effet, selon une étude de Zimmermann *et al.* sur la stabilité de la protéine HSP 27 (Heat Shock Protein 27), une perte allant jusqu'à 45 % de la quantité de HSP 27 initiale est observée après 6 heures de stockage à 4°C dans les échantillons plasma/EDTA, tandis que la concentration de HSP 27 est stable dans le sérum. De plus, une augmentation d'un facteur 3,1 de la concentration de HSP 27 a été rapportée dans le cas de plasma ayant subi un cycle congélation-décongélation, alors que cette concentration n'est pas impactée dans le sérum dans les mêmes conditions (201). Enfin, certaines cellules telles que les leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes, ainsi que ses débris de dégradation sont retrouvées dans le plasma après l'étape de centrifugation (202). La présence de ces cellules dans le plasma peut promouvoir le processus de métabolisme des analytes, donc induire une potentielle dégradation des analytes. Par conséquent, en fonction de la matrice utilisée, les résultats

obtenus peuvent varier et risquent d'introduire des erreurs dans la prise en charge des patients, il est donc important de déterminer le type de matrice utilisé dans la définition du mesurande (voir A.I.3.4). Au vu de ses nombreux avantages, le sérum a été sélectionné pour le travail de cette thèse. Dans une telle matrice, la quantification des protéines d'intérêt à faible concentration représente un défi important. Il est donc crucial de réduire la complexité de ces échantillons avant l'analyse pour pouvoir accéder aux informations des protéines de faible abondance. Ceci est en particulier vrai dans le cas d'une analyse par spectrométrie de masse, qui fait l'objet de cette thèse.

IV.2 Quantification par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

IV.2.1 Séparation par chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide est une technique de séparation de plusieurs analytes en mélange. Le principe de séparation des analytes est basé sur l'élution différentielle des analytes par partage et équilibre de concentration entre les deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile qui se déplace dans un sens déterminé. Cette technique est un outil incontournable pour les analyses des protéines par spectrométrie de masse grâce à sa facilité de couplage avec le spectromètre de masse. De plus, pour les colonnes en phase liquide, il existe une large gamme de phases stationnaires se basant sur l'interaction hydrophobe, l'échange d'ions ou l'exclusion stérique. Parmi ces types de séparation, la chromatographie à polarité de phase inversée est la plus couramment utilisée pour la séparation des peptides. Dans ce cas, la phase stationnaire est de nature apolaire, lipophile, et le plus souvent à base des particules de silice couplées de façon covalente à des greffons de chaines alkyles (C4, C8, C18, …). Les variétés des particules en termes de diamètre et de taille des pores permettent donc de sélectionner une phase adaptée pour obtenir la meilleure capacité de séparation des analytes. L'élution des analytes est effectuée grâce à un gradient de phase mobile d'un mélange de nature hydro-organique (eau, acétonitrile ou méthanol). La phase mobile est en général tamponnée afin d'améliorer la séparation chromatographique et l'ionisation des analytes dans la source du spectromètre de masse tout en contrôlant leur état de protonation. De plus, plusieurs classes de colonnes chromatographiques peuvent être définies en fonction de leur diamètre interne micro HPLC, capillaire HPLC et nano HPLC (*Tableau 8*).

Tableau 8. Classification de type de colonne chromatographique liquide en fonction de diamètre interne

Type de colonne LC	Diamètre interne	Débit
Nano HPLC	25-100 µm	50-800 nL/min
Capillaire HPCL	100-1000 µm	0.4-200 µL/min
Micro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 µL/min

La réduction du diamètre interne de la colonne HPLC permet une amélioration de la sensibilité d'analyse et ainsi de réduire la quantité d'échantillon nécessaire. En effet, une étude Zhu *et al*. en 2017 a rapporté un gain d'un facteur 3 en intensité de signal détecté et de plus de 32 % en nombre de peptides identifiés en passant d'un diamètre interne de 75 µm à 30 µm (203). En outre, l'étude de Dubois sur les biomarqueurs protéiques du sepsis a montré une amélioration moyenne d'un facteur 9 des signaux détectés lorsque les échantillons sont analysés par le système capillaire LC-MS/MS de 0,3 mm de diamètre interne en comparaison avec le système conventionnel (2,1 mm) (184). L'utilisation de colonnes de faible diamètre a permis d'améliorer 10 fois la limite de quantification (2 ng/mL versus 20 ng/mL) selon une étude de Wilffert *et al.* (204,205). De plus, la réduction du diamètre interne de la colonne HPLC peut améliorer grandement la limite de quantification en combinant le mode d'enrichissement par immunoaffinité au niveau des protéines ou au niveau des peptides. En effet, une limite de quantification de 7 pg/mL a été rapportée par Neubert *et al.* pour la quantification de la protéine Hβ-NGF en combinant l'immunoaffinité au niveau peptidique et le mode nano-LC (206).

IV.2.2 Détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée en protéomique pour la quantification des biomarqueurs en raison de ses nombreux avantages, en particulier la spécificité par rapport aux techniques d'immunoessais. Cette technique permet de déterminer le rapport masse sur charge (m/z) d'un analyte chargé à l'état gazeux. Le principe de la spectrométrie de masse est illustré dans la *Figure 25*.Le spectromètre de masse peut être décomposé en 3 parties : une source, un analyseur et un détecteur.

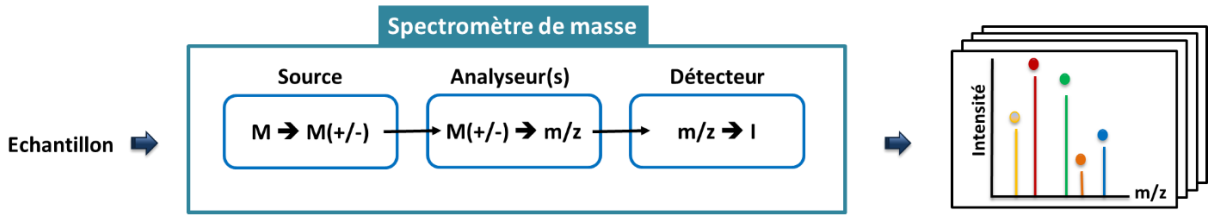


Figure 25. Principe de la détection en spectrométrie de masse

L'échantillon est introduit dans la source du spectromètre de masse, et les molécules sont ionisées et volatilisées. Un ou plusieurs analyseurs séparent ensuite ces différents ions produits selon leur rapport masse sur charge m/z. Le détecteur convertit finalement les signaux générés par les ions en signaux électriques, et enfin un système de traitement des données produit les spectres de masse correspondants

En spectrométrie de masse, il existe différents types de source et d'analyseur, seuls ceux utilisés dans les travaux de cette thèse sur un instrument de type Orbitrap seront décrits ci-dessous.

La source d'ionisation par électro-nébulisation (ESI pour *electrospray ionisation*) est une technique d'ionisation à pression atmosphérique (*Figure 26*). Cette technique d'ionisation

douce permet d'analyser les analytes intacts tout en évitant leur fragmentation. Les ions sont produits en phase gazeuse en faisant passer le liquide à travers un capillaire métallique porté à une tension continue de plusieurs kilovolts. Les gouttelettes chargées sont formées sous l'action d'un champ électrique (positif ou négatif). La taille des gouttelettes chargées diminue ensuite jusqu'à la formation des ions en phase gazeuse par évaporation du solvant et explosions coulombiennes successives. Le processus de désolvatation est assisté par chauffage et par un flux d'azote qui permet d'éliminer les solvants résiduels pour que seuls les ions désolvatés en phase gazeuse soient transmis dans l'analyseur via le capillaire de transfert dans la source utilisée dans notre étude.

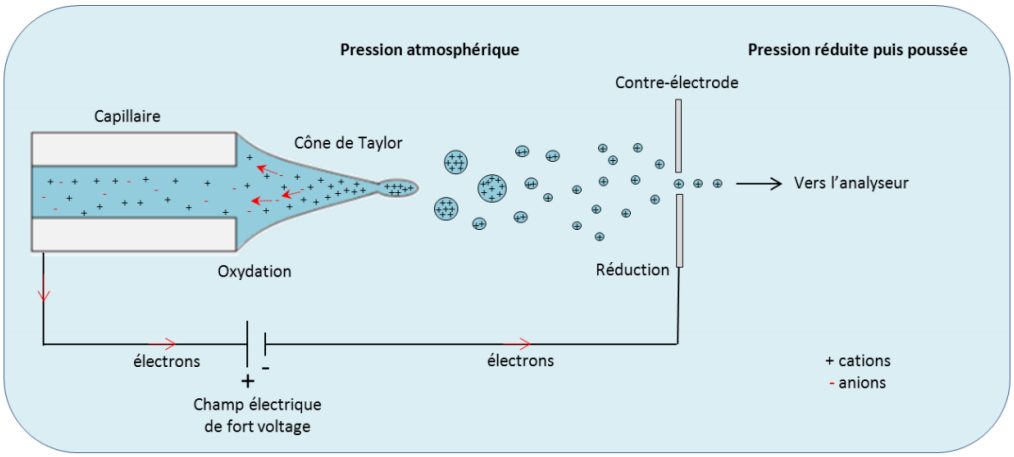


Figure 26. Mécanisme de formation des ions en phase gazeuse par l'électronébulisation (ESI) (207)

Les gouttelettes sont formées par le liquide arrivant sous l'effet de la haute tension. Ces gouttelettes subissent une désolvatation progressive par un flux d'azote chauffé pour former des ions en phase gazeuse.

De plus, il est possible de miniaturiser ce dispositif. La source nano-électrospray (nanoESI) permet d'analyser de faibles volumes d'échantillon en raison de faible diamètre (inférieur à 100 µm) et de travailler avec de faibles débits (inférieurs à 800 nL/min. Le rendement d'ionisation est amélioré car de plus petites gouttelettes sont formées. Cela permet enfin d'augmenter la sensibilité. Après avoir été produits en source, les ions sont transférés vers l'analyseur de masse. Il existe plusieurs types d'analyseurs tels que le quadripôle, l'orbitrap, l'analyseur à temps de vol, le piège linéaire. Les deux analyseurs utilisés pour ces travaux sont décrits ci-dessous :

L'analyseur quadripôle sépare les ions en fonction de leur m/z par la stabilité des trajectoires dans un champ électrique (*Figure 27*). Ce principe a été introduit par Paul et Steinwedel en 1953. Le quadripôle est composé de quatre barreaux métalliques parallèles dont les potentiels électriques appliqués sont égaux deux à deux sur les deux barreaux disposés en vis-à-vis, symétriquement opposés selon l'axe de déplacement des ions. Les ions oscillent entre les barreaux grâce à la composante alternative de la tension électrique

appliquée. A un instant donné, les deux barreaux situés dans le plan xOz sont portés au potentiel positif alors que les autres barreaux sont au potentiel négatif. Pour un champ quadripolaire constant, une composante variable provoque une variation du champ selon un axe perpendiculaire à l'axe de déplacement. Il y a donc deux types de trajectoire possibles au sein du quadripôle : une trajectoire stable et une instable. La trajectoire stable guide les ions vers le détecteur, tandis que les ions qui parcourent les trajectoires instables sont écartés de l'axe de déplacement et n'atteignent pas le détecteur. En appliquant des tensions prédéfinies, le quadripôle joue un rôle de filtre des ions d'intérêt m/z. Inversement, si la composante de tension continue appliquée est nulle, le quadripôle agit comme un guide d'ions avec un guide de type radiofréquence (mode *RF-only*). Dans le cas d'un balayage de différentes tensions, une large gamme de m/z sera transmise séquentiellement pour établir un balayage de masse complet (mode *fullscan*).

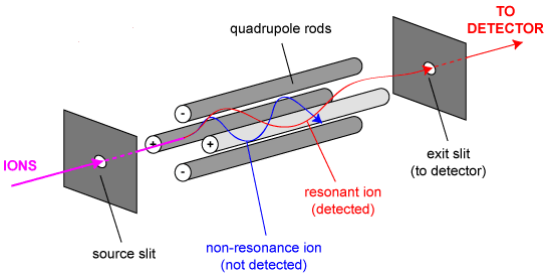


Figure 27. Analyseur quadripôle (208)

Les ions entrant dans le quadripôle avec une faible énergie cinétique suivent une trajectoire pseudo-sinusoïdale sous l'influence d'un champ quadripolaire entre les quatre barreaux métalliques parallèles. Seuls les ions de m/z parcourant la trajectoire stable dans un champ donné arrivent au détecteur, alors que les autres ions de trajectoire instable sont éjectés du quadripôle.

L'analyseur Orbitrap a été développé par Makarov dans les années 90. L'analyseur Orbitrap est composé d'une électrode interne en forme de fuseau placée à l'intérieur de deux électrodes externes creuses symétriques (*Figure 28*).

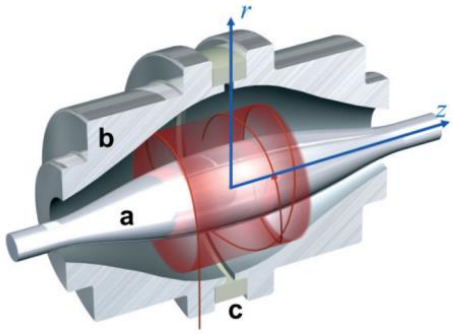


Figure 28. Analyseur Orbitrap *(209)*

Les ions sont injectés et piégés autour de l'électrode interne en forme de fuseau (a) situant à l'intérieur de deux électrodes externes creuses (b). Les ions poursuivent un mouvement composé de trois modes de trajectoires (1 circulaire et 2 oscillatoires). Z et r sont des coordonnées cylindriques.

Les ions sont injectés tangentiellement dans l'espace séparant les deux parties de l'électrode externe dans un champ électrostatique quadripolaire selon l'axe z des électrodes. Les ions sont donc piégés autour de l'électrode interne par la force électrostatique et contrebalancés par la force centrifuge. Le mouvement des ions suit trois trajectoires : une trajectoire circulaire autour de l'électrode interne dans le plan xy, une trajectoire oscillatoire suivant l'axe z et une troisième composante d'oscillation selon le rayon de giration. La fréquence des oscillations axiales est inversement proportionnelle à la racine carrée du rapport m/z des ions. La valeur m/z des ions est obtenue par la mesure du courant induit par leur déplacement oscillatoire en appliquant une transformée de Fourier du signal pour déterminer les fréquences le composant. L'analyseur orbitrap permet d'avoir une meilleure spécificité dans l'identification et la quantification grâce à la haute résolution et son excellente justesse de mesure.

IV.2.2.1 Modes de fragmentation

La fragmentation en spectrométrie de masse tandem (mode MS/MS) consiste à fragmenter un analyte d'intérêt à l'intérieur du spectromètre de masse dans le but de déterminer ses caractéristiques structurales. Dans le cas des protéines et des peptides, la fragmentation permet principalement d'identifier la séquence en acides aminés des protéines/peptides (*Figure 29*). Il y a plusieurs modes de fragmentation disponibles dans les spectromètres de masse utilisés au cours de cette étude, tels que la dissociation induite par collision à haute énergie (HCD pour *Higher energy Collisional Dissociation*), la dissociation induite par collision (CID pour *Collision Induced Dissociation*), la dissociation par transfert d'électron (ETD pour *Electron Transfer Dissociation*) et la photodissociation par ultraviolet (UVPD pour *UltraViolet PhotoDissociation*).

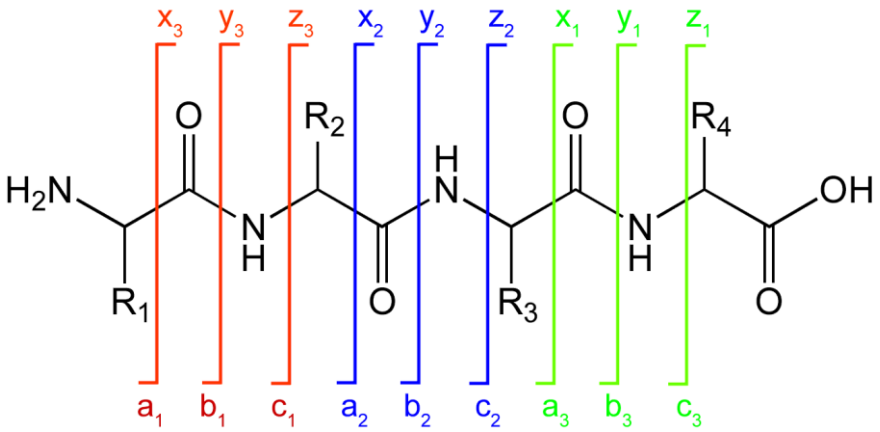


Figure 29. Les différents fragments générés lors de la fragmentation des protéines/peptides

En fonction du mode de fragmentation, différents types de fragments peuvent être obtenus. Les fragments b et y sont souvent observés en modes CID et HCD par rupture de la liaison peptidique.

Le mode CID consiste à fragmenter les ions dans un vide modéré par augmentation de l'énergie interne et collision entre ces ions et des molécules d'un gaz neutre tel que l'hélium ou le diazote. La fragmentation a lieu au niveau des liaisons peptidiques pour former des fragments de type b et y majoritaires, ainsi que des pertes de neutres (H_20, NH_3). Quant au mode HCD, c'est une méthode très utilisée en protéomique. Elle est proche de la fragmentation CID mais l'augmentation de l'énergie interne est plus importante. La fragmentation a lieu dans une cellule multipolaire. L'énergie HCD optimale varie en fonction de la structure et de la masse moléculaire des analytes d'intérêt. Le mode ETD est une technique de fragmentation impliquant des collisions avec des réactifs activés par des électrons et permettant notamment de caractériser des motifs de modifications post traductionnelles. Les principaux fragments sont de type c et z. Le mode UVPD est une technique de fragmentation par collision avec des photons. Obtenue avec un laser UV à 213 nm dans le spectromètre de masse utilisé lors de cette thèse, l'UVPD a lieu généralement sur une échelle de temps plus court que le mode ETD. L'UVPD permet de produire les mêmes fragments qu'en modes HCD, CID et ETD (b, c, y et z), mais également des fragments de type a et x et des fragments des chaines latérales permettant d'améliorer la couverture de la séquence des protéines/peptides, en particulier en présence de modifications post traductionnelles. Pour avoir une meilleure fragmentation en UVPD, les ions précurseurs doivent contenir un chromophore tel que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine. Chaque mode de fragmentation apporte différentes informations sur la composition et la structure des protéines/peptides d'intérêt. Ainsi, la combinaison des différents modes de fragmentation permet d'avoir une connaissance plus complète sur l'identification des molécules étudiées.

La caractérisation des peptides et surtout des protéines complexes par spectrométrie de masse a fait l'objet de progrès importants grâce aux nouvelles avancées technologiques. Il existe une large gamme de spectromètres de masse. Dans le cadre de ce travail, deux instruments de type hydride orbitrap ont été utilisés : le Q Exactive Focus et l'Orbitrap Eclipse Tribrid. L'instrument Q Exactive Focus est dédié à l'étude de caractérisation des étalons primaires peptidiques ainsi que la quantification de la PCT dans le sérum par l'approche bottom-up grâce à la haute résolution pour augmenter la spécificité des méthodes développées. Quant à l'Orbitrap Eclipse Tribrid, il est dédié principalement à l'étude de caractérisation de l'étalon primaire protéique grâce à sa plus grande résolution jusqu'à 1 million de résolution et des nombreux modes de fragmentation disponibles.

IV.2.2.2 Mode d'acquisition

IV.2.2.2.1 Analyse en masse intacte

L'acquisition en mode masse intacte sans fragmentation permet de déterminer les rapports masse sur charge m/z des ions à différents états de charge du peptide ou de la

protéine d'intérêt. En appliquant un balayage au niveau de l'analyseur quadripôlaire, une large gamme de m/z couvrant tous les ions peut être établie. La capacité de discriminer les différents pics de la distribution isotopique de l'analyseur joue un rôle important. Une analyse à haute résolution est donc nécessaire pour une analyse en masse intacte de protéines de poids moléculaire élevé.

IV.2.2.2.2 Acquisition en mode dépendant des données

L'acquisition en mode dépendant des données, ou *Data Dependant Analysis* (DDA), s'est généralisée pour les analyses en protéomique bottom-up exploratoires. Le mode DDA se décompose en deux séquences répétées sur toute la durée de l'analyse. Une première acquisition permet de réaliser un balayage en mode Fullscan MS sur une gamme de masse étendue (typiquement 350-1800 Da) pour mesurer les rapports m /z des ions en présence à un instant donné. Elle est immédiatement suivie par une seconde acquisition qui réalise alors une série d'enregistrements des spectres de fragmentation en mode MS/MS des N ions les plus abondants dans le spectre MS de la première acquisition. En fonction des performances de l'instrument, et notamment sa fréquence d'acquisition optimale, la valeur N peut être ajustée. Le cycle est répété tout au long de l'analyse. Cependant, il faut noter que ce mode est peu adapté pour les protéines de faible abondance, en particulier dans des matrices complexes, dont les peptides protéotypiques ne seront que très rarement détectés parmi les N espèces les plus intenses. Afin de limiter cet effet, une exclusion dynamique a été développée afin d'accéder aux protéines les moins abondantes, en éliminant de la liste des N espèces les plus intenses les espèces qui ont déjà été sélectionnées précédemment pendant une fenêtre de temps déterminée en fonction du mode d'injection. Ainsi ce temps d'exclusion est ajusté sur la largeur des pics chromatographiques dans le cas d'un couplage LC-MS. Ce mode permet de ne pas sélectionner plusieurs fois le même rapport m/z pendant un temps d'analyse donné pour d'autres ions moins intenses puissent être analysés.

IV.2.2.2.3 Parallel reaction monitoring

L'analyse en mode PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) est réalisée sur des instruments hybrides à haute résolution de type Q-Orbitrap ou de façon analogue sur un instrument de type Q-Tof (210). Contrairement au mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring)* utilisant un double filtrage de rapports m/z, le mode PRM applique seulement un filtrage au niveau de l'ion précurseur dans le quadripôle (*Figure 30*). Dans un appareil de type Q Orbitrap, l'ion précurseur est ensuite accumulé dans une trappe ionique intermédiaire, la *C-trap*, puis fragmenté dans la cellule de collision multipolaire en mode HCD, et finalement la quasi-totalité des ions fragments sont transmis et analysés dans l'analyseur orbitrap.

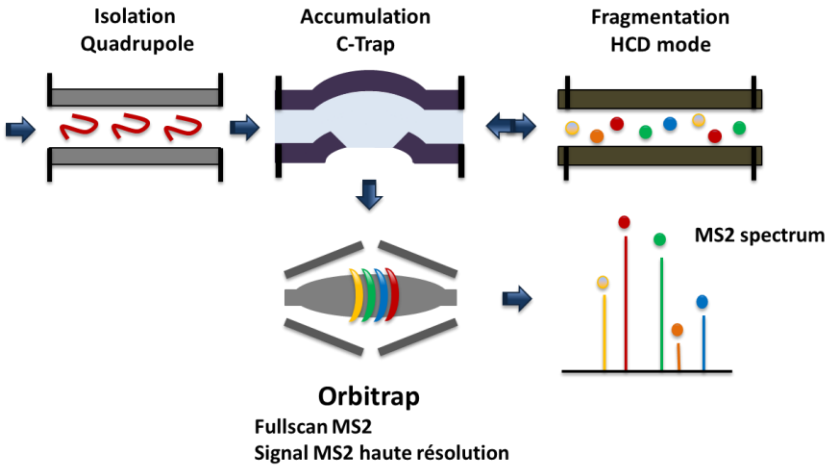


***Figure* 30.Principe d'une analyse en mode PRM Parallel Reaction Monitoring**
L'ion précurseur est sélectionné au niveau du quadripôle, il est ensuite transféré vers la C-trap pour accumulation sur une durée optimisée pour augmenter la sensibilité de la méthode. Les ions fragments sont produits dans la cellule de collision HCD, et puis analysés dans l'analyseur à haute résolution Orbitrap. La Quasi-totalité des ions fragments sont détectés ce qui augmente la spécificité de l'analyse.

La détection des fragments à haute résolution permet d'augmenter la sélectivité en diminuant les interférences (211,212). De plus, la *C-trap* permet d'accumuler les ions précurseurs dans une durée prédéfinie selon leur intensité, permettant ainsi d'augmenter le rapport signal sur bruit (210). Enfin, l'enregistrement de toutes les transitions pour chaque précurseur (une transition correspond à la donnée d'un couple précurseur-fragment, il y en a donc une par fragment suivi) permet d'optimiser la spécificité de l'analyse. L'alternance des modes MS et MS/MS à haute fréquence est indispensable pour conserver une bonne sensibilité et ceci est possible tout en conservant une haute résolution grâce à la très haute fréquence d'acquisition des dernières générations d'orbitrap. Dans le cas de l'analyse d'échantillon en matrice complexe, le mode PRM permet d'augmenter la sélectivité de la méthode grâce à sa haute résolution dans la sélection des ions fragments par rapport au mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*)/MRM. La *Figure 31* compare les signaux détectés du peptide endogène NLLSVAYK et de son étalon interne marqué dans le plasma selon les deux modes d'acquisition SRM et PRM. Les signaux de l'étalon interne marqué n'ont pas d'interférences pour les deux modes d'acquisition, en revanche le mode SRM ne permet pas de distinguer entre les signaux du peptide endogène et ceux dus aux interférences, alors que le mode PRM travaillant avec 10ppm d'erreur de masse permet de résoudre les signaux du peptide endogène (213).

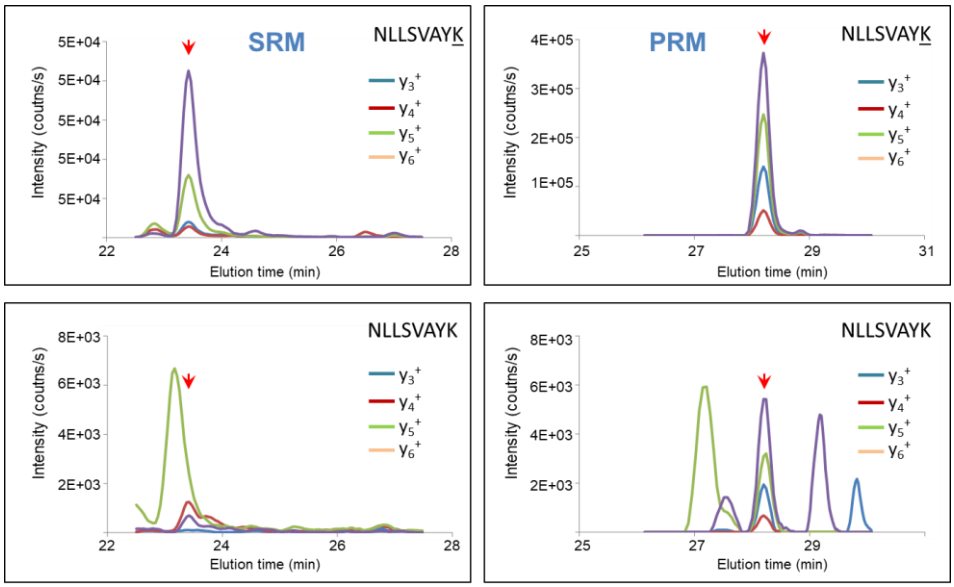


Figure 31. Comparaison des signaux obtenus en fonction des modes d'acquisition SRM ou PRM *(213)*.

Pour le peptide marqué analysé avec les deux modes d'acquisition SRM et PRM, il n'y a pas d'interférences observées (panels en haut). Cependant, lors de l'analyse du peptide naturel non marqué (panels en bas), des interférences sont observées au niveau du temps de rétention du peptide, et le mode SRM ne permet pas de discriminer les signaux du peptide et ceux des interférents, tandis que le mode PRM permet de résoudre les signaux du peptide endogène. L'expérience a été réalisé sur deux différents instruments Q-Exactive et TSQ Vantage. La différence de temps de rétention entre deux modes d'acquisition peut être due à l'utilisation de deux différentes colonnes chromatographiques ou à la différence de configuration de les instruments.

Pour la quantification de protéines en LC-MS, les deux approches « *top-down* » et « *bottom-up* » peuvent être envisagées. La stratégie d'étalonnage et la stratégie de dilution isotopique seront déterminées en fonction de l'approche choisie.

IV.3 Quantification de protéines par ID LC-MS

IV.3.1 Approches protéomiques

On distingue deux principales approches pour l'analyse des biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse : approche « top-down » et « bottom-up » (*Figure 32*).

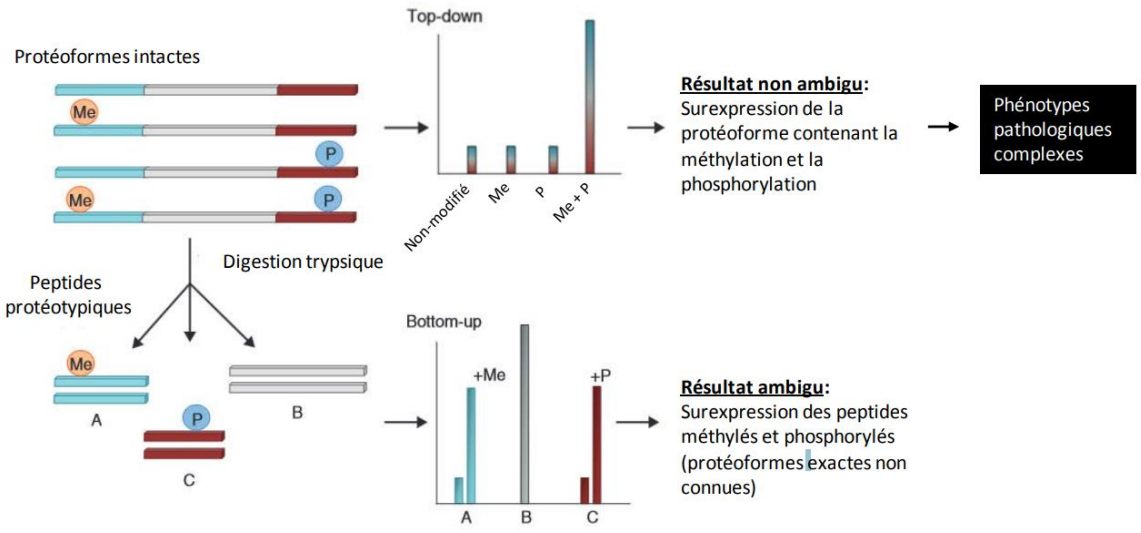


Figure 32. Illustration des deux approches top-down et bottom-up *(214)*

Une protéine peut exister sous plusieurs protéoformes avec plusieurs modifications telles que la méthylation, la phosphorylation. L'approche bottom-up permet d'identifier les peptides méthylés et phosphorylés sans pouvoir identifier la forme de la protéine en jeu. L'approche top-down permet d'affirmer l'isoforme méthylée et phosphorylée.

La stratégie « top-down » consiste à identifier les protéines entières par mesure de masse et séquençage. Les protéines sont ionisées intactes dans la source et transférées dans l'analyseur du spectromètre de masse. Par la suite, la fragmentation MS/MS permet de séquencer les protéines. L'identification de la protéine repose sur la mesure des rapports masse sur charge (m/z) de la protéine et de ses ions fragments. Le source d'ionisation le plus courant est l'électrospray comme introduit par Fenn *et al.* avec la possibilité d'ioniser les protéines de large taille (215). Un gène peut être traduit pour donner plusieurs protéoformes issues de la même séquence primaire mais ayant des fonctions fortement modifiées suite à des mutations, polymorphismes, des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, méthylation, glycosylation, etc.) (216). La stratégie « top-down » permet d'obtenir une vision plus globale des différentes protéoformes co-existant dans un échantillon. Cela permet par exemple d'améliorer la connaissance des processus physiopathologiques (217). De plus, cette approche permet d'éviter la formation d'un mélange complexe de peptides ayant des propriétés et des structures similaires. En effet, Bronsema *et al.* a montré une amélioration de la limite de quantification d'un facteur 5 en passant d'une approche « bottom-up » à l'approche « top-down » pour la quantification de la calcitonine (218). Ce résultat s'explique par le fait que plusieurs protéoformes sont quantifiées simultanément par approche « bottom-up » alors que l'approche « top-down » ne cible que la calcitonine intacte. Cependant, cette observation n'est pas un toujours applicable à toutes les protéines. Généralement, ces approches sont implémentées pour des protéines de faible poids moléculaire dont l'efficacité de fragmentation est plus élevée (219). En revanche, des difficultés techniques concernant la séparation chromatographique,

l'ionisation et la fragmentation des protéines entières freinent le développement des application 'top-down ». En effet, la protéine est ionisée selon une distribution de plusieurs espèces ioniques multichargées, ce qui entraine une diminution de la sensibilité par dilution du signal. Les hauts états de charge z obtenus pour les protéines diminuent l'écart de m/z entre deux isotopes successifs (220). Cela nécessite donc d'optimiser la fenêtre de sélection des différents états de charges de la protéine tout en assurant la sélectivité de la méthode. De plus, l'interprétation des données collectées représente une difficulté supplémentaire pour l'identification d'une protéine du fait de la complexité des profils de fragmentation multichargés générés et des différents mécanismes de fragmentation. Peu de solutions logicielles ont été développées pour permettre une analyse bioinformatique automatisée et l'analyse des données est souvent longue et complexe. Enfin, il est difficile et souvent coûteux de produire des protéines recombinantes, en particulier avec des formes modifiées de haute pureté, ainsi que les étalons internes marqués dont le comportement est identique à celui de la protéine endogène. Ces éléments constituent pourtant un prérequis important à la mise en place de stratégies de quantification absolue par dilution isotopique (voir section A.IV.3.2.2).

La stratégie « *bottom-up* » est l'approche la plus couramment utilisée pour l'identification et la quantification des protéines, notamment en mélange complexe. Elle consiste à digérer les protéines en peptides par une endoprotéase. Avant la digestion, les protéines sont souvent soumises à une étape de réduction des ponts disulfures suivie par une réaction d'alkylation des résidus Cys afin de faciliter la dénaturation et la protéolyse enzymatique. Le choix de l'enzyme est donc important pour sélectionner les peptides protéotypiques à la protéine d'intérêt. Il existe une large gamme d'enzymes disponibles telles que la trypsine, la chymotrypsine, les endoprotéases AspN, LysC, GluC ou GluN. Parmi elles, la trypsine est la plus utilisée grâce à sa haute spécificité en clivant exclusivement la liaison peptidique du côté C-terminal des résidus lysine et arginine, sauf dans le cas d'une liaison lysine-proline et arginine-proline. Les peptides générés sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide haute performance avant d'être détectés par spectrométrie de masse. A partir du séquençage des peptides protéolytiques, il est alors possible d'identifier puis de quantifier les protéines d'intérêt. Dans une optique de quantification, il est primordial de quantifier les peptides détectés de façon robuste et spécifiques à la protéine d'intérêt, appelés peptides protéotypiques. En effet, différentes protéines peuvent contenir des séquences communes, et l'information obtenue par les peptides de séquences communes ne reflète donc pas la présence de chacune des différentes protéines mais une information combinée et donc peu spécifique. Seuls les peptides identifiés contenant des motifs spécifiques à une protéine peuvent fournir des informations sur la présence de cette espèce (221). Cependant, dans certaines situations, quand la protéine d'intérêt existe sous plusieurs isoformes, la sélection des peptides de séquences communes à plusieurs isoformes permet une quantification totale de la protéine

d'intérêt toutes isoformes confondues. L'approche « *bottom-up* » permet de contourner certaines des difficultés rencontrées dans une analyse « *top-down* » (le manque de sensibilité notamment), mais elle présente également des inconvénients. En effet, la digestion enzymatique augmente la complexité des échantillons en produisant un nombre important de peptides. De plus, la digestion des protéines de faible abondance risque d'être incomplète car leur digestion peut être plus lente par rapport aux protéines de concentration plus élevée en raison de la réaction du premier ordre (222).

En tenant compte de la complexité de la matrice et de la faible abondance de la protéine PCT dans le sérum, l'approche bottom-up a été retenue pour ce projet de thèse. Le détail de la stratégie pour la quantification de la PCT et les différentes possibilités de la préparation d'échantillons selon la littérature pour une quantification de protéines de faible abondance sont présentés dans la suite.

IV.3.2 Stratégie de quantification de la PCT

IV.3.2.1 Principe général

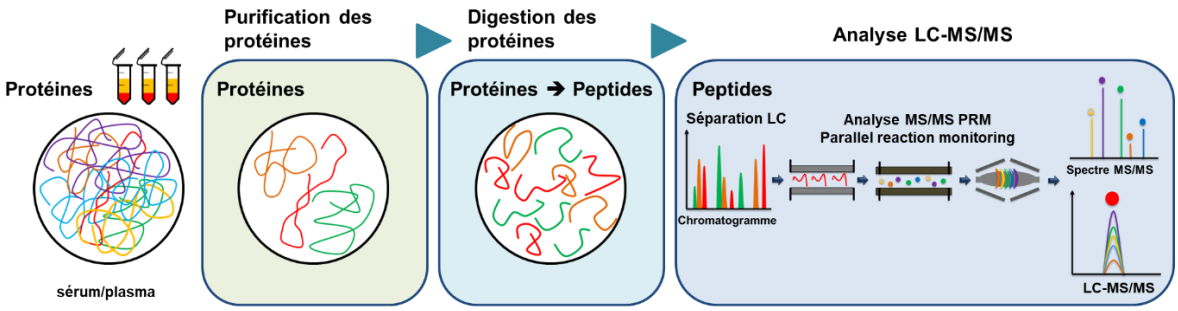


Figure 33. Stratégie de quantification LC-MS des biomarqueurs protéiques par l'approche « bottom-up »

L'approche « bottom-up » consiste à digérer les protéines en peptides par une endoprotéase. Les peptides générés sont ensuite séparés par chromatographie liquide haute performance avant d'être analysés par spectrométrie de masse. Avant l'étape de digestion, les protéines de la matrice sont souvent purifiées afin de réduire la complexité de la matrice

Comme décrit dans la *Figure 33*, le sérum est une matrice très complexe, la quantification des biomarqueurs protéiques de faible abondance est un enjeu important. En raison de phénomènes de compétition d'ionisation conduisant à une réduction du signal des entités minoritaires pour lesquelles l'ionisation n'est pas optimale, les étapes de pré-traitement des échantillons sont donc cruciales, particulièrement pour la quantification de protéines de faible abondance. Les différentes stratégies de pré-traitement des échantillons seront décrites dans la section A.IV.4. Les peptides produits en mélange sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide et enfin détectés par spectrométrie de masse.

IV.3.2.2 Quantification par dilution isotopique

Afin de minimiser la variabilité des différentes étapes du protocole de quantification par LC-MS, la dilution isotopique est mise en œuvre. Cela consiste à ajouter à l'échantillon l'analogue marqué de la molécule recherchée, appelée étalon interne. Un étalon interne idéal présente un comportement analytique identique à l'analyte d'intérêt. Dans l'idéal, l'étalon interne a la même séquence que le composé d'intérêt dans laquelle certains atomes sont substitués par leur isotope stable (^{13}C, ^{15}N). Ces modifications engendrent un incrément de masse connu tout en gardant un comportement analytique proche de l'analyte d'intérêt, en particulier lors des étapes de préparation de l'échantillon.

Dans le cadre d'une quantification par approche « bottom-up », l'étalon interne doit être introduit le plutôt possible pour compenser toutes les variations produites durant le protocole d'analyse (les pertes de protéines lors de la préparation d'échantillon, la digestion incomplète, la variation expérimentale du volume d'injection et l'effet matrice sur l'ionisation). Les différentes stratégies d'utilisation des étalons internes sont illustrées dans la *Figure 34*.

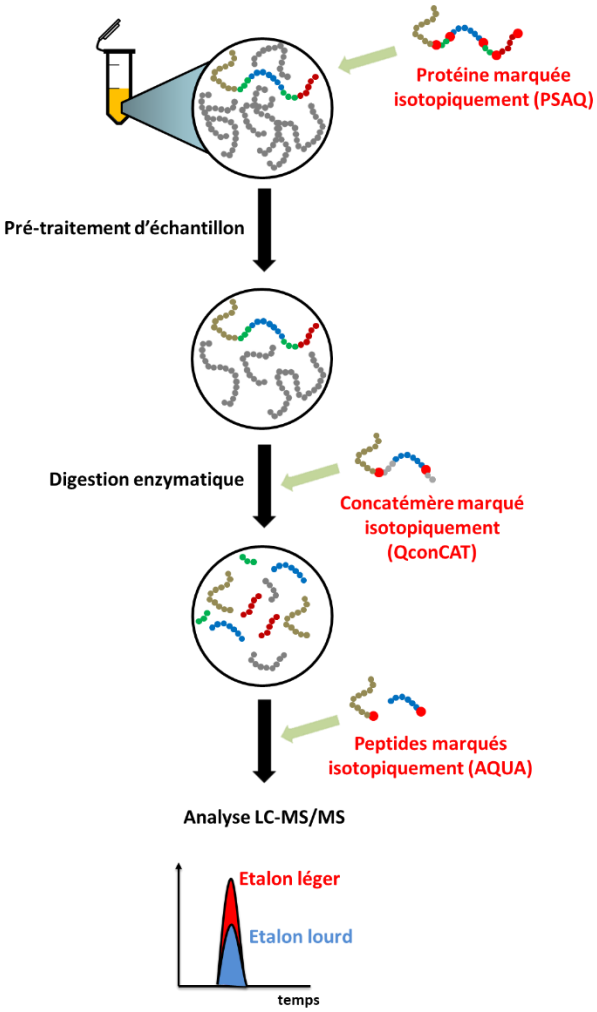


Figure 34. Trois stratégies d'utilisation des étalons internes marqués dans la quantification des biomarqueurs protéiques.

L'approche protéine marquée isotopiquement (PSAQ) consiste à ajouter un étalon interne (protéine) au tout début du processus de préparation d'échantillon afin de corriger les biais de quantification liés non seulement à la purification de la protéine d'intérêt PCT mais aussi à la digestion enzymatique, la purification peptidique et à l'analyse LC-MS/MS. L'approche peptide marqué isotopiquement consiste à ajouter un étalon interne (peptide) après l'étape de digestion enzymatique, et permet de corriger les biais au niveau peptidique (purification et analyse LC-MS/MS). L'approche alternative 'QconCAT' consiste à utiliser une protéine chimérique contenant plusieurs peptides marqués issus d'une ou plusieurs protéines d'intérêt, la protéine chimérique QconCAT est ajoutée avant l'étape de digestion pour corriger le biais au niveau de digestion enzymatique, de la purification peptidique et de l'analyse LC-MS.

La stratégie PSAQ (*Protein Standard Absolution Quantification*) utilise une protéine marquée avec des isotopes stables, et de même séquence que la protéine d'intérêt. Elle est considérée comme une stratégie idéale permettant d'obtenir une meilleure justesse et fidélité des mesures, car la protéine marquée subit exactement le même protocole que l'analyte d'intérêt (223). En effet, Kuhn *et al.* ont montré une amélioration importante de la justesse de l'analyse en utilisant les protéines marquées (95-101 %) par rapport aux peptides marqués (44-54 %), ainsi qu'une meilleure fidélité des résultats (89 % versus 83 %) (224).

Cependant, cette approche ne peut pas toujours être être mise en pratique. Tout d'abord, il s'agit d'une stratégie coûteuse et l'incorporation des marquages n'est pas envisageable pour toutes les protéines. Par exemple, il est parfois difficile de produire des protéines marquées dans certaines situations où la protéine endogène présente des modifications post traductionnelles (225). De plus, la protéine marquée ne peut pas corriger les variabilités s'il y a une différence importante du degré d'oxydation ou de la conformation entrainant une différence du comportement analytique entre la protéine marquée et la protéine endogène.

La stratégie AQUA (*Absolute QUAntification*) est la plus couramment utilisée. Les peptides marqués avec des isotopes stables ont la même séquence que celle des peptides issus de la digestion de la protéine endogène. En revanche, l'utilisation de peptides marqués ne permet pas de rendre compte du comportement de la protéine endogène car ils ont une structure et un comportement très différent de la protéine endogène. Ils ne peuvent pas corriger les pertes de protéine éventuelles durant les étapes de préparation d'échantillon avant la formation des peptides, telles que le pré-traitement des échantillons et la digestion enzymatique. En effet, de nombreuses études ont montré que les étapes d'extraction et de digestion n'ont pas un rendement 100 %. Kuhn *et al.* ont rapporté un rendement de quantification de la CRP dans le sérum de 0,2 à 66 % en fonction des peptides utilisés et causé par une digestion non homogène entre peptides.(226). Keshishian *et al.* ont rapporté que l'étape de déplétion des protéines et l'extraction par échange de cations forts a causé une perte importante allant jusqu'à 70 % des protéines d'intérêt (227). En outre, l'étude de Adrait *et al.* en 2012 a rapporté un rendement de seulement 7,8 % lors de l'étape de préparation d'échantillon par immunoaffinité pour la quantification de l'entérotoxine A dans le sérum (228). De plus, bien qu'une étude plus récente de Fu *et al.* en 2018 ait rapporté un rendement d'extraction plus important de 77,6 % par immunoaffinité, l'efficacité d'extraction de 100 % n'est pas atteinte (229). Quant à l'étape de digestion enzymatique, l'étude de Domanski *et al.* a montré une variation de la quantité mesurée jusqu'à un facteur 100 en fonction des différentes peptides rapporteurs retenus et les auteurs suggèrent que cette observation peut être expliquée par une digestion incomplète de la protéine d'intérêt (230). Cependant, malgré toutes ces limitations, il est possible d'appliquer la stratégie AQUA si le protocole de préparation des échantillons implique moins d'étapes de préparation d'échantillon, surtout dans le cas d'une analyse directe sans étape de pré-traitement. La justesse et la fidélité seront donc moins impactées, ainsi l'étude de Biarc *et al.* en 2015 propose une méthode de quantification directe avec l'approche d'étalonnage peptidique en utilisant des peptides marqués de podocalyxine, avec des erreurs liées à la justesse et la fidélité rapportées inférieures à ± 9,5 % et 8,7 %, respectivement (231).

La stratégie QconCAT (*Quantification conCATamer*) est une approche intermédiaire entre deux approches décrites ci-dessus, qui utilise des protéines chimériques contenant plusieurs peptides concaténés marqués avec des isotopes stables dont la séquence correspond aux peptides protéotypiques ciblés issu de la protéine d'intérêt plus un ou plusieurs autres peptides. Ces peptides sont libérés par l'action des protéases lors de la

digestion. Les protéines chimériques sont donc ajoutées avant l'étape de digestion pour mieux mimer l'étape de digestion par rapport à l'utilisation des peptides marqués. Cependant, cette stratégie ne permet pas de couvrir les variabilités durant les étapes de pré-traitement (223). De plus, la correction des variabilités peut ne pas être correcte si la digestion enzymatique est incomplète car la digestion de l'étalon interne concatamère n'est pas représentative de la digestion des protéines endogènes d'intérêt (232).

La stratégie d'étalonnage interne la plus adaptée est déterminée en fonction des performances analytiques des différentes étapes de préparation d'échantillon et de la méthode de quantification. Les différents avantages et inconvénients des stratégies d'étalonnage interne sont résumés dans le *Tableau 9*. Cependant, quelle que soit la stratégie sélectionnée, un faible rendement lors des étapes de prétraitement des échantillons ou de la digestion est préjudiciable à la sensibilité et potentiellement à la fidélité intermédiaire de la méthode de quantification.

Tableau 9. Avantages et inconvénients des différentes approches d'étalonnage interne pour la quantification d'un biomarqueur protéique en LC-MS/MS (adapté de Brun et al. 2009)

	Stratégie AQUA	Stratégie QconCAT	Stratégie PSAQ
Justesse du résultat*	- à +++	- à +++	+++
Fidélité du résultat	+	++	+++
Correction de l'étape pré-traitement des échantillons au niveau protéique	-	-	+++
Correction de l'étape digestion enzymatique	-	- à ++	+++
Correction de l'étape pré-traitement des échantillons au niveau peptidique	+++	+++	+++
Etude des protéines complexes	- à +	+++	++

- : mauvais ; + : bon ; ++ : très bon ; +++ : excellent
(*) autre prérequis pour assurer la justesse de mesure : étalon bien caractérisé

IV.3.2.3 Etalonnage

L'étalonnage en ID-LC-MS consiste à préparer des solutions étalons de fractions molaires connues à partir de l'étalon synthétique (peptide) ou recombinant (protéine), l'étalon non marqué, aussi appelé « étalon léger » et l'étalon interne marqué, aussi appelé « étalon lourd ». Les étalons contiennent généralement une quantité fixe d'étalon lourd et une quantité variable d'étalon léger. Après analyse en MS, une fonction d'étalonnage est établie entre les rapports de quantité de matière étalon léger sur étalon lourd et les rapports des aires de pics étalon léger sur étalon lourd. A partir de cette fonction, il est possible de déterminer la quantité de matière du peptide endogène dans l'échantillon dans lequel l'étalon lourd a été dopé. La concentration du peptide endogène sera ensuite utilisée pour déduire la concentration de la protéine d'intérêt. En protéomique *bottom-up*, il y a deux stratégies d'étalonnage : l'étalonnage peptidique où les étalons sont préparés à partir de peptides synthétiques ou l'étalonnage protéique où les étalons sont préparés à partir de la

protéine recombinante. Quelle que soit la stratégie, dans le but d'assurer la justesse de la méthode de quantification, la caractérisation des étalons légers représentent un point clé dans le développement de la méthode. Il est dont important de disposer des étalons légers de haute pureté avec une concentration déterminée avec exactitude.

IV.3.2.4 Caractérisation des étalons légers par l'approche PICAA

Il y a plusieurs approches pour caractériser des étalons légers : l'approche par masse balance, la RMN quantitative, l'analyse élémentaire et la technique PICAA (*Peptide Impurity Corrected by Amino acids*). Dans la caractérisation d'étalons peptidiques ou protéiques, l'approche PICAA est souvent utilisée. Cette approche consiste à soustraire la contribution des impuretés peptidiques ou protéiques obtenue par l'analyse des impuretés HRMS à la concentration du peptide ou protéine d'intérêt déterminée par l'Analyse des Acides Aminés (AAA). Lors de l'analyse AAA, l'étalon purifié subit une hydrolyse en condition acide en présence d'acide chlorhydrique 6M pendant une durée entre 24h et 72h et à une température entre 100°C et 150°C. Ces conditions sont à optimiser suivant la nature du peptide ou de la protéine afin d'assurer une hydrolyse totale. Afin de corriger les variations durant l'analyse, des étalons internes marqués sont ajoutés dans l'échantillon avant l'hydrolyse. Après hydrolyse, les hydrolysats sont ensuite analysés par LC-MS. Les concentrations d'au moins trois acides aminés différents par peptide/protéine sont utilisées pour déterminer la concentration peptidique/protéique de l'étalon. Cependant, certains acides aminés ne sont pas stables dans les conditions d'hydrolyse, et seules la proline, la valine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, l'arginine et l'alanine sont suffisamment stables à des températures jusqu'à 150°C (233). L'approche PICAA permet d'avoir de faibles incertitudes sur le résultat de la pureté de l'étalon.

IV.4 Traitement de l'échantillon

Il est possible de quantifier directement certains biomarqueurs protéiques dans le sérum/plasma après digestion enzymatique sans passer par des étapes de pré-traitement des échantillons. Dans ces cas précis, les limites de quantification sont généralement situées autour du µg/mL. Buscher *et al.* ont pu quantifier la protéine tenecteplase dans du sérum de rat avec une limite de quantification de 5 µg/mL (environ 85 nM) (234). La sensibilité limitée de cette approche est principalement expliquée par la suppression de signal liée au nombre important des peptides protéolytiques générés après la digestion. En effet, les peptides générés par les protéines de la matrice ont des propriétés similaires de ceux issus de la protéine d'intérêt, et une analyse directe entraine donc une co-élution de nombreux peptides entrainant l'effet de suppression de signal dans la source d'ionisation, ce qui réduit la sensibilité d'analyse. Par conséquent, cette approche n'est pas adaptée pour la quantification des protéines de faible abondance. La réduction de la complexité des échantillons est donc une étape essentielle afin d'améliorer les limites de quantification pour atteindre des niveaux de concentration de l'ordre du ng/mL dans le sérum/plasma. Les

différentes stratégies possibles pour enrichir les protéines d'intérêt et réduire la complexité des échantillons sont illustrées dans la *Figure 35* avec les limites de quantification obtenues dans différentes études. En général, la technique d'immunoaffinité permet d'avoir une limite de quantification bien meilleure que les autres techniques (précipitation des protéines, extraction en phase solide ou déplétion des protéines). Ces différentes techniques seront décrites plus loin.

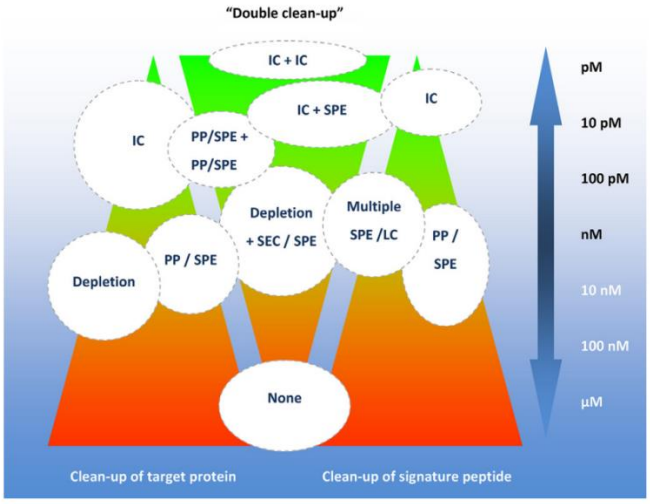


Figure 35. Différentes stratégies de pré-traitement des échantillons pour une quantification de biomarqueurs protéiques dans le sérum/plasma par LC-MS *(186)*.

Les limites de quantification sont de l'ordre du µM si aucune étape de pré-traitement des échantillons est appliquée pour réduire la complexité des échantillons. L'approche par immunoaffinité permet d'améliorer fortement la sensibilité de la méthode avec des limites de quantification de 10pM. Les doubles approches telles que IC +IC, IC + SPE donne une meilleure sensibilité de l'ordre de 1pM.

IC : immunoaffinité ; PP : précipitation des protéines ; SPE : extraction en phase solide ; SEC : chromatographie d'exclusion de taille ; LC : chromatographie liquide.

Le *Tableau 10* présente différentes études de quantification de différents biomarqueurs dans le sérum/plasma humain. Les différents paramètres analytiques de la procédure de quantification, ainsi que les limites de quantification exprimées en ng/mL et picomolaire (pM) sont rapportés dans ce tableau. Les limites de quantification sont améliorées non seulement par la préparation d'échantillons mais également par le système analytique LC-MS.

Tableau 10. Etude bibliographique des articles de recherche pour la quantification des biomarqueurs dans le sérum/plasma par la stratégie *bottom-up*. Les études sont présentées en fonction de la technique de la préparation d'échantillon.

Etude	Analyte	MM (kDa)	Matrice		Protéines extraction	Peptides extraction	LC colonne (mm x mm ; µm)	système MS	LLOQ	
			Type	Volume (µL)					ng/mL	pM
IMMUNOAFFINITE AU NIVEAU PROTEIQUE										
Kumar, 2010 (235)	PTH	9,4	P	1000	IA	non	2,1 x 50 ; 3	QqQ	0,04	4
Fu, 2018 (229)	NVS001	25	S	50	IA	Non	2,1 x 100 ; 2,7	Qtrap	10	400
Winther, 2009 (236)	proGRP	13	P	100	IA	SPE C18	1 x 50 ; 5	QqQ	0,33	25
Torsetnes, 2013	proGRP	13	P	1000	IA	non	1 x 50 ; 3	QqQ	0,17	13
Faria, 2015 (237)	OPN	60	P	500	IA	Non	0,15 x 100 ; 1,7	QqQ	60	1000
Klont, 2018 (238)	sRAGE	32	S	50	IA	Non	0,15 x 100 ; 1,8	QqQ	0,1	3,12
Klont, 2019 (239)	Protéine D	35	S	100	IA	non	0,15 x 100 ; 1,8	QqQ	5,0	143
Adrait, 2012 (228)	SEA	27	S	1000	IA - SDS PAGE	non	0,075 x 150 ; 3	Qtrap	1,1	39
Neubert, 2013 (206)	Hβ-NGF	27	P	600	IA	SISCAPA - SPE C18 en ligne	0,075 x 50 ; 3	Qtrap	0,007	0,3
Such-Sanmartin, 2014 (240)	GH	20, 22	P	100	IA	SPE SDB-XC	0,075 x 150 ; 3	QqQ	0,2	9,1
IMMUNOAFFINITE AU NIVEAU PEPTIDIQUE										
Kuhn, 2009 (241)	TnI	24	P	50	non	SISCAPA - SPE C18	0,075 x 100 ; 3	Qtrap	2,8	120
Whiteaker, 2010 (242)	OPN	60	P	10	non	SPE C18 - SISCAPA	0,075 x 100 ; 3	Qtrap	1,6	27
	Protéine tumeur D52	20							20,8	1040
Kuhn, 2011 (243)	S100B		P	100	non	SPE HLB - SISCAPA	0,075 x 100 ; 3	Qtrap	0,5	50
Dubois, 2019 (184)	PCT	13	P	100	PP	SISCAPA	LC capillaire	Orbitrap	0,1	7
ULTRAFULTRATION DES PROTEINES										
Gilquin, 2017 (244)	MOIX, PCK1, NGAL, L-FABP	-	U	400	Filtration	SPE C18	2,1 x 100 ; 2,6	Qtrap	0,2	
Bailly-Chouriberry, 2012	Rh-EPO	30,4	P	4000	IA -Filtration	Non	2,1 x 150 ; 5	QqQ	0,25	8
DEPLETION DES PROTEINES										
Fortin, 2009 (245)	PSA	28,4	P	100	Déplétion (albumine)	Double SPE HLB - MCX	2,1 x 100 ; 3,5	Qtrap	5,0	180

Keshishian, 2007 (227)	Horse PR	48	P	100	Déplétion (12)	Double SPE HLB - SCX	0,075 x 100 ; 3	Qtrap	0,94	25
Keshishian, 2009 (246)	NT-ProBNP	11	P	800-1200	Déplétion (12)	Double SPE HLB - SCX	0,075 x 110 ; 3	Qtrap	2,78	253
	MRP14	13							15,76	1212
	BNP-32	-							0,77	
PRECIPITATION DES PROTEINES										
Bailly-Chouriberry, 2013 (247)	α-Cob	7.8	P	3000	Double PP - SPE WCX - Double filtration	non	2,1 x 150; 5		1,0	130
Zhang, 2014 (248)	IP-10	8.6	P	50	PP		2,1 x 50; 1,7	QqQ	0,27	31,6
Winther, 2009 (236)	proGRP	13	P	1000	PP	C18 en ligne	1 x 50 ; 5	QqQ	5,0	390
Such-sanmartin, 2015 (249)	IGF-1, IGF-2, IBP2, IBP3, A2GL	7,6; 7,5; 31,5; 28,7; 34,3	P	7	PP - Filtration		0,1 x 50; 3	QqQ	50	
Such-Sanmartin, 2014 (240)	GH	20, 22	P	35	Double PP	SPE SDB-XC	0,075 x 150 ; 3	QqQ	3,9	177
EXTRACTION EN PHASE SOLIDE										
Yang, 2009 (250)	PEG-Interferon-α2	60	S	200	SPE RP	SPE MCX	2,1 x 50 ; 5	QqQ	3,6	60
Szapacs, 2010 (251)	Domaine anticorps	13,1	P	300	SPE	non	2,1 x 50 ; 1,7	QqQ	1,0	76
Bronsema, 2013 (218)	CT	3,2	P	500	SPE HLB	SPE MCX	2,1 x 100 ; 1,7	QqQ	0,05	15,6
Wilffert, 2013 (252)	rhTRAIL	60	S	100	IMAC	non	2,1 x 100 ; 1,7	QqQ	20	333
Wilffert, 2016 (204)	rhTRAIL	60	S	100	SPE SCX - IMAC	non	0,15 x 100 ; 1,7	QqQ	2,0	33,3
Klont, 2018 (238)	sRAGE	32	S	50	SPE SCX	Non	0,15 x 100 ; 1,8	QqQ	0,2	6,25

S : sérum ; P : Plasma ; IA : immunoaffinité ; PP : précipitation de protéine ; SPE : extraction en phase solide ; RP : phase inverse ; IMAC : Immobilized metal affinity chromatography ;; IP-10: interferon-gamma-inductible protein-10

CA II : carbonic andrydrase II ; BIR2/BIR3 : bak-1 interacting receptor-like kinases ; SPINK1 : serine peptidase inhibitor kazal 1 ; PTH : parathyroid hormone ; NVS001 : candidat drug ; OPN : osteopontin ; sRAGE : soluble receptor for advanced glycation end products; SEA : staphylococcus enterotoxin A ; Hβ-NGF : Human β-nerve growth factor ; TnI : troponin I ; BCA : Bovine carbonic anhydrase ; β-LGB : bovine betalactoglobulin ; MOIX : myoinositol oxygenase ; PCK1 : phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 ; NGAL : netrophil gelatinase-associated lipocalin ; L-FABP : liver fattt acid-binding protein ; Rh-EPO : recombinant human erythropoitin ; PSA : prostate-specific antigen ; NT-ProBNP : N-terminal pro-brain natriuretic peptide ; MRP-14 : migration inhibitory factor-related protein 14 (S100A9) ; BNP-32 : brain natriuretic peptide 32 ; TIMP-1 : metallopeptidase inhibitor 1 ; α-Cob : α-Cobratoxin ; IP-10 : interferon-γ-inducible protein 10 ; IGF-3 : insulin-like growth factor 3 ; IGF-1 : insulin-like growth factor 1 ; proGRP : pro-gastrin-releasing peptide ; IBP : IGF binding protein ; A2GL : leucine(rich alpha-2-glycoprotein ; GH : growth hormon protein; PEG-Interferone-α2 ; CT : calcitonin ; rhTRAIL : recombinant human TNF-related apoptosis-inducing ligand ; AGT : Angiotensinogen ; Hep-25 : hepcidin-25 ; Apo : Apolipoproteines ; PCT : procalcitonin

IV.4.1 Dénaturation des protéines

L'étape de dénaturation des protéines est nécessaire afin de réduire les interactions entre les protéines et au sein des protéines, et ainsi faciliter la digestion des protéines. Dans le sérum, la solubilité des protéines est associée à la nature des groupements latéraux des acides aminés qui les composent. En effet, les chaines latérales hydrophiles ou polaires sont dirigées vers l'extérieur pour faciliter l'hydratation ou former des liaisons hydrogènes avec l'eau. Au contraire, les chaines hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur pour minimiser les contacts avec l'eau. L'ajout d'agents dénaturants perturbe cette conformation et permet d'exposer à la surface ces groupements hydrophobes, ce qui modifie donc l'interaction entre les protéines. Il existe de nombreux agents dénaturants tels que le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le déoxycholate de sodium (SDC), le cholate de sodium, l'urée ou encore le Tween 20. Proc *et al.* ont étudié l'influence de différentes natures d'agents dénaturants tels que les agents ioniques, les agents chaotropiques et les surfactants sur la digestion de 45 protéines plasmatiques. L'étude montre une meilleure digestion pour toutes les protéines en utilisant le SDC (253). Le SDC est également utilisé dans de nombreuses études (254–257). Comme d'autres détergents, le SDC peut interférer avec les mécanismes de rétention lors de l'analyse LC-MS, et lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse. L'avantage du SDC est qu'il peut être éliminé facilement par précipitation après acidification avant l'analyse LC-MS.

IV.4.2 Précipitation des protéines

La précipitation des protéines est une technique simple et rapide. Les protéines sont précipitées en ajoutant un solvant organique (acétonitrile, méthanol, acétone), un acide inorganique (acide perchlorique, acide trichloracétique) ou du sel (sulfate d'ammonium) dans les fluides biologiques. En effet, la solubilité des protéines est le résultat de plusieurs interactions : des interactions polaires avec le milieu aqueux, des interactions ioniques avec les sels et des interactions électrostatiques répulsives entre les protéines de même charge. L'ajout de ces réactifs permet de rompre ces interactions, et réduit ainsi la solubilité des protéines. Polson *et al.* ont évalué l'efficacité de cette technique avec de nombreux réactifs de précipitation. La capacité à précipiter des protéines plasmatiques est plus importante avec l'acétonitrile qu'avec le méthanol. En effet, plus de 89 % des protéines sont précipitées avec un taux de 50 % d'ACN, tandis qu'il y a seulement 64 % de protéines précipitées avec 50 % MeOH (258). La précipitation des protéines ne permet néanmoins pas d'atteindre un rendement de 100 % de précipitation des protéines dans le sérum/plasma. Ce rendement dépend des propriétés physicochimiques de chaque protéine d'intérêt, que l'on peut retrouver dans le surnageant et/ou dans le culot après une centrifugation. Ainsi les protéines de masse moléculaire élevée précipitent en général plus aisément, tandis que les protéines de faible poids moléculaire et peptides restent dans le surnageant. Cette technique permet également d'éliminer les petites molécules telles que les sels si le culot est récupéré pour les analyses. Quelle que soit la fraction récupérée, la précipitation des protéines permet donc

de fractionner efficacement l'échantillon, pour diminuer la complexité des matrices biologiques et pour améliorer la sensibilité des analyses protéiques. En effet, certaines études ont rapporté des limites de quantification de l'ordre du ng/mL (*Tableau 10*). En particulier, Zhang *et al.* ont utilisé un mélange d'acétonitrile et d'acide formique pour précipiter des protéines du sérum en travaillant sur la fraction surnageante, ce qui permet d'atteindre une limite de quantification de 0,27 ng/mL (31,6 pM) pour le biomarqueur IP-10 (248). Cependant, cette technique n'est pas spécifique. Dans certaines situations, il est judicieux de réaliser deux étapes de précipitation des protéines en récupérant le surnageant puis le culot ou inversement pour bien réduire la complexité des matrices et extraire les protéines d'intérêt (240).

IV.4.3 Ultrafiltration des protéines

L'ultrafiltration des protéines est une technique simple reposant sur la différence d'encombrement stérique et donc de masse moléculaire apparente des protéines. Différentes membranes sont utilisées avec des seuils de filtration définis (3 kDa, 10 kDa ou 30 kDa). La sélection de la membrane se fait donc en fonction de l'analyte d'intérêt. Cette technique permet de simplifier le mélange de protéines présentes dans les matrices en éliminant les protéines de masse moléculaire élevée qui sont parmi les plus abondantes telles que l'albumine, la transferrine, le fibrinogène avec un niveau de filtration de 30 kDa par exemple pour une analyse des protéines de moins de 30 kDa. Cependant, une limitation majeure est la possibilité d'éliminer également des protéines d'intérêt si elles sont en interaction avec protéines de haut poids moléculaire.

Une étape d'ultrafiltration peut également être implémentée pour la purification des peptides protéolytiques afin de retenir sur la membrane des protéines non-digérées, comme dans le cas la stratégie de digestion sur filtre. Le principe de cette stratégie est présenté dans la *Figure 36*. Après le dépôt de l'échantillon sur la membrane du filtre de seuil 3 kDa ou 10 kDa, les protéines sont purifiées par centrifugation pour éliminer les molécules de faible masse moléculaire qui ne sont pas retenues par la membrane. Les protéines d'intérêt restant sur la membrane sont ensuite réduites, alkylées et digérées. Les peptides issus de la digestion et de masse plus faible que 3 kDa ou 10 kDa sont ensuite récupérés dans le filtrat par l'étape de centrifugation.

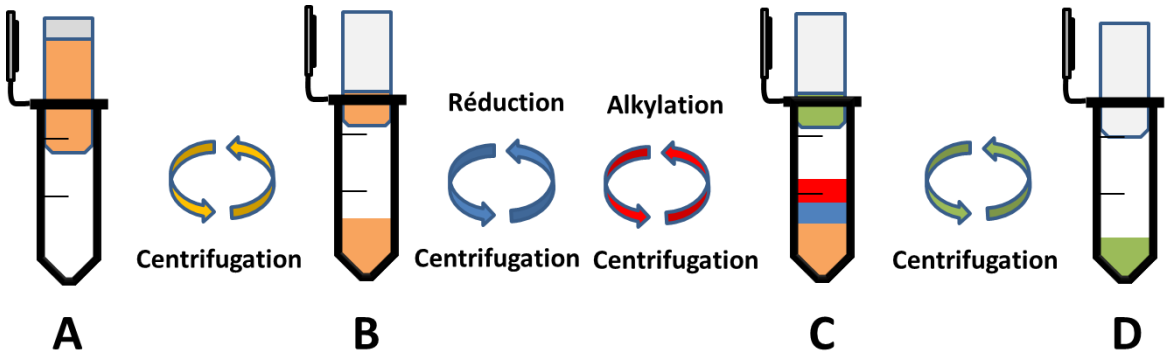


Figure 36. Principe de la digestion sur filtre

La digestion sur filtre se déroule en 4 étapes principales. Le dépôt de l'échantillon sur filtre (A), puis après une centrifugation à la vitesse adaptée, les protéines et les interférences de petites tailles sont éliminés dans le tube (B). Les étapes de réduction et alkylation ont lieu directement sur filtre, après chaque réaction, une centrifugation est nécessaire pour éliminer les réactifs (C). La digestion est ensuite réalisée directement sur filtre suivi par une centrifugation pour récupérer les peptides digérés qui passe à travers le filtre.

Cette approche de digestion directe sur filtre permet non seulement d'éliminer les différents réactifs de la réaction de réduction et d'alkylation après l'étape de centrifugation, et d'éviter la présence des protéines non-digérées mais également d'éliminer certains composés comme le SDS (259). La technique d'ultrafiltration est une des stratégies évaluées pour le traitement de l'échantillon de ce projet de thèse. Elle permettrait de réduire un nombre important des protéines de poids moléculaires supérieurs à 30 kDa dans l'étape de purification au niveau protéique et d'éliminer des protéines non digérées lors de la digestion avec une membrane de 10 kDa pour faire une digestion directe sur filtre.

IV.4.4 Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (SPE pour *Solid Phase Extraction*) est une technique permettant la purification des protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. La séparation repose sur la différence d'affinité des protéines entre la phase stationnaire d'une part et la phase mobile d'autre part. Le choix des solvants constituant la phase mobile et de la phase stationnaire est déterminant. Il nécessite des optimisations pour réduire les interférences matricielles et optimiser au maximum les rendements de récupération des protéines d'intérêt. Le choix de la phase stationnaire se fait en fonction des propriétés physico-chimiques des protéines d'intérêt et des interférences à éliminer, telles que la polarité, la solubilité, le poids moléculaire, l'existence de groupements chargés. Il existe une large gamme de phases stationnaires basées sur différents types d'interaction telles que l'hydrophilie (phase à polarité dite « normale », type HILIC), l'hydrophobicité (phase à polarité dite « inversée », avec greffons C4, C8, C18), le HLB (balance hydrophile-lipophile), les séparations ioniques (par échange de cation forts SCX pour strong cation exchange, ou échange de cation mixte MCX pour mixed cation exchange).

Le principe d'extraction en phase solide est illustré dans la *Figure 37* ci-dessous :

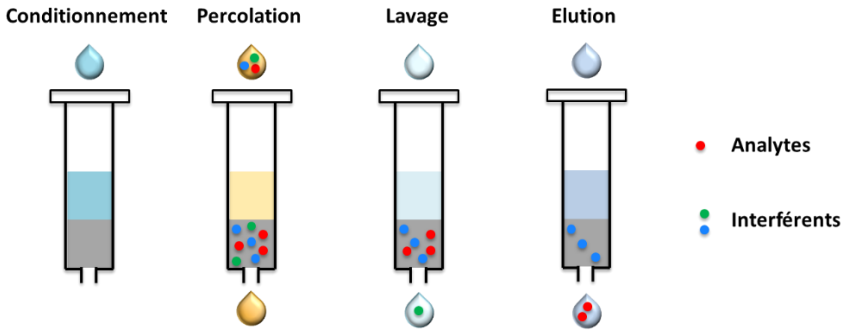


Figure 37. Principe de l'extraction en phase solide (SPE)
L'extraction se déroule en général en 4 étapes : après une étape de conditionnement de la phase stationnaire, l'échantillon est déposé pour provoquer une rétention des protéines sur la phase stationnaire, pendant que la plupart des interférents tels que les sels sont éliminés par simple non rétention. Une étape de lavage est nécessaire pour éliminer encore une partie des interférents faiblement retenus. La dernière étape consiste donc à éluer les protéines d'intérêt avec un solvant de force d'élution appropriée afin d'éluer seulement les protéines d'intérêt en évitant d'éluer les interférents fortement retenus ***(260)***.

De nombreux travaux incluent une étape de SPE dans le protocole de préparation d'échantillon pour la purification des protéines sériques/plasmatiques, en particulier pour les protéines de faible abondance (inférieure à 1 ng/mL) (218,238) (*Tableau 10*). Bronsema *et al.* ont rapporté une limite de quantification de la calcitonine de 0,05 ng/mL en utilisant la technique SPE de type HLB avec une efficacité d'élimination des protéines sériques pouvant aller jusqu'à 99 % (218). Cependant, il est important de noter que le rendement de récupération des protéines d'intérêt n'est pas de 100 %. Yang *et al.* atteignent un rendement d'extraction de l'ordre de 50 % pour PEG-IFN-α2 avec une limite de quantification de 3,6 ng/mL (250). En outre, 74 % des protéines sRAGE ont été récupérées après une SPE de type SCX selon Klont *et al.* (238). La technique SPE présente cependant un grand intérêt pour la purification des protéines selon leurs caractéristiques physicochimiques et pour simplifier la complexité d'une matrice telle que le sérum. Elle constitue une méthode orthogonale par rapport à la technique immunoaffinité qui est basée sur les propriétés fonctionnelles.

IV.4.5 Déplétion des protéines

La déplétion des protéines permet de réduire la complexité en éliminant les protéines les plus abondantes telles que l'albumine, ou les IgG total. Cette technique est basée sur l'affinité de ces protéines avec des anticorps. Il existe des kits contenant des anticorps immobilisés sur support pouvant éliminer 14 des protéines les plus abondantes. La déplétion des protéines paraît efficace pour réduire l'effet de suppression de signal causée par les protéines et ainsi améliorer la sensibilité des méthodes. En effet, l'étude de Shi *et al.* en 2013 a montré une amélioration de la limite de quantification d'un facteur allant jusqu'à

10 en utilisant une déplétion de ces 14 protéines les plus abondantes (261). Cependant, il est important de noter que des protéines de plus faible masse moléculaire risquent également d'être éliminées durant le processus de déplétion. En effet, l'albumine est connue comme une protéine de transport dans la circulation sanguine et elle se lie à de nombreuses molécules telles que les hormones, cytokines et lipoprotéines. L'élimination de l'albumine peut donc entrainer une perte des composés d'intérêt. Ainsi, dans cette même étude, Shi *et al.* soulignent une perte conséquente de la protéine d'intérêt antigène prostatique spécifique (PSA) avec cette approche : 60 % et 35 % pour la protéine après une déplétion d'albumine et d'IgG, respectivement. Cette perte de PSA est de 75 % après une déplétion des 14 protéines les plus abondantes (261). Il est donc primordial de minimiser préalablement les interactions non covalentes entre les protéines d'intérêt et l'albumine avant toute étape de déplétion des protéines les plus abondantes. De plus, les protéines d'intérêt peuvent créer des liaisons non-spécifiques avec les anticorps immobilisés en raison de séquences protéiques similaires, impactant ainsi le rendement d'extraction (262,263). Cette technique qui permet donc de réduire la concentration de protéines parmi les plus abondantes, nécessite cependant une bonne optimisation afin de réduire la perte des protéines d'intérêt.

IV.4.6 Immunoaffinité

L'immunoaffinité est une technique plus spécifique basée sur la reconnaissance entre les analytes et les anticorps spécifiques à l'analyte. Ces derniers sont souvent greffés à des billes magnétiques ou greffés à l'intérieur de la colonne, appelée colonne d'immunoaffinité. L'un des avantages de cette technique est sa spécificité : elle permet d'avoir un meilleur enrichissement d'un analyte d'intérêt et ainsi d'atteindre une meilleure sensibilité par rapport aux autres techniques de préparation des échantillons.

L'immunoaffinité peut être implémentée non seulement pour l'extraction des protéines d'intérêt, mais également l'extraction des peptides après l'étape de digestion enzymatique. L'immunoaffinité au niveau des protéines est largement utilisée pour la quantification de protéines de faible abondance, en particulier dans les matrices complexes (*Tableau 10*). Elle permet de simplifier la matrice en isolant spécifiquement les protéines d'intérêt, ainsi de réduire la quantité d'échantillon utilisée. De plus, l'immunoaffinité offre également la possibilité de capturer une large gamme de protéines pour une analyse multiplexe. Cependant, le rendement de récupération peut ne pas être satisfaisant. Par exemple, Adrait *et al.* a rapporté un rendement de 7,8 % pour l'extraction des entérotoxines A dans le sérum (228). Krastins *et al.* a implémenté cette approche pour la quantification de la PCT dans le sérum avec une limite de quantification de 1 ng/ml à partir d'une prise d'essai de 1 mL de sérum (183). Quant à l'immunoaffinité au niveau du peptide, le concept SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) a été introduit par Anderson *et al.* en 2004. Cette méthode repose sur l'utilisation d'anticorps anti-peptides

immobilisés (264). L'efficacité des anticorps SISCAPA joue un rôle important dans l'amélioration de la limite de détection et de quantification. L'étude de Whiteaker *et al.* en 2010 sur la quantification de neuf protéines a montré une gain de 391 à 9608 fois en sensibilité, en fonction des protéines, en utilisant les anticorps SISCAPA (265). De plus, un des avantages importants de cette technique est le multiplexage. Ippoliti *et al.* ont quantifié par LC-MS plus de 150 peptides résultant de la digestion de biomarqueurs protéiques des maladies cardiovasculaires (266). Cependant, l'efficacité de cette technique est fortement influencée par l'étape de digestion enzymatique. En effet, Kuhn *et al.* ont montré que le rendement d'extraction des peptides protéolytiques de la troponine-I est bien inférieur à celui des peptides synthétiques (53 % versus 94,4 %). Ce faible rendement d'extraction serait lié à un faible rendement de digestion de la troponine-I (241). De plus, si la matrice est trop complexe, il y a un risque de saturer les anticorps par des peptides interférents (224). Pour la quantification de la PCT dans le sérum, Dubois a décrit dans son manuscrit de thèse une stratégie de quantification utilisant l'approche SISCAPA avec une limite de quantification de 0,1 ng/mL sur une prise d'essai de 100 µL sérum/plasma (184). L'immunoaffinité permet d'améliorer la sensibilité de quantification, cependant les anticorps spécifiques de l'analyte d'intérêt ne sont pas toujours disponibles et le développement des anticorps demande du temps et est souvent coûteux. De plus, la reproductibilité entre différents lots d'anticorps est variable.

La quantification des protéines de faible abondance en ID-LC-MS dans la matrice complexe présente donc de nombreux enjeux. Il est important donc de définir la stratégie de développement et chaque étape de la méthode de la quantification devra être optimisée afin d'augmenter la sensibilité de la méthode pour atteindre la limite de quantification désirée.

Partie B
Résultats

Chapitre I Evaluation des besoins de standardisation 101
I.1 Evaluation de la comparabilité des résultats de mesure de la PCT..... 102
I.2 Stratégie pour l'établissement d'une chaîne de traçabilité des mesures de la PCT 149
Chapitre II Développement d'une méthode de quantification de la PCT en sérum..... 177
II.1 Sélection des peptides pour la quantification de la PCT en sérum par une approche bottom-up 178
II.2 Quantification et caractérisation des étalons primaires..... 181
II.3 Méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain 217

La forte incidence et le taux élevé de mortalité du sepsis, ainsi que la croissance de la résistance aux antibiotiques sont des menaces pour la santé publique. Dans la lutte contre ces menaces, le dosage de la PCT représente un outil très efficace pour aider les cliniciens dans le diagnostic et la décision d'initier ou d'interrompre un traitement antibiotique du sepsis et de l'infection des voies respiratoires inférieures. De nombreuses études ont montré les bénéfices de la mise en place des dosages de la PCT dans la prise en charge des patients en termes de durée de traitement antibiotique, de durée de séjour hospitalier et de coût (159,267,268). Cependant, certaines études n'ont pas observé les mêmes bénéfices (158,160). Cela peut être dû à l'hétérogénéité dans la pratique de dosage de la PCT entre les hôpitaux d'un même pays, ou d'un pays à l'autre. En effet, selon une étude menée dans 61 hôpitaux du Massachusetts, la plupart des hôpitaux ne disposent pas de ressources instrumentales pour réaliser en interne les dosages de la PCT (269). Celui-ci est donc réalisé en externe. Le délai d'obtention du résultat est donc très différent entre les hôpitaux : moins de 2h pour les dosages réalisés en interne et entre 2 et 7 jours pour ceux réalisés en externe. Cette différence de temps peut entrainer un retard important dans l'établissement du diagnostic et la mise en place du traitement antibiotique par les cliniciens, qui doivent cependant être rapides. De plus, pour les hôpitaux ayant la capacité de réaliser les dosages de la PCT sur place, il y a également une hétérogénéité en termes de méthodes de dosage utilisées par les différents hôpitaux. En effet, comme cela a été présenté (voir section A.III.2.1), il existe une large gamme de méthodes de dosage de type immunoessai sur le marché. Or ces méthodes de dosage sont basées sur des techniques différentes et utilisent des systèmes d'étalonnage différents. Ces différences sont susceptibles de produire des variabilités entre les résultats, ce qui peut entrainer des conséquences importantes dans le suivi des patients, les études épidémiologiques et l'établissement de recommandations cliniques.

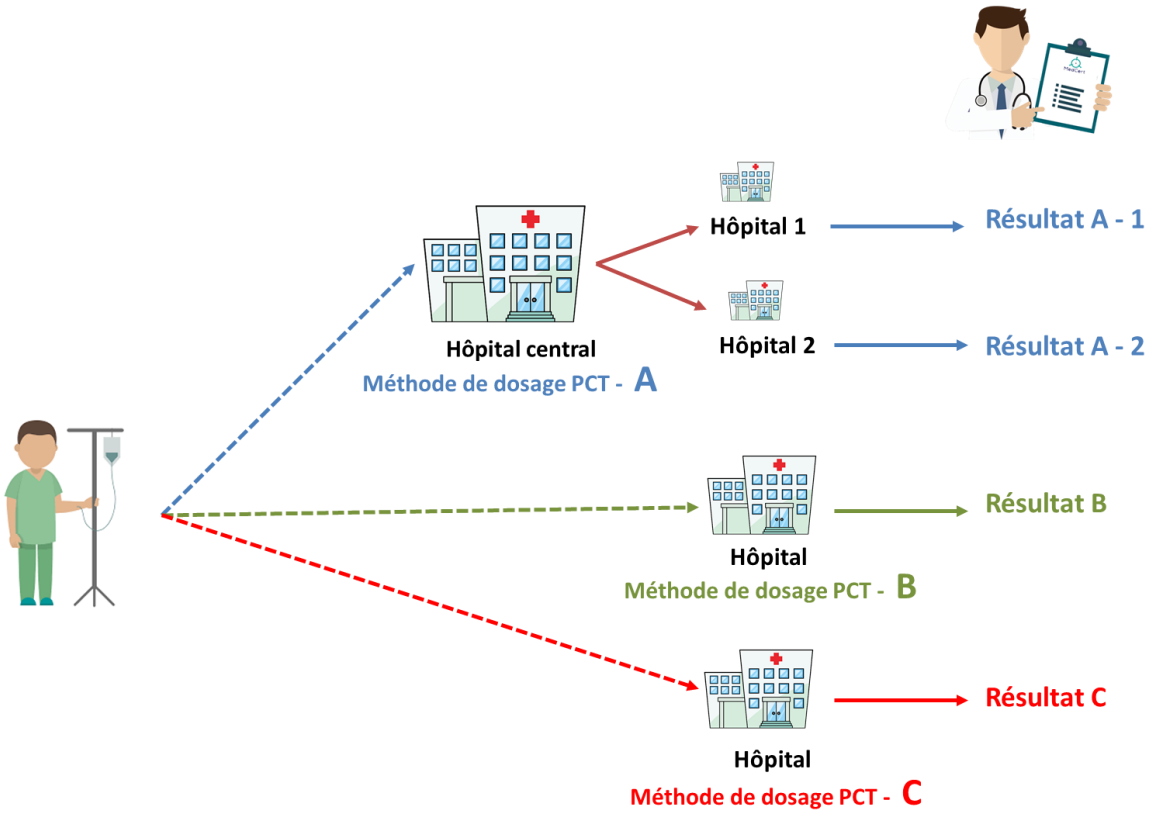


Figure 38. Résultat de la concentration de la PCT d'un patient en fonction des différents parcours hospitaliers

Afin d'améliorer la qualité de prise en charge des patients, il est essentiel de disposer de résultats fiables et comparables dans le temps entre différentes méthodes et différents laboratoires. Or, en l'état actuel, la comparabilité des résultats reste controversée et ne semble pas être démontrée de manière rigoureuse. Pour cela, une partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'évaluation de la comparabilité des résultats obtenus entre différentes méthodes de dosage de la PCT afin de documenter et comprendre les variabilités observées. Pour cela, une étude bibliographique des études de corrélation disponibles dans la littérature et une étude des campagnes d'EEQ ont été réalisées.

Par ailleurs, le manque de matériaux de référence et de méthodes de référence pour le dosage de la PCT empêche d'établir un raccordement métrologique des résultats d'analyse à un étalon supérieur par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique comme cela est exigé par les normes NF EN ISO 15189, NF EN ISO 17511 et le règlement européen 2017/746/EU. L'établissement d'une chaîne de traçabilité métrologique des résultats de dosage de la PCT est considéré comme une priorité selon le Consortium international pour l'harmonisation des résultats des laboratoires cliniques (ICHCLR pour The International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results). Afin de pallier ce manque, la Fédération Internationale de Biologie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC) a créé le groupe de travail sur la « standardisation » des méthodes de dosage de la PCT (WG-PCT). Un

des objectifs principaux du WG-PCT est de développer un système de référence pour les dosages de la PCT. Dans cette optique, afin de répondre à ces exigences, le travail présenté dans ce manuscrit a principalement été consacré à l'optimisation et au développement d'une méthode de référence par dilution isotopique couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance et à la spectrométrie de masse (ID-LC-MS/MS) pour le dosage de la PCT dans le sérum humain.

Ainsi, cette partie est divisée en deux grands chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'évaluation des besoins de standardisation des méthodes de dosages de la PCT. Le deuxième chapitre est consacré au travail expérimental portant sur la caractérisation des étalons primaires et le développement de la méthode quantification de la PCT par ID-LC-MS/MS.

Chapitre I

Evaluation des besoins de standardisation

I.1 Evaluation de la comparabilité des résultats de mesure de la PCT 102

Article 1 : Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ? 107

I.2 Stratégie pour l'établissement d'une chaîne de traçabilité des mesures de la PCT 149

Article 2 : Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders 153

I.1 Evaluation de la comparabilité des résultats de mesure de la PCT

Des études de corrélation sont souvent menées pour démontrer les performances analytiques suite à la mise sur le marché d'une nouvelle méthode de dosage de biomarqueurs. Ces études sont établies à partir des résultats obtenus par deux méthodes de dosages données sur un large panel d'échantillons de patients et permettent d'évaluer la comparabilité des résultats entre les méthodes. Il existe différentes méthodes pour analyser ces résultats de corrélation. Dans la plupart des cas, une régression linéaire est établie entre deux séries de résultats provenant de deux méthodes de dosage et les évaluations reposent sur l'analyse de la pente de la droite générée et du coefficient de corrélation de Pearson. Or, cette approche présente certaines limites. En effet, le coefficient de corrélation est très dépendant du nombre d'échantillons et de la gamme de concentrations étudiée, et sera d'autant plus grand que la gamme de concentrations est large. En outre, la pente de la droite ne permet pas d'examiner la réelle différence observée entre les deux résultats d'un échantillon donné. L'analyse de biais par l'approche Bland-Altman, présentant la différence des résultats en fonction de la moyenne de ces deux résultats, est alors utilisée pour apprécier le biais entre les résultats obtenus (270). Cependant, le biais moyen obtenu selon cette approche est également dépendant de la gamme de concentration évaluée. Il est donc difficile de comparer les différentes études de corrélation entre elles, notamment dans le but d'évaluer l'évolution de la comparabilité des résultats dans le temps. Enfin, afin de compléter les informations obtenues par les approches précédentes, une information supplémentaire obtenue par les études de corrélation est l'accord de classification des patients aux différents seuils de décision clinique selon les méthodes de dosage utilisées. Ce paramètre permet d'évaluer l'impact de la variabilité des résultats sur la décision clinique.

Outre les études de corrélation, plusieurs campagnes d'EEQ sont régulièrement réalisées dans différents pays. Comme cela a été présenté précédemment, les EEQ permettent grâce à des échantillons de contrôle de comparer les performances d'un laboratoire par rapport à d'autres LBM. Les LBM n'utilisant pas forcément la même méthode de dosage, les EEQ permettent alors d'apprécier la dispersion des résultats obtenus au sein d'une même méthode ou entre les différentes méthodes. Cette donnée permet d'apprécier la différence du résultat obtenu par rapport à la concentration moyenne obtenue par l'ensemble des participants de l'EEQ. Cependant, il est nécessaire d'avoir une participation équivalente entre les méthodes afin d'éviter un éventuel biais qui pourrait être introduit sur la concentration moyenne par la méthode la plus représentative.

Ainsi, afin de documenter et comprendre la variabilité des résultats obtenus entre les différentes méthodes de dosage de la PCT, une évaluation de la comparabilité des résultats a été réalisée à partir d'études de corrélation et d'EEQ. Ce travail a été mené par une analyse de

31 études de corrélations (7 documents du processus d'approbation FDA et 24 articles de recherche) et de 137 EEQ menées par dix organismes d'EEQ dans sept pays européens (France, Suisse, Suède, Allemagne, Finlande, Pays-Bas, Royaume-Uni) et en Australie. La première partie de ce travail est dédiée aux études de corrélations en analysant les trois différents aspects décrits précédemment : l'analyse de régression linéaire, l'analyse de biais par l'approche Bland-Altman et l'accord de classification aux différents seuils de décision clinique du sepsis et des infections des voies respiratoires inférieures (0,1 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL, 2 ng/ml et 10 ng/mL). La deuxième partie est dédiée aux EEQ en analysant l'influence de la concentration, de la matrice et des différentes méthodes de dosage utilisées. L'évaluation s'est principalement basée sur l'analyse des coefficients de variation des différents résultats fournis par les participants lors des EEQ.

Evaluation des études de corrélation

La majorité des études de corrélation a utilisé les méthodes Brahms PCT Sensitive Kryptor et Vidas BRAHMS PCT comme méthode comparative. Ainsi, l'évaluation de la comparabilité des résultats a été principalement focalisée sur ces études. Selon les auteurs, la corrélation entre les différentes méthodes est bonne avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,85. Cependant, comme décrit précédemment, ce coefficient dépend des caractéristiques des échantillons. Concernant l'étude des pentes de la droite de corrélation, les études menées pour le processus d'approbation FDA ont montré une pente très proche de 1 (valeur idéale) avec un biais inférieur à 6 % par rapport à cette valeur, tandis que pour les études menées dans les articles de recherche, ce biais peut atteindre 51 %. Dans certaines études, impliquant d'autres méthodes comparatives (Elecsys Brahms ou Architect Brahms) un biais de 79 % a été démontré pour la méthode Liaison Brahms. De manière intéressante, notre étude a montré que certaines méthodes de dosage présentent systématiquement un biais positif ou négatif par rapport à la méthode comparative. Par exemple, la méthode Vidas Brahms présente un biais positif par rapport aux méthodes Brahms Kryptor, Architect Brahms, Lumipulse Brahms et Elecsys Brahms. Selon les analyses Bland-Altman réalisées au sein des études de corrélation, un biais positif a constamment été rapporté en comparant les immunoessais Lumipulse Brahms, Vidas Brahms, Liaison Brahms, Access, Maglumi à la méthode Brahms Kryptor, ce qui confirme les observations précédemment soulignées par la méthode Vidas Brahms. Il est intéressant de noter qu'une étude récente a montré un biais de plus 20 % au sein des méthodes du groupe Brahms pour lesquelles un effort d'harmonisation a été mené avec l'utilisation d'un étalon commun (271). Cette observation a souligné que l'harmonisation au sein du groupe Brahms n'est pas encore optimale. Cependant, dans un contexte clinique, il est important de connaître l'accord de classification aux différents seuils de décision clinique. Un accord de plus de 90 % a été rapporté pour 90 % des études publiées, et jugé satisfaisant par les différents auteurs des études de corrélation. Or, cet accord de classification dépend

grandement de la distribution des concentrations étudiées. En effet, un meilleur accord sera obtenu si les concentrations sont éloignées de la valeur de décision clinique. Un accord inférieur à 90 % est observé en particulier pour les faibles concentrations (0,25 µg/L et 0,5 µg/L), ce qui peut par exemple engendrer une mauvaise classification des patients atteints de sepsis en fonction de la méthode de dosage. Cependant, selon certains auteurs de ces études de corrélation, les décisions cliniques ne sont que modérément impactées par ces différences entre les résultats observés. Malgré un accord de classification entre les méthodes, les études de corrélation ont conclu que le suivi longitudinal des patients doit être mené sur la même méthode de dosage d'immunoessai afin d'éviter les variations entre les méthodes.

Analyse des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ)

En première approche, le coefficient de variation (CV) entre les résultats des laboratoires participants, obtenu pour chaque campagne EEQ, a été évalué afin de déterminer un CV moyen sur l'ensemble des campagnes. Un CV moyen de 15 % a été observé pour les niveaux de concentrations inférieures à 10 ng/mL et de 18,8 % pour les niveaux de concentrations supérieures à 10 ng/mL, confirmant les observations obtenues dans les études de corrélation et suggérant une harmonisation non optimale des résultats de mesure de la PCT. Cependant, ces EEQ ont été menées sur différents types de matrice à différentes concentrations (échantillon lyophilisé ou congelé supplémenté en PCT, lyophilisé ou congelé non supplémenté en PCT, pool d'échantillons frais, à des concentrations variant de 0,05 à 43,66 µg/L). En outre, ces EEQ ont été menées sur un nombre de campagnes et de types d'immunoessai différents en fonction du type de matrice et de la concentration. L'ensemble de ces éléments peut donc avoir un effet sur le CV moyen entre les résultats des laboratoires sur l'ensemble des campagnes, et ne semble donc pas être le meilleur évaluateur de la comparabilité des résultats. Une analyse plus détaillée a montré la variabilité du CV en fonction du type de matrice utilisée lors des EEQ. En particulier, les échantillons non frais supplémentés en PCT ont montré un CV plus élevé par rapport aux échantillons non frais non supplémentés (22,4 % *vs*. 7,5 % pour les échantillons lyophilisés et 21,0 % *vs*. 8,1 % pour les échantillons congelés). Les échantillons frais non supplémentés en PCT ont également montré un CV élevé (17,6 %). Cela peut être expliqué par le fait que ces échantillons sont obtenus par mélange d'échantillons de différents donneurs de concentration faibles et élevés, ce qui peut potentiellement impacter la commutabilité des échantillons. En effet, les échantillons de concentration élevée obtenus à partir de patients en cas de choc septique sont certainement très complexes et atypique et peuvent impacter la mesure de certains immunoessais.

Une analyse détaillée a également été menée en fonction du type d'immunoessai utilisé par les participants. Comme observé précédemment, le CV des résultats au sein d'un groupe de méthodes immunoessai reste élevé pour les échantillons frais (supérieur à 11,5 %). Cela montre

que la variation des résultats observée précédemment pour les échantillons frais (17,6%) est principalement expliquée par la dispersion des résultats obtenus au sein d'un groupe de méthodes immunoessais. La dispersion des résultats entre les différentes méthodes n'est pas la source majeure de cette variation. La même observation a été constatée pour les échantillons congelés non supplémentés en PCT (6,5 % au sein d'un groupe de méthode contre 8,1 % toutes méthodes confondues). Au contraire, pour les échantillons lyophilisés supplémentés en PCT, un faible CV au sein des différents groupes de méthodes immunoessai a été observé (inférieur à 8,1 %) et ne peut donc pas être la source principale du CV observé entre les laboratoires pour cette matrice toutes méthodes immunoessais confondues (22,4 %). Dans ce cas précis, cette variabilité est due à la différence de résultats obtenus entre les méthodes. En effet, les résultats obtenus par la méthode Vidas Brahms ont, par exemple, été environ 60 % plus élevés que ceux obtenus par la méthode Brahms Kryptor. En particulier, une grande dispersion des résultats entre les méthodes du groupe Brahms a également été observée dans les campagnes d'EEQ (différence de plus de 50 % entre la méthode Brahms Kryptor et les méthodes Elecsys Brahms, Advia Brahms et Architect Brahms). Cependant, l'origine des différences de résultats observées entre les méthodes immunoessais n'est pas facile à identifier : effet matrices de l'échantillon utilisé dans les EEQ ou réel biais introduit par le système d'étalonnage ? Enfin, la différence de résultats obtenus par un groupe de méthode d'immunoessai par rapport à la valeur moyenne obtenue pour chaque campagne a également été évaluée. Cependant, il est difficile d'apprécier ce paramètre en raison de la forte dispersion de la part du marché pour chaque méthode de dosage. En effet, parmi les méthodes commercialisées, les méthodes Elecsys Brahms et vidas Brahms sont les deux méthodes les plus représentatives à travers ces campagnes EEQ, la valeur moyenne obtenue peut être biaisée par les résultats obtenus par ces deux méthodes.

Conclusion

L'évaluation menée dans cette étude a permis d'apporter des informations plus approfondies sur les résultats de mesure de la PCT au cours du temps et à travers les études de corrélations. De plus, cette étude permet également d'avoir un état des lieux récent sur la comparabilité des résultats dans les conditions réelles des LBM à travers les EEQ.

Les études de corrélations et les EEQ ont montré une différence importante entre les résultats obtenus par les différentes méthodes de dosage commercialisées en routine, en particulier au sein des méthodes du groupe Brahms pour lesquelles un effort d'harmonisation a été mené. Cependant, les deux types d'études (corrélation et EEQ) présentent des limites qui rendent difficile l'évaluation correcte de l'état actuel de la comparabilité des résultats obtenus par les méthodes de routine et donc les besoins de « standardisation » des mesures de la PCT. En effet, il y a une différence importante au regard de la méthodologie mise en œuvre telle que le nombre d'échantillons, la matrice, la gamme de concentrations étudiée, la répartition des

échantillons dans cette gamme. De plus, peu d'informations concernant la commutabilité des échantillons utilisés sont disponibles, caractéristique pourtant indispensable afin d'évaluer correctement la comparabilité des résultats entre eux. Outre le besoin de disposer de matériaux commutables, cette étude souligne également le besoin de développer des matériaux de référence communs et des méthodes de référence d'ordre supérieur pour améliorer la fiabilité et réduire la variabilité observée entre les résultats. Par conséquent, des efforts sont encore nécessaires afin de documenter et de mieux comprendre la variabilité observée entre les résultats obtenus.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication, intitulée « *Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ?* » et soumise au journal *Clinical Chemistry*.

Article 1 : Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ?

Huu-Hien Huynh, Amandine Bœuf, Jens Pfannkuche, Philipp Schuetz, Marc Thelen, Gunnar Nordin, Eline van der Hagen, Patricia Kaiser, Dagmar Kesseler, Tony Badrick, Bernard Poggi, Ulla Tiikkainen, Gareth J Davies, Anja Kessler, Mario Plebani, Joëlle Vinh, Vincent Delatour

Article soumis pour publication dans Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ?

Running title: Harmonization status of procalcitonin measurements

Huu-Hien Huynh[1, 2], Amandine Bœuf[1], Jens Pfannkuche[3], Philipp Schuetz[4,5], Marc Thelen[6], Gunnar Nordin[7], Eline van der Hagen[8], Patricia Kaiser[9], Dagmar Kesseler[10], Tony Badrick[11], Bernard Poggi[12,13], Ulla Tiikkainen[14], Gareth J Davies[15], Anja Kessler[16], Mario Plebani[17], Joëlle Vinh[2], Vincent Delatour[1*]

1 Laboratoire National de Métrologie et d'Essai, Paris, France
2 Biological Mass Spectrometry and Proteomics, SMBP, ESPCI Paris, Université PSL, CNRS, Paris, France
3 Penumbra Europe GmbH
4 University Department of Medicine, Kantonsspital Aarau, Switzerland
5 Faculty of medicine, University of Basel, Basel, Switzerland
6 Dutch Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories (SKML), Nijmegen, The Netherlands
7 External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden (Equalis), Uppsala, Sweden
8 MCA laboratory, Streekziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk, The Netherlands
9 Instande.V. Reference Laboratory, Düesseldorf, Germany
10 Quality Control Center Switzerland (CSCQ), Chêne-Bourg, Switzerland
11 Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs (RCPAQAP), Sydney, NSW, Australia
12 ProBioQual, Lyon, France
13 Laboratoire de Biochimie des HCL, CHU Lyon, France
14 Labquality Oy, Helsinki, Finland
15 Weqas, Cardiff and Vale University Health Board, Cardiff, Wales, UK
16 Reference Institute for Bioanalytics (RfB), Bonn, Germany
17 Department of Laboratory medicine, University Hospital of Padova, Verona, Italy

***Corresponding author**: Vincent Delatour at Laboratoire National de Métrologie et d'Essai (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France; Telephone: (33) 1 40 43 40 75; email: vincent.delatour@lne.fr.

Keywords: procalcitonin, immunoassay, method comparaison, external-quality-assessment, harmonization, sepsis

Abbreviations: ICU, intensive care unit; PCT, procalcitonin; LRTI, lower respiratory tract infection; EQA, external quality assessment; EQAS, external quality assessement scheme; CV, coefficient of variation; ALTM all laboratory trimmed mean;

Abstract

Sepsis remains a global health priority with high mortality and morbidity. The key to improve prognosis in sepsis remains early diagnosis and initiation of an appropriate treatment, as well as monitoring of patients for early antibiotic discontinuation. Procalcitonin (PCT) is a recognized biomarker for the early indication of bacterial infections and a useful tool to guide and individualize antibiotic treatment. To meet the increasing demand for PCT testing, numerous PCT immunoassays have been developed and commercialized but comparability of results has been questioned. Many correlation studies have been carried out to evaluate analytical performance and comparability of results provided by the different commercially available immunoassays for PCT but results are conflicting. External Quality Assessment Schemes (EQAS) also show substantial discrepancies and to date, comparability of results remains questionable. The present study gathers results from all published comparison studies and from 137 EQAS surveys to describe the current state-of-the-art in harmonization of PCT results. Our study highlights a significant variability of measurement results and a suboptimal clinical concordance between some assays that support the need of a global harmonization of PCT assays. However, some limitations, such as non-harmonized conditions (concentration interval, experimental conditions, statistical analysis) between correlation studies, and suboptimal and/or unknown commutability of the EQA materials is underlined. Our study highlights the need for commutable reference materials that could be used to properly evaluate result comparability and possibly standardize calibration, if necessary. Such an initiative would further improve the safe use of PCT in clinical routine.

I. Introduction

Sepsis is recognized as a global health priority, with 48.9 million reported cases in 2017 (1,2). Despite innovative therapeutic strategies, sepsis and septic shock remain the leading cause of death in intensive care units (ICUs) (3), with over 11 million deaths recorded worldwide every year (1). Patient mortality is highly dependant on the delay of antimicrobial therapy administration (4,5). Conversely, inappropriate treatment, such as broad-spectrum antibiotics without determination of bacterial origin, may have a worse impact on sepsis-related mortality (6). On another note, the annual hospital expense for patients with sepsis had an estimated cost of more than $23 billion in the US in 2013 (7). Hence, early and accurate sepsis diagnosis followed by appropriate antimicrobial therapy is an essential determinant for patient outcome (8–10) and reducing costs (11,12).

Procalcitonin (PCT) emerged as a valuable biomarker to differentiate between infectious and non-infectious causes of systemic inflammation. In non-infectious conditions, PCT concentration in plasma or serum typically remains below 0.05 µg/L (13). In bacterial sepsis, however, PCT concentration can increase more than 1000 fold from the basal concentration (14,15), whereas it remains low in the case of localized bacterial infections and viral infections. Numerous studies have demonstrated the good performance of PCT as diagnostic marker for sepsis (16–23), and the prediction of associated mortality (24–26). Moreover, its implication in the diagnosis of neonatal sepsis (27) and bacterial lower respiratory tract infections (LRTI) (28) has been confirmed. Studies have also proved utility of PCT for the antibiotic management and stewardship in sepsis and LRTI (29,30), notably in decreasing the antibiotic treatment duration in ICUs (31–33). Therefore, PCT measurement is an efficient tool to reduce the abuse of broad-spectrum antibiotics, antibiotic-related side effects, and the occurrence of antibiotic resistance (28).

To meet the globally high demand for PCT testing, a wide range of immunoassays has been developed employing different calibration and detection principles (chemiluminescence, fluorescence, turbidimetry). Besides, these immunoassays use different antibodies with different selectivity, potentially leading to non-equivalent results. A lack of comparability of results across the different immunoassays can be problematic for maintaining the continuity of medical care when a patient is transferred from one clinical facility to another because the same clinical decision limits may not be applicable (34). Moreover, this lack of comparability can also hinder the ability to aggregate data from different clinical trials and epidemiological studies that were not conducted using the same assay. As PCT-based diagnosis and PCT-guided antibiotic stewardship depends on specific PCT cut-offs (i.e., 0.25 µg/L for non-ICU studies and 0.5 µg/L for ICU studies as stopping rules for antibiotic) (35), high comparability among

assays is crucial. Consequently, determining whether the clinical thresholds established from one trial can be applied to other trials is a central problem. Therefore, it is essential to establish analytical and clinical equivalence between results provided by the different assays. As assay design, particularly the choice and the selectivity of antibodies, can hardly be harmonized, standardization of calibration appears the best and virtually the only way to obtain comparable and accurate PCT results. In absence of any higher-order reference method and internationally agreed calibration material for PCT, the Brahms PCT LIA assay has been used as surrogate reference method for Thermo Fischer Scientific and its licence partners PCT assay development, hereafter referred as to the Brahms PCT assays (36,37), and was the predicate device in the first regulatory submissions to FDA for KRYPTOR and VIDAS Brahms assays. The Brahms Kryptor and Vidas Brahms assays are now used as a predicate device to evaluate the method comparison of other Brahms automated immunoassays in subsequent regulatory submissions. However, other automated PCT assays have been developed by various diagnostic companies (e.g., Maglumi, Diazyme, DiaSys, Beckman Coulter) for which there is currently no harmonization system in place. Alongside fully-automated assays, a wide range of point-of-care PCT tests have also been developed and are increasingly used in critical care settings. Still, here again, there is no reference system in place. Several studies have highlighted the need for harmonization of PCT results (38,39). However important discrepancies can be observed across conclusions of studies conducted to evaluate the analytical performance and the comparability of results provided by the different immunoassays for PCT. In this paper, we first compiled all available correlation studies between commercially available fully-automated assays for PCT measurement and then presented results from 137 external quality assessment (EQA) surveys to the current state of the art with regards to the harmonization of PCT measurements.

II. Correlation studies

We collected all available FDA 510(k) approval documents and published research papers describing the comparison of fully-automated assays for PCT. Publications in languages other than English or French were included if they had a meaningful detailed abstract in English or French. Thirty-three records from the literature search were identified: 8 FDA 510(k) approval documents (40–47) and 25 research papers (48–72). Details of each study are summarized in Supplemental Table 1. The correlation studies reported in FDA 510(k) approval documents were performed according to CLSI EP09-A3 “Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples”. Most of the research papers did not refer to any specific guidelines for method comparison and bias evaluation. All the studies performed at least one regression

analysis between results from two immunoassays. However, they didn't all estimate and discuss the bias of measurement between the PCT immunoassays apart from determining the slope of the regression analysis and the agreement of classification at clinical concentrations. As these criteria are crucial to depict the current state of the art of the correlation and agreement of classification between PCT assay methods, they were evaluated and will be discussed below.

1. Evaluation of the regression analysis between two assays

In all studies included in this evaluation, a regression plot analysis was established to evaluate the correlation between two immunoassays. The ideal situation corresponds to a plot where all points are situated on the identity line y = x, indicating a perfect correlation between the two assays. Most of the published studies employed Passing-Bablok or Deming regression analysis (Supplemental Table 1). The majority of published studies reported a good correlation between the different PCT assays according to the correlation coefficient, which was above 0.85 (Supplemental Table 1). However, the degree of correlation between the two assays depends on the number of samples, and the concentration range as the correlation coefficient will tend to be higher if the concentration range is broad (73). The correlation coefficient informs about the degree of dispersion of measurement results but not on the agreement of results. Therefore, it is preferable to use bias as an estimator of agreement. The bias can be subdivided into proportional and constant bias, and these two components can respectively be evaluated via the slope and the intercept of the regression analysis (74). Proportional bias is often due to calibration differences between assays. Like FDA 510(k) method comparison, the Brahms Kryptor and Vidas Brahms assays were predominantly employed as the comparative assay across the different studies (Supplemental Table 1). The evaluation of the slope, focused on studies using these two assays as a comparative method, shows a smaller proportional bias in the FDA 510(k) approval documents (Figure 1A) than in the published research papers (Figures 1B and 1C). In data from the FDA approval documents, the deviation from a slope of 1 was less than ± 6%, whereas it rises to ± 69% in some research papers. This observation could be explained by the fact that the experimental conditions strictly followed the technical protocol of FDA 510(k) approval documents, whereas, in other studies, different technical conditions (i.e., reagents, instruments, interfering sample) could be employed.

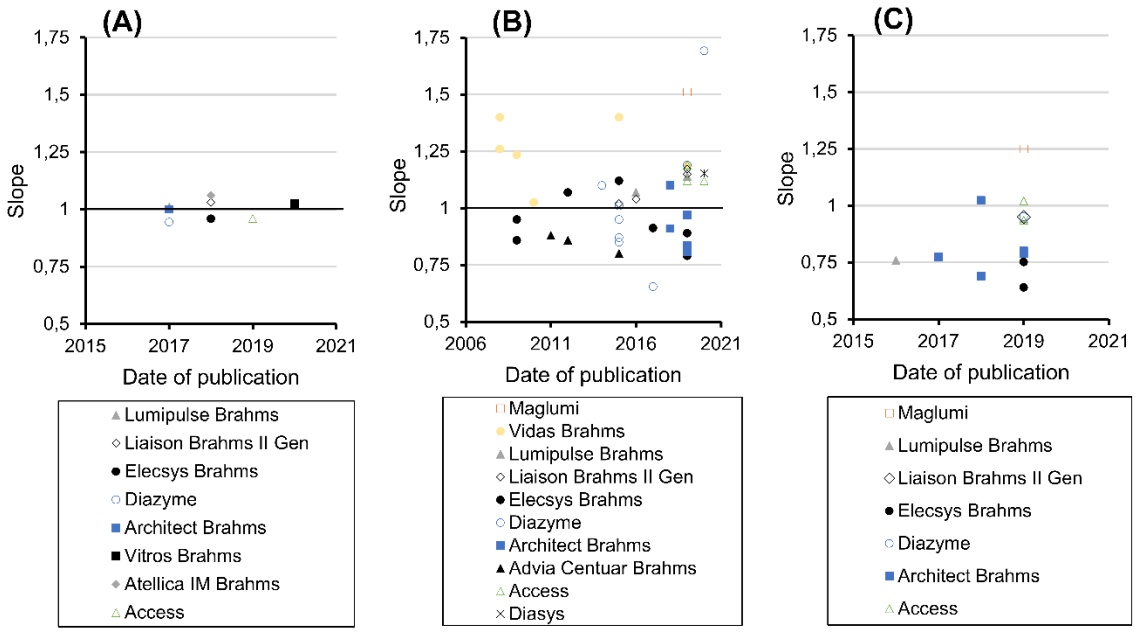


Figure 1. Slopes of regression analyses between two PCT assays from FDA 510(k) approval documents and research documents across time. a) Brahms Kryptor (solid form) and Vidas Brahms (clear form) assay as comparative assay from FDA 510(K) approval documents. b) Brahms Kryptor assay as comparative assay from research documents. c) Vidas Brahms assay as comparative assay from research documents.

Slope (a) was obtained from the correlation relationship y = a*x + y established between the results measured on respective test assay as variable y and the results measured on comparative assay as variable x.

The slopes of correlations between the Brahms Kryptor assay and other assays are presented in Figure 1B. The proportional bias from the identity line was generally lower than ± 25%. One can observe that PCT results provided by the Vidas Brahms, Access, Liaison Brahms, and Lumipulse Brahms assays were consistently higher than those from the Brahms Kryptor assay, whereas results provided by the Advia Brahms assay were consistently lower. The constant positive bias of the Vidas Brahms compared to the Brahms Kryptor (>25%) was also confirmed by manufacturer's data, in which a proportional error of up to 22% was reported (75).

Fewer studies used the Vidas Brahms assay as the comparative method (Figure 1C). A negative proportional bias was observed for almost all assays, with a tendency to exceed -20%. The recently developed Maglumi assay, presenting a positive bias >25%

compared to the Brahms Kryptor assay and the Vidas Brahms assay, was included in only one study, making difficult to dicsern a trend. Additionally, the evaluation of regression analysis studies employing assays other than Kryptor Brahms or Vidas Brahms as a comparative method is presented in Supplemental Table 1. A proportional bias of up to 79% was reported when comparing the Liaison Brahms assay to the Elecsys Brahms (on Cobas) or Architect Brahms assay (58). Overall, the data presented revealed a noticeable proportional bias between some assays but observations were variable between studies. The slope is a useful estimate of the discrepancies between measurement results, provided that the constant bias is negligible. However, most of the published studies did not demonstrate that the intercept was negligible. An intercept different from zero indicates that measurement results obtained from one assay are consistently higher or lower than the one measured on the other assay. Therefore, the slope alone could not be enough as a suitable indicator of agreement. Moreover, depending on the regression analysis model used in each study, Passing Bablok or Deming linear regression analysis, the slope and intercept values can differ (46). Thus, further evaluation of bias is needed to confirm the previous observations.

2. Bias of measurement results according to Bland - Altman plot analysis

Across selected studies, the bias of measurement results was generally evaluated using Bland - Altman analysis. In this section, we then limited our investigation to published studies based on this approach (Table 1). The different studies reported mean biases, expressed as relative (percentage) or absolute values (concentration), between two immunoassays over a specified concentration range. However, the reported biases may vary depending on the concentration range which differ from one studies to another one. Indeed, Dipalo *et al.* reported three different mean biases (2.7 µg/L, 11.6 µg/L, 0.6 µg/L) between the Vidas Brahms and Brahms Kryptor at concentration range 0.1-58.7 µg/L, 10.0-58.7 µg/L, and 0.1-10.0 µg/L, respectively (65). This raises the difficulty to compare all studies together, a comparison of bias through different correlation studies over time for a given immunoassay should be carefully interpreted because study designs could substantially differ.

Table 1. Reported mean bias between assays

Date	Study	Test assay	Comparative assay	Mean bias (µg/L or %)	Concentration range (µg/L)	
					Min	Max
2017	FDA K172713 (42)	Lumipulse Brahms	Brahms Kryptor	0.185 µg/L	0.02	50
2010	Schuetz et al (68)	Vidas Brahms	Brahms Kryptor	17.10%	0.05*	100*
2010	Hausfater et al (64)	Vidas Brahms	Brahms Kryptor	0.108 µg/L	0.02	71.96
				0.026 µg/L	0.05	4
2011	Sanders et al (51)	Advia Brahms	Brahms Kryptor	-0.567 µg/L	0.03	45.7
				-0.05 µg/L	0	2
2012	Lloyd et Kuyl (52)	Advia Brahms	Brahms Kryptor	0.75µg/L	0.04	46.07
		Elecsys Brahms	Brahms Kryptor	0.08µg/L	0.04	46.07
2014	Dipalo et al (53)	Diazyme (Beckman)	Brahms Kryptor	0.48 µg/L	0.16	111
2015	Dipalo et al (65)	Liaison Brahms	Brahms Kryptor	0.38 µg/L	0.1	58.7
				2.7 µg/L	0.1	58.7
		Vidas Brahms	Brahms Kryptor	11.6 µg/L	10	58.7
				0.6 µg/L	0.1	10
		Elecsys Brahms	Brahms Kryptor	0.4 µg/L	0.1	58.7
		Advia Brahms	Brahms Kryptor	-1.02 µg/L	0.1	58.7
		Diazyme (Architect)	Brahms Kryptor	-0.51 µg/L	0.1	58.7
		Diazyme (Advia)	Brahms Kryptor	-0.13 µg/L	0.1	58.7
		Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor	-1.01 µg/L	0.1	58.7
		Diazyme (AU5800)	Brahms Kryptor	-0.87 µg/L	0.1	58.7
2016	Du puy et al (54)	Lumipulse Brahms	Brahms Kryptor	0.42µg/L	0.12	50
				0.02 µg/L	0.12	1
2016	Fortunato (55)	Liaison Brahms	Brahms Kryptor	33.3%	0.02*	100*
2016	Ruzzenente et al (67)	Lumipulse Brahms	Vidas Brahms	-3.03 µg/L	0.006	75.5
				-0.49 µg/L	0	10
2017	Lueng et al (66)	Architect Brahms	Vidas Brahms	-0.5µg/L	0.05	24

			Elecsys Brahms	-0.1 µg/L	0.05	24
2018	Mouatani et al (59)	Architect Brahms	Brahms Kryptor	0.572 µg/L	1	25
				0.075 µg/L	0.03	1
2018	Soh et al (69)	Architect Brahms	Elecsys Brahms	-0.8µg/L	0.02	100
			Liaison Brahms	-2.3 µg/L	0.02	100
			Vidas Brahms	-2.5 µg/L	0.02	100
			Brahms Kryptor	-0.6 µg/L	0.02	100
2019	Wang et al (70)	Architect Brahms	Vidas Brahms	-0.097 µg/L	0.1	2
2019	Lippi et al (71)	Access (Access)	Brahms Kryptor	3.8%	1*	100*
		Access (DXI)	Brahms Kryptor	2.4%	1*	100*
		Lumipulse Brahms	Brahms Kryptor	13.6%	1*	100*
		Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor	24.9%	1*	100*
		Elecsys Brahms	Brahms Kryptor	-14.9%	1*	100*
		Vidas Brahms	Brahms Kryptor	0.2%	1*	100*
		Liaison Brahms	Brahms Kryptor	7.2%	1*	100*
		Maglumi	Brahms Kryptor	23.7%	1*	100*
		Architect Brahms	Brahms Kryptor	-7.2%	1*	100*
2019	Katz et al (72)	Elecsys Brahms	Vidas Brahms	-0.13 µg/L	0	2
2020	Lippi et al. (57)	Access	Brahms Kryptor	3.20%	0.02	84
2020	Dupuy et al. (63)	Diasys (Cobas)	Brahms Kryptor	1.37 µg/L	0.02	50
		Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor	4.69 µg/L	0.02	50

(*) values reported from Bland and Altman plot

Overall, one can observe that bias reported were consistently higher when comparing the Lumipulse Brahms, Vidas Brahms, Liaison Brahms, Access, Maglumi assays to the Brahms Kryptor assay. As observed for the slope, a positive bias for the Vidas Brahms assay, higher than other assays, was reported (64–72). However, this bias seems to be variable accross study and time, as observed in the study from Lippi *et al.*, where the mean bias between the Vidas Brahms and Brahms Kryptor assays was only 0.2%. In addition to direct impact on patient results, a substantial bias (positive or negative) for a given immunoassay could be propagated and perpetuated over time if new PCT assays

use this immunoassay (e.g. Vidas Brahms) as predicate device for the approval process (FDA or CE marked). In a comparison study performed between the Liaison Brahms assay (FDA approved assays using Vidas Brahms assay) and two FDA approved assays using the Brahms Kryptor as predicate device (Elecsys Brahms and Architect Brahms assay), Eidizadeh *et al.* reported a positive mean bias of 40% between the Liaison Brahms assay and both the Elecsys Brahms and Architect Brahms assays. In contrast, the Elecsys Brahms assay did not exhibit any significant bias against the Architect Brahms assay (58). Other studies also showed the same positive bias trend for the Liaison Brahm assay (55,65,69,71).

A comparison study of Lippi *et al.* based on PCT results of the same set of 176 frozen plasma samples measured on 10 PCT assays depict the best recent overview on PCT assay correlation. A bias of at least 10% was reported in 28 of 45 pairwise comparisons. Among them, the Diazyme and Maglumi assays reported the highest bias compared to other assays (up to 24.9% compared to the Brahms Kryptor (Table 1) and up to 38.6% compared to the Elecsys Brahms assay (71). Moreover, a bias of more than ± 20% was unexpectedly observed between assays belonging to the Brahms PCT group (i.e., -28.2% between Elecsys Brahms (on Cobas) and Lumipulse Brahms, -20.8% between Architect Brahms and Lumipulse Brahms, 22% between Liaison Brahms and Elecsys Brahms (on Cobas)).

Overall, most of the studies reported that substantial bias between assays exist and thus shows that harmonization between all assays is not optimal. However, it is difficult to appreciate a bias reported for a whole concentration range, the real deviation of results obtained between assays at a single point concentration can not be retrieved. Therefore, bias between assays does not bring any information on clinical interpretation of the results. Most of the studies in which a significant bias was reported also conducted an analysis of the clinical concordance at clinical cut-off concentrations. With the objective to estimate the impact of bias on clinical decisions, we then analyzed results from studies having evaluated the agreement of classification.

3. Agreement of classification at clinical cut-off concentrations

The correct classification of patients is highly improtant to improve patient management and facilitate the elaboration of clinical guidelines. Therefore, agreement at different clinical cut-off concentrations was retrieved from published studies to evaluate the influence of results variability on data interpretation (Supplemental Table 2). This resulted in 327 reported agreement values. Among these, 295 (90%) were equal to or better than 90%. An agreement below 90% was particularly reported at low

concentrations (0.25 µg/L and 0.5 µg/L), especially when the Diazyme assay was compared to other PCT assays. Despite the satisfactory clinical concordance outlined by correlation studies, the bias in the lower concentration range could lead to patient misclassification and inappropriate antibiotic monitoring when changing from one immunoassay to another when using the same clinical cut-offs. This may impact LRTI patient management, whose clinical cut-off concentrations are much lower than those of sepsis (i.e., 0.1, 0.25, 0.5 µg/L). However, it is difficult to evaluate the consistency between studies because the agreement between assays is highly dependant on the distribution of PCT concentration. Indeed, a better agreement is expected to be obtained when target concentrations are far from the clinical cut-off (i.e. 0.5, 2,0, 10 µg/L). Although a significant bias was observed in some studies, the evaluation of classification agreement seems to indicate that differences in measurement results have a moderate impact on medical decision-making (65,71). However, according to the authors, differences between assays remain noticeable, and “longitudinal patient monitoring should preferably always be carried out using the same immunoassay” (65).

III. External quality assessment schemes

Data from 143 surveys carried out from 2014 to 2020 were supplied by ten external quality assessment scheme (EQAS) providers from eight different countries: ANSM in France, CSCQ in Switzerland, Equalis in Sweden, Instand in Germany, Labquality in Finland, ProBioQual in France, RCPAQAP in Australia, RfB in Germany, SKML in The Netherlands and Weqas in the UK. Data from surveys with less than 10 participants and materials in which PCT concentration was lower than 0.05 µg/L were excluded from this study to enable sufficiently robust data analysis. Overall, the present study includes 137 surveys with approximately 2220 routine laboratory participants (Supplemental Table 3-4). About 27559 PCT measurements were performed on samples with concentrations ranging from 0.05 µg/L to 43.66 µg/L (median 2.07 µg/L). Different types of serum-based materials were used within the different EQA surveys: fresh pools without spiking with exogenous PCT for Instand, frozen without spiking with exogenous PCT for Equalis, frozen with spiking with exogenous PCT for Weqas, lyophilized without spiking with exogenous PCT for RCPAQAP, and SKML, lyophilized with spiking with exogenous PCT for ANSM, CSCQ, Labquality, ProBioQual, and RfB.

As estimator of the harmonization level of PCT measurements, we calculated the interlaboratory coefficient of variation (CV) of results provided by all participants of a given survey. Figure 2 shows the interlaboratory CV of all 137 surveys as a function of the consensus mean concentration of PCT. The mean interlaboratory CV of all surveys was 15.6%. Such a high mean interlaboratory CV suggests that the harmonization of

PCT results is not optimal and confirms correlation studies observations. It should be noticed that the interlaboratory CVs were very heterogeneous across the different surveys. In some surveys, the interlaboratory CV was in the 5-10% range, reflecting a good harmonization level. But in other surveys, the interlaboratory CV exceeded 25%, reflecting a poor harmonization level. These discrepancies could be explained by the fact that the EQA programs relyed on materials with different PCT concentrations and different types of matrices (fresh, frozen, lyophilized, spiked with recombinant PCT or not), potentially resulting in differences in commutability of the EQA materials. Additionally, the representation of some assays substantially varied across the different EQAS, implying that each peer group's relative weight was not the same in all surveys. Therefore, we investigated the effect of these different parameters on the observed variability of the PCT measurement results.

1. Influence of the target concentrations

Two different ranges of PCT concentrations were considered: below and above 10 µg/L. In Figure 2, one can notice that the dispersion of the interlaboratory CV estimates was greater for PCT concentrations lower than 10 µg/L. Although the mean interlaboratory CV (15.0% below 10 µg/L versus 18.8% above 10 µg/L) was not statistically different in these two concentration ranges (95%, Student t coefficient = -1.7869, P-value = 0.0761), estimates of the interlaboratory CV were twice more scattered for PCT concentrations below 10µg/L (SD=9.4%) than for PCT concentrations above 10µg/L (SD=4.5%). This could indicate a potential impact of the target concentration on the variability of PCT measurement results. However, the number of EQA surveys targetting PCT concentrations below 10 µg/L (117 surveys, 19 947 measurements results) was much larger than those and above 10 µg/L (20 surveys, 8347 measurements results), with a reduced number of surveys for some materials. Also, only some matrices were used at high PCT concentration (fresh non-spiked, lyophilized with or without spiking) with relatively good consistency between values of the interlaboratory CV. In contrast, all EQA materials were covered at low concentrations, and values of the interlaboratory CV were more scattered. This raises the question of the potential impact of the matrix of EQA materials and their commutability on the interlaboratory CV. As far as we know, the commutability of EQA materials was not evaluated. A study demonstrated that non-commutable material could generate matrix effects that differ across the different assays for HbA_{1c} and results in biased estimates of the agreement between the different assays (76). In this study, a better agreement between the different HbA_{1c} assays was observed when fresh samples were used: when processed EQA materials of lower commutability were used, a lower consistency between the different assays was observed (77).

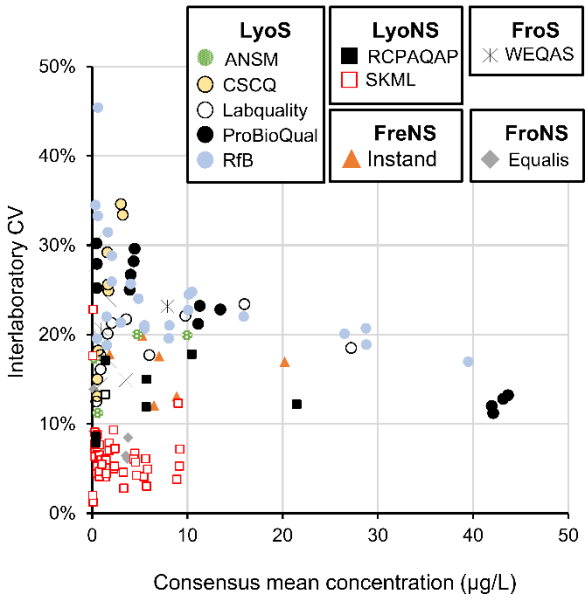


Figure 2. Interlaboratory CV obtained from the 137 EQAS on PCT carried out from 2014 to 2020 by 10 EQA providers from 7 European countries and Australia.

Consensus mean concentration represents the mean of results obtained from all immunoassay methods included in each survey. Five types of serum-based EQA materials were studied: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT (FreNS), frozen without spiking with exogenous PCT (FroNS), frozen with spiking with exogenous PCT (FroS), lyophilized without spiking with exogenous PCT (LyoNS) and lyophilized with spiking with exogenous PCT (LyoS).

2. Influence of EQA materials matrix

To evaluate the impact of the EQA material matrix on the interlaboratory CV, different groups of material matrices were distinguished: spiked vs. non-spiked materials, fresh vs. frozen vs. lyophilized materials. Spiked materials were associated with the highest mean interlaboratory CV, either with frozen materials (21.0%, 10 surveys, 13 participants on average) or lyophilized materials (22.4%, 60 surveys with 406 participants on average). In comparison, the mean interlaboratory CV was only 8.1% in surveys relying on frozen non-spiked materials (8 surveys, 47 participants on average) and 7.5% for surveys relying on lyophilized non-spiked materials (52 surveys, 26 participants on average). Surprisingly, the interlaboratory CV was unexpectedly high in surveys that used fresh non-spiked materials (17.6%, 7 surveys with 193 participants on average) compared with the other non-spiked materials (frozen and lyophilized). As fresh non-spiked materials can be considered as the closest matrix to fresh single donations (that are commutable by definition), fresh non-spiked materials were

expected to be associated with the highest commutability level and, therefore, minimizing matrix effects that could potentially increase the interlaboratory CV. An hypothesis explaining the relatively large interlaboratory CV in surveys using fresh non-spiked materials could be the limited stability. However, the stability and the homogeneity of the fresh non-spiked materials was evaluated and demonstrated according to ISO 17043 requirements. As fresh non-spiked materials were obtained by mixing single donations with very low and very high PCT concentrations, it could be hypothesized that this strategy may compromise the commutability of the pools because of an atypical behaviour or different composition of samples from seriously ill patients. Unfortunately, no EQAS relying on fresh single donations was available in our study to evaluate the effect of pooling. Overall, the organization of studies relying on fresh materials is challenging, both from an ethical and technical point of view. It remains challenging to obtain such samples in sufficient amounts, circulate these to all EQA participants and get materials tested in a sufficiently short delay to maintain stability.

Table 2. Data detailing mean interlaboratory CV per EQA material matrix calculated with all assays and mean intra-peer group CV per EQA material matrix calculated from survey with more than 20 participants per peer-group

Assay	**EQA provider**	**EQA material**	**Number of surveys**	**Laboratory participants Mean (median)**	**Mean CV (*)**	
					Mean (%)	SD (%)
All assays	Instand	FreNS	7	193 (211)	17.6	4.5
All assays	Equalis	FroNS	8	47 (47)	8.1	2.6
All assays	RCPAQAP, SKML	LyoNS	52	26 (24)	7.5	4.3
All assays	ANSM, CSCQ, Labquality, ProBioQual, RfB	LyoS	60	406 (451)	22.4	6.5
All assays	Weqas	FroS	10	13 (15)	21.0	5.3
Elecsys Brahms	ANSM, CSCQ, ProBioQual, RfB	LyoS	50	159 (161)	6.4	4.1
	Equalis	FroNS	8	38 (38)	6.5	1.8
	Instand	FreNS	7	48 (52)	12.0	6.7

Vidas Brahms	ANSM, CSCQ, ProBioQual, RfB	LyoS	50	136 (86)	8.1	3.6
	Instand	FreNS	6	28 (26)	12.4	3.5
Brahms Kryptor	ANSM, ProBioQual, RfB	LyoS	42	48 (43)	6.5	2.8
	Instand	FreNS	7	65 (69)	11.5	4.9
Architect Brahms	ProBioQual	LyoS	14	58 (54)	5.1	0.6
Advia/Atellica Brahms	ANSM, ProBioQual	LyoS	18	58 (55)	5.6	2.3
Diazyme	RfB	LyoS	18	33 (34)	24.9	20.7
	Instand	FreNS	2	24 (24)	15.0	3.3
Radiometer	ProBioQual	LyoS	14	23 (23)	3.8	1.1

(*): Mean CV indicates mean interlaboratory CV if all assays were employed, otherwise mean intra peer group CV if only one assay was used.

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT

FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT

FroS: frozen with spiking with exogenous PCT

LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

3. Influence of immunoassay peer-groups used by participants

To evaluate to what extent the results scattering within each peer group contributes to the global interlaboratory CV for a given matrix, we calculated the intra-peer group CV, which corresponds to the interlaboratory CV of results obtained from participants using the same analytical platform in each survey. We then calculated the mean intra-peer group CV that corresponds to the average of the different intra-peer group CV across all surveys using materials with the same type of matrix. It was decided to limit this analysis to surveys with more than 20 participants per peer-group to get a sufficiently robust estimate of intra-peer group CV. As presented in Table 2, Supplemental Figure 1, and detailed in Supplemental Table 5-11, only the following peer groups were

considered: Elecsys Brahms (on Cobas or Elecsys), Vidas Brahms, Brahms Kryptor, Architect Brahms, Advia/Atellica Brahms, Radiometer, and Diazyme. When fresh non-spiked materials were measured on the Elecsys Brahms, Vidas Brahms, and Brahms Kryptor assays, a remarkably higher mean intra-peer group CV was observed (12.0%, 12.4%, and 11.5%, respectively) than for spiked lyophilized materials (6.4%, 8.1%, and 6.5%, respectively). It thus appears that when fresh non-spiked materials were used, the large interlaboratory CV that was observed could largely be explained by an important variability of results within each peer group more than differences between the different peer groups. In this specific case, the large interlaboratory CV was not due to a lack of agreement between the different immunoassays but rather by within peer group imprecision. The same observation was made for frozen non-spiked materials. Although the interlaboratory CV was lower than for fresh non-spiked materials (8.1% against 17.6%), the mean intra-peer group CV was 6.5% for frozen non-spiked materials and accounted for a substantial fraction of the interlaboratory CV. It should still be noticed that in surveys relying on frozen non-spiked materials, the relative weight of the Roche peer group was much larger than in EQAS relying on other types of matrices. As a result of the high representation of one peer group, differences between peer-groups only contributed in a limited manner to the global scatter because the mean intra-peer group CV of the Elecsys Brahms peer group (6.5%) accounted for a large fraction of the interlaboratory CV (8.1%, all surveys relying on frozen non-spiked materials together). Contrary to EQAS relying on non-spiked materials (fresh and frozen), the main contribution to the global interlaboratory CV wasn't the intra-peer group imprecision as in surveys relying on lyophilized spiked materials. The intra-peer group CV for lyophilized spiked materials ranged from 3.8% to 8.1% for all assays, except for Diazyme assay, for which a mean intra-peer group CV of 24.9% was reported. These results show that the variability within each peer group only partially explains the mean interlaboratory CV for lyophilized spiked materials (22.4%). In this case, the main contribution to this high variability is caused by significant discrepancies between the peer-groups' measurement results. Indeed, results obtained from Vidas Brahms peer groups was consistently higher than other peer groups (+10% compared to Radiometer, up to +37% compared to Elecsys Brahms and up to +60% compared to Brahms Kryptor). These results are in concordance with the observation from the correlation studies. Interestingly, a difference of more than 50% was observed in EQAS carried out by ProBioQual between the Brahms Kryptor peer group compared to other Brahms assays (Elecsys Brahms, Advia Brahms, Architect Brahms). Still, the differences between assays could be due to an actual bias and/or matrix effects caused by EQA materials without the possibility to discriminate these two causes. It should be noted that none of the EQA providers in the study have claims for, nor were they anticipated to have, full commutability across all platforms. Therefore, the involved EQAS were not expected to provide information on the harmonization level but rather to

compare results from an individual laboratory with its peers. In an attempt to get information on EQA material commutability without conducting a formal commutability study, the peer group consensus mean of results provided by the most popular immunoassays was compared with the all-laboratory trimmed mean (ALTM) (See Supplemental Figure 2), but this approach showed different limitations. First, only 5 of the 10 involved EQA providers had a sufficiently large number of participants to generate robust data (>20 participants per peer group). To evaluate results harmonization, materials commutability should be evaluated for all major assays but here, only two to six peer groups could be included per EQA survey. Second, using EQAS in which peer groups were large enough, only two types of matrices could be represented (fresh non-spiked and lyophilized with spiking), so it was not possible to evaluate the impact of lyophilization and spiking on materials commutability. Last but not least, the market share of PCT assays greatly varies across the different countries so the deviation of a given peer group against the ALTM will depend on the relative weight of this peer group. In the end, it was only possible to get insights into the batch-to-batch variations in the commutability of EQA materials from a given EQA provider but not to compare different types of EQA materials from different EQA providers. Despite the differences in sample matrix and relative weight of the different peer groups, results show a consistent pattern of assays providing results below the ALTM or above the ALTM.

IV. Discussion and conclusion

Both published correlation studies and EQA results indicate substantial differences between results provided by the different commercially available assays for PCT. However, both strategies have limitations that make it difficult to properly evaluate the true current state-of-the-art in harmonization. In correlation studies and EQA programs, a clear identification of the involved assays was made difficult by the co-existance of multiple combinations of analyzers, reagent lots and calibrators lots. In EQAS, this compromises the possibility of identifying what combination was used and correctly classifying assays in well-defined peer groups and may contribute to the results dispersion even within a given peer group. In correlation studies, important differences in methodology were observed, such as the number of samples, material matrix, concentration range and description of assays. A more comprehensive description of assay characteristics appears desirable in both cases, and no information on the commutability of sample was available. Only a few correlation studies used fresh single donation samples (52,53,64) and no EQAS was performed using this kind of material, most likely due to the difficulty of obtaining these materials in a sufficient amount and circulating them within a few days. Besides, no supplementary information was supplied

regarding the nature and origin of recombinant PCT used to prepare spiked materials in EQA programs. Therefore, the causes for differences in PCT results are difficult to evaluate, and the need for improving the harmonization of PCT measurements is difficult to establish. Our study highlights the need for commutable EQA materials to properly evaluate comparability of results and conduct appropriate post-market vigilance.

Important work remains to be done to document and understand the variability of results provided by the different PCT assays. The result's deviation between assays can be due to the use of different calibrators and/or different antibodies (71). It might also be caused by the non-commutability of calibrators that are used in the metrological traceability chain. ISO 17511:2020 on metrological traceability in laboratory medicine stresses the need for calibrators used in the traceability chain to be commutable (78), but, difficulties remain to fulfill this requirement in practice. Provided that differences between assays are indeed due to calibration-related issues rather than specificity issues, consistency of results may be improved using of EP09-A3 for value assignment of working calibrators. Another alternative would consist of standardizing calibration through Certified Reference Materials or panels of patient samples value assigned with a reference method. Although a large fraction of commercially available immunoassays provides results that are traceable to the Brahms Kryptor assay, substantial differences between these assays have been reported in both EQA schemes and correlation studies, and even larger differences were reported with other assays. Therefore, several published correlation studies suggest that common reference calibration materials should be developed to improve agreement between PCT assays (53,58,65,69,71,79). Without improving the current state of harmonization, the lack of comparability could be further accentuated by the arrival of new and non-harmonized assays like POCT, that are increasingly used in emergency department settings. Overall, the significant variability of measurement results and the suboptimal clinical concordance for some assays supports that global harmonization of different assays is needed. However, our study underlines the urgent need for commutable control materials to properly assess the comparability of results and the necessity to further improve harmonization of PCT results. To fill this gap, the IFCC woking group on standardization of PCT assays initiated the production of commutable reference standards with the objective to evaluate the necessity and the feasibility to standardize calibration of all PCT assays.

Acknowledgments:

The authors thank Prof Klaus-Peter Hunfeld from Instand, Carolina Kristoffersson from Equalis, Mary Annette Thomas from Weqas, Ron Meijer from SKML, Peter Graham from RCPAQAP, Pierre-Alain Morandi from CSCQ and Jean-Christophe Eynard and Laurence Chardon from ProBioQual for sharing and participating in EQA data analysis. The authors thank all members of the IFCC working group on PCT for scientific discussions.

Funding:

This work was supported by the European Metrology Programme for Innovation and Research (EMPIR) joint research projects [15HLT07] “AntiMicroResist” and [18HLT03] “SEPTIMET” which have received funding from the EMPIR programme co-financed by the Participating States and the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme. Huu-Hien Huynh was supported by a CIFRE scholarship provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie).

References

1. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet. 2020;395:200–11.
2. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. N Engl J Med. 2017;377:414–7.
3. Knoop ST, Skrede S, Langeland N, Flaatten HK. Epidemiology and impact on all-cause mortality of sepsis in Norwegian hospitals: A national retrospective study. PloS One. 2017;12:e0187990.
4. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, Wheeler D, Jaramillo-Bustamante JC, Salloo A, et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. Am J Respir Crit Care Med. 2015;191:1147–57.
5. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. N Engl J Med. 2017;376:2235–44.
6. Nee PA. Critical care in the emergency department: severe sepsis and septic shock. Emerg Med J. 2006;23:713–7.
7. Torio CM, Moore BJ. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief. Agency Healthc. Res. Qual. 2016. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368492/ (Accessed Mar 2020)
8. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med. 2006;34:1589–96.
9. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, González-Díaz G, Garnacho-Montero J, et al. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. JAMA. 2008;299:2294–303.
10. Kiers HD, Griesdale DEG, Litchfield A, Reynolds S, Gibney RTN, Chittock D, et al. Effect of early achievement of physiologic resuscitation goals in septic patients admitted from the ward on the kidneys. J Crit Care. 2010;25:563–9.
11. Schuetz P, Balk R, Briel M, Kutz A, Christ-Crain M, Stolz D, et al. Economic evaluation of procalcitonin-guided antibiotic therapy in acute respiratory infections: a US health system perspective. Clin Chem Lab Med. 2015;53:583–92.
12. Mewes JC, Pulia MS, Mansour MK, Broyles MR, Nguyen HB, Steuten LM. The cost impact of PCT-guided antibiotic stewardship versus usual care for hospitalised patients with suspected sepsis or lower respiratory tract infections in the US: A health economic model analysis. PLOS ONE. 2019;14:e0214222.
13. Vijayan AL, Vanimaya, Ravindran S, Saikant R, Lakshmi S, Kartik R, et al. Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. J Intensive Care. 2017;5:51.
14. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. J Lab Clin Med. 1999;134:49–55.
15. Müller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. Swiss Med Wkly. 2001;131:595–602.
16. Jeong S, Park Y, Cho Y, Kim H-S. Diagnostic utilities of procalcitonin and C-reactive protein for the prediction of bacteremia determined by blood culture. Clin Chim Acta. 2012;413:1731–6.
17. Vincent J-L, Beumier M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:265–75.
18. Kim SJ, Hwang SO, Kim YW, Lee JH, Cha K-C. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis/septic shock in the emergency department; a study based on Sepsis-3 definition. Am J Emerg Med. 2019;37:272–6.
19. Wanner GA, Keel M, Steckholzer U, Beier W, Stocker R, Ertel W. Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients. Crit Care Med. 2000;28:950–7.
20. AlRawahi AN, AlHinai FA, Doig CJ, Ball CG, Dixon E, Xiao Z, et al. The prognostic value of serum procalcitonin measurements in critically injured patients: a systematic review. Crit Care. 2019;23:390.

21. Cabral L, Afreixo V, Almeida L, Paiva JA. The Use of Procalcitonin (PCT) for Diagnosis of Sepsis in Burn Patients: A Meta-Analysis. PloS One. 2016;11:e0168475.
22. Ren H, Li Y, Han C, Hu H. Serum procalcitonin as a diagnostic biomarker for sepsis in burned patients: a meta-analysis. Burns. 2015;41:502–9.
23. Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. J Cell Biochem. 2019;120:5852–9.
24. Sager R, Wirz Y, Amin D, Amin A, Hausfater P, Huber A, et al. Are admission procalcitonin levels universal mortality predictors across different medical emergency patient populations? Results from the multi-national, prospective, observational TRIAGE study. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1873–80.
25. Schuetz P, Birkhahn R, Sherwin R, Jones AE, Singer A, Kline JA, et al. Serial Procalcitonin Predicts Mortality in Severe Sepsis Patients: Results From the Multicenter Procalcitonin MOnitoring SEpsis (MOSES) Study. Crit Care Med. 2017;45:781–9.
26. Liu D, Su L, Han G, Yan P, Xie L. Prognostic Value of Procalcitonin in Adult Patients with Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE. 2015;10:e0129450.
27. Vouloumanou EK, Plessa E, Karageorgopoulos DE, Mantadakis E, Falagas ME. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med. 2011;37:747–62.
28. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. Cochrane database of systematic reviews. 2017;10:CD007498.
29. Schuetz P, Bretscher C, Bernasconi L, Mueller B. Overview of procalcitonin assays and procalcitonin-guided protocols for the management of patients with infections and sepsis. Expert Rev Mol Diagn. 2017;17:593–601.
30. Sager R, Kutz A, Mueller B, Schuetz P. Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited. BMC Med. 2017;15:15.
31. Bouadma L, Luyt C-E, Tubach F, Cracco C, Alvarez A, Schwebel C, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. Lancet. 2010;375:463–74.
32. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. Lancet Infect Dis. 2016;16:819–27.
33. Bloos F, Trips E, Nierhaus A, Briegel J, Heyland DK, Jaschinski U, et al. Effect of Sodium Selenite Administration and Procalcitonin-Guided Therapy on Mortality in Patients With Severe Sepsis or Septic Shock: A Randomized Clinical Trial. JAMA Intern Med. 2016;176:1266–76.
34. Vesper HW, Myers GL, Miller WG. Current practices and challenges in the standardization and harmonization of clinical laboratory tests. Am J Clin Nutr. 2016;104 Suppl 3:907S-12S.
35. Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, Ferrer R, Gavazzi G, Gluck EH, et al. Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use. Clin Chem Lab Med. 2019;57:1308–18.
36. Roche. Elecsys® BRAHMS Procalcitonin (PCT). https://diagnostics.roche.com/ch/fr/products/params/elecsys-brahms-procalcitonin-pct.html (Accessed Nov 2020)
37. National Institute for health and Care Excellence. Procalcitonin testing for diagnosing and monitoring sepsis (ADVIA Centaur BRAHMS PCT assay, BRAHMS PCT Sensitive Kryptor assay, Elecsys BRAHMS PCT assay, LIAISON BRAHMS PCT assay and VIDAS BRAHMS PCT assay)-2015. https://www.nice.org.uk/guidance/dg18 (Accessed Nov 2020)
38. Dipalo M, Guido L, Micca G, Pittalis S, Locatelli M, Motta A, et al. Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays. Pract Lab Med. 2015;2:22–8.
39. Ruzzenente O, Salvagno GL, Gelati M, Lippi G. Analytical evaluation of the novel Lumipulse G BRAHMS procalcitonin immunoassay. Pract Lab Med. 2016;6:8–13.
40. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K170652 Architect Brahms PCT. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K170652 (Accessed Jun 2020)

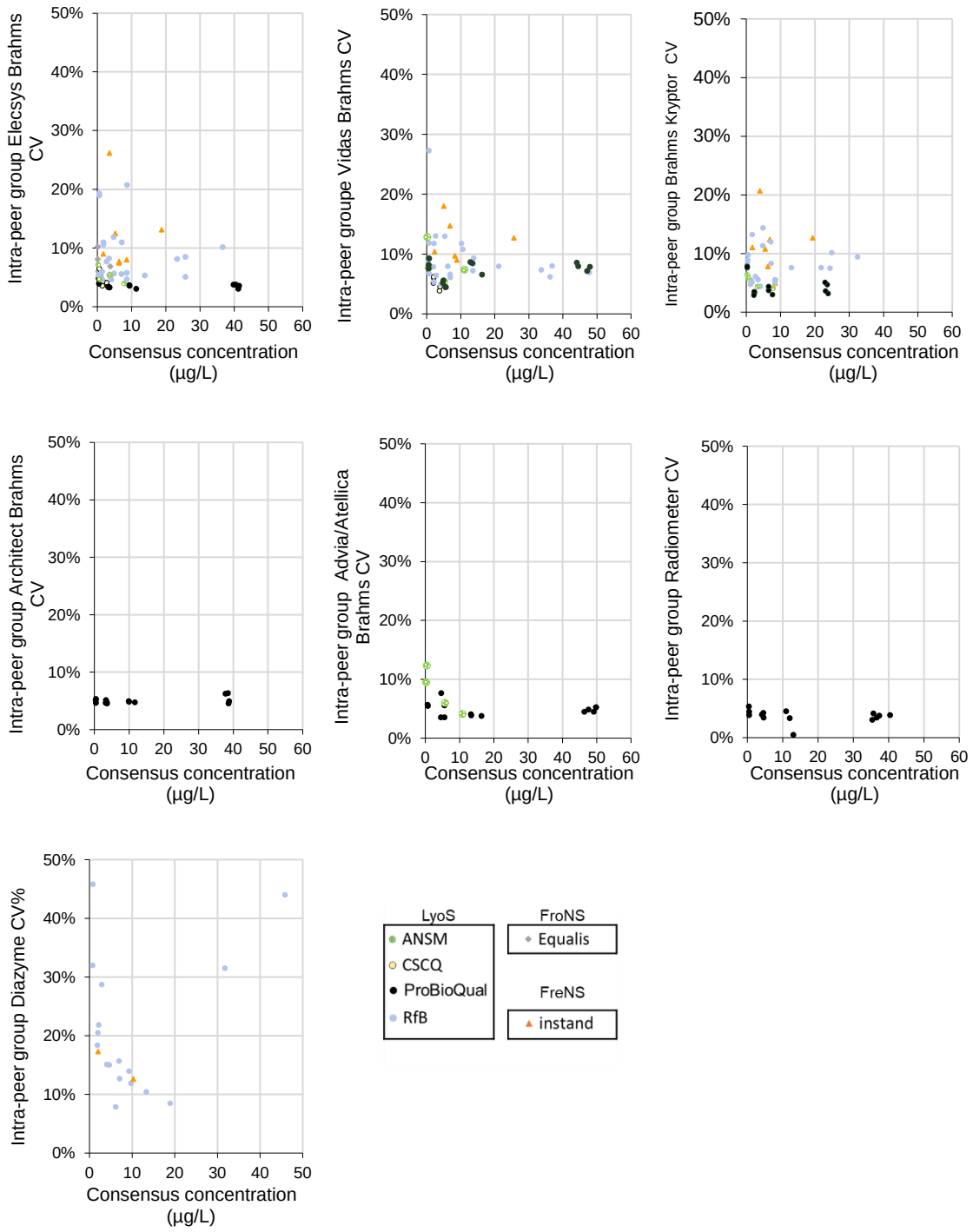
41. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K173683 Liaison Brahms PCT II Gen. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K173683 (Accessed Jun 2020)
42. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K172713 Lumipulse G Brahms PCT. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K172713 (Accessed Jun 2020)
43. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K173927 Elecsys Brahms PCT. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K173927 (Accessed Jun 2020)
44. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K181002 Atellica IM Brahms PCT. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K181002 (Accessed Jun 2020)
45. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K162297 Diazyme Procalcitonin Assay. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K162297 (Accessed Jun 2020)
46. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K200236 Vitros Brahms PCT. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K200236 (Accessed Jun 2020)
47. Food and Drug Administration. 510(k) Premarket Notification K192271 Access PCT. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/K192271.pdf (Accessed Nov 2020)
48. Lagabrielle J-F, Tachet A, Boin V. Dosage de la procalcitonine : comparaison des résultats obtenus sur Kryptor® (Brahms) et Vidas® (BioMérieux). Immuno-Anal Biol Spéc. 2008;23:245–50.
49. De Wolf HK, Gunnewiek JK, Berk Y, van den Ouweland J, de Metz M. Comparison of a New Procalcitonin Assay from Roche with the Established Method on the Brahms Kryptor. Clin Chem. 2009;55:1043–4.
50. Prieto B, Alvarez FV. Lack of transferability of results between procalcitonin assays. Clin Chem. 2009;55:2226–7.
51. Sanders R-J, Schoorl M, Dekker E, Snijders D, Boersma W, Boekel E. Evaluation of a new procalcitonin assay for the Siemens ADVIA Centaur with the established method on the B.R.A.H.M.S Kryptor. Clin Lab. 2011;57:415–20.
52. Lloyd MM, Kuyl JM. Comparison of three methods for procalcitonin analysis : peer reviewed original article. Med Technol SA. 2012;26:48–52.
53. Dipalo M, Buonocore R, Gnocchi C, Picanza A, Aloe R, Lippi G. Analytical evaluation of Diazyme procalcitonin (PCT) latex-enhanced immunoturbidimetric assay on Beckman Coulter AU5800. Clin Chem Lab Med. 2015;53:593–7.
54. Dupuy AM, Bargnoux AS, Andreeva A, Zins C, Kuster N, Badiou S, et al. Analytical performances of a novel point-of-care procalcitonin assay. Pract Lab Med. 2020;18:e00145.
55. Fortunato A. A new sensitive automated assay for procalcitonin detection: LIAISON® BRAHMS PCT® II GEN. Pract Lab Med. 2016;6:1–7.
56. Ceriotti F, Marino I, Motta A, Carobene A. Analytical evaluation of the performances of Diazyme and BRAHMS procalcitonin applied to Roche Cobas in comparison with BRAHMS PCT-sensitive Kryptor. Clin Chem Lab Med. 2017;56:162–9.
57. Lippi G, Salvagno GL, Gelati M, Pucci M, Demonte D, Faggian D, et al. Analytical Evaluation of the New Beckman Coulter Access Procalcitonin (PCT) Chemiluminescent Immunoassay. Diagnostics. 2020;10:128.
58. Eidizadeh A, Asif AR, von Ahsen N, Binder L, Schnelle M. Differences in procalcitonin measurements between three BRAHMS-partnered immunoassays (Liaison, Elecsys and Architect). Clin Chem Lab Med. 2019;57:e207–10.
59. Mouatani AE, Rotaru I, Beaudeux J-L, Hennequin C. Evaluation of procalcitonin assay on the Abbott Architect i2000 SR® analyzer. Ann Biol Clin (Paris). 2018;76:308–12.
60. Chambliss AB, Hayden J, Colby JM. Evaluation of procalcitonin immunoassay concordance near clinical decision points. Clin Chem Lab Med. 2019;57:1414–21.
61. Dipalo M, Gnocchi C, Avanzini P, Musa R, Di Pietro M, Aloe R. Comparison of Procalcitonin Assays on KRYPTOR and LIAISON® XL Analyzers. Diagn Basel Switz. 2019;9:94.
62. Gruzdys V, Cahoon K, Pearson L, Lehman CM. Method Verification Shows a Negative Bias between 2 Procalcitonin Methods at Medical Decision Concentrations. J Appl Lab Med. 2019;4:69–77.
63. Dupuy AM, Bargnoux AS, Larcher R, Merindol A, Masetto T, Badiou S, et al. Bioanalytical Performance of a New Particle-Enhanced Method for Measuring Procalcitonin. Diagnostics. 2020;10:461.
64. Hausfater P, Brochet C, Freund Y, Charles V, Bernard M. Procalcitonin measurement in routine emergency medicine practice: comparison between two immunoassays. Clin Chem Lab Med. 2010;48:501–4.

65. Dipalo M, Guido L, Micca G, Pittalis S, Locatelli M, Motta A, et al. Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays. Pract Lab Med. 2015;2:22–8.
66. Leung A, Hau CI, Lai RWM. Comparison of a New Automated Abbott Architect Procalcitonin Assay with Biomerieux Vidas and Roche Elecsys Methods. J Clin Lab Med. 2017;2:117–20.
67. Ruzzenente O, Salvagno GL, Gelati M, Lippi G. Analytical evaluation of the novel Lumipulse G BRAHMS procalcitonin immunoassay. Pract Lab Med. 2016;6:8–13.
68. Schuetz P, Christ-Crain M, Huber AR, Müller B. Long-term stability of procalcitonin in frozen samples and comparison of Kryptor and VIDAS automated immunoassays. Clin Biochem. 2010;43:341–4.
69. Soh A, Binder L, Clough M, Hernandez MH, Lefèvre G, Mostert K, et al. Comparison of the novel ARCHITECT procalcitonin assay with established procalcitonin assay systems. Pract Lab Med. 2018;12:e00110.
70. Wang D, Caddell B, Nolte FS, Babic N. Comparison of the Abbott Architect BRAHMS and the Biomérieux Vidas BRAHMS Procalcitonin Assays. J Appl Lab Med. 2019;3:580–6.
71. Lippi G, Salvagno GL, Pucci M, Lo Cascio C, Demonte D, Faggian D, et al. Two-center comparison of 10 fully-automated commercial procalcitonin (PCT) immunoassays. Clin Chem Lab Med. 2019;58:77–84.
72. Katz SE, Sartori LF, Szeles A, McHenry R, Stanford JE, Xu M, et al. Agreement Between Two Procalcitonin Assays in Hospitalized Children. Infect Dis Ther. 2019;8:463–8.
73. Stralen KJV, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW. Agreement between methods. Kidney Int. Elsevier; 2008;74:1116–20.
74. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. Biochem Medica. 2011;21:49–52.
75. Archive website Qrquivo.pt. Comparison with commercial procalcitonin assays - VIDAS® B·R·A·H·M·S PCT - bioMérieux Clinical Diagnostics. https://arquivo.pt/wayback/20080315114655/http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_47&pubparams.sform=1&lang=en (Accessed Oct 2020)
76. Delatour V, Clouet-Foraison N, Jaisson S, Kaiser P, Gillery P. Trueness assessment of HbA1c routine assays: are processed EQA materials up to the job? Clin Chem Lab Med. 2019;57:1623–31.
77. Delatour V, Clouet-Foraison N, Kaiser P, Gillery P. Beware of Noncommutability of External Quality Assessment Materials for Hemoglobin A1c. Clin Chem. 2020;66:390–1.
78. ISO. ISO 17511:2020 In vitro diagnostic medical devices - Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples . https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/99/69984.html (Accessed Oct 2020)
79. Wojtalewicz N, Schellenberg I, Hunfeld K-P. Evaluation of INSTAND e.V.'s external quality assessment for C-reactive protein and procalcitonin. PloS One. 2019;14:e0221426.

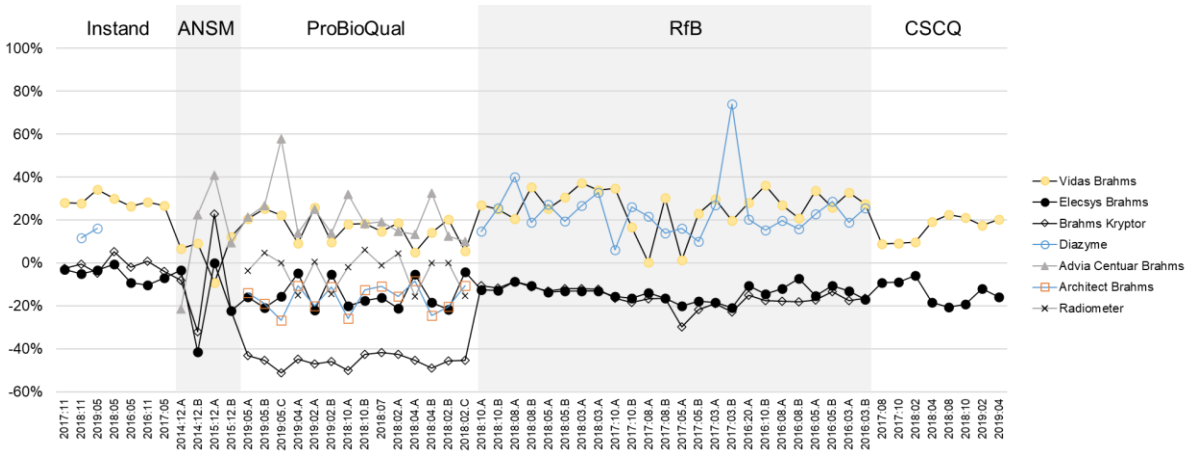
Harmonization status of procalcitonin measurements: what do correlation studies and EQA schemes tell us ?

Huu-Hien Huynh, Amandine Bœuf, Jens Pfannkuche, Philipp Schuetz, Marc Thelen, Gunnar Nordin, Eline van der Hagen, Patricia Kaiser, Dagmar Kesseler, Tony Badrick, Bernard Poggi, Ulla Tiikkainen, Gareth J Davies, Anja Kessler, Mario Plebani, Joëlle Vinh, Vincent Delatour

Supplemental information



Supplemental Figure 1. Intra-peer group CV (%) per immunoassay with peer groups of more than 20 participants par assay. Intra-peer group CV% represents the interlaboratory CV% for a given immunoassay type, supplied by EQA providers for each survey. Three types of serum-based EQA materials were studied: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT (FreNS), lyophilized without spiking with exogenous PCT (FroNS) and lyophilized with spiking with exogenous PCT (LyoS).



Supplemental Figure 2. Relative difference of the various immunoassays against ALTM for EQAS in which peer groups include at least 20 participants

Supplemental Table 1. Summarized data of FDA 510(k) approval document and published research papers

Date	Study	Test assay		Comparative assay		Sample		Regression analysis			
		Assay	Instrument	Assay	Instrument	Type	Quantity	Type	Slope	Intercept	Spearman's correlation
2017	FDA K170652	Architect Brahms	Architect i2000SR	Brahms Kryptor	Kryptor	Se	142	De	1.00	-0.020	0.990
2018	FDA K173683	Liaison Brahms	Liaison	Vidas Brahms	Vidas	Se, P	264	PB	1.03	0.060	n.a.
2017	FDA K172713	Lumipulse Brahms	Lumipulse G	Brahms Kryptor	Kryptor	n.a.	223	De	1.01	-0.003	0.985
2018	FDA K173927	Elecsys Brahms	Cobas e411	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro	2617	PB	0.96	-0.023	0.989
2018	FDA K181002	Atellica Brahms	Atellica IM	Brahms Kryptor	Kryptor	Se	522	PB	1.06	-0.040	0.980
2017	FDA K162297	Diazyme	Beckman AU400	Vidas Brahms	Vidas	Se	219	n.a.	0.94	0.001	0.984
2019	FDA K192271	Access	Access	Vidas Brahms	Vidas	Se	207	PB	0.96	0.02	0.990
2020	FDA K200236	Vitros Brahms	Vitros 3600	Brahms Kryptor	Kryptor	P	246	PB	1.03	0.004	0.994
2008	Lagabrielle et al.	Vidas Brahms	Vidas	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	108	n.a.	1.26	-0.090	0.980
2009	De Wolf et al.	Elecsys Brahms	Roche Modular 170	Brahms Kryptor	Krypor	Fro P	229	De	0.95	-0.090	0.990
2009	Schuetz et al.	Vidas Brahms	Vidas system	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	304	PB	1.23	-0.018	0.982
2009	Prieto et Alvarez	Elecsys Brahms	Cobas e411	Brahms Kryptor	Kryptor	n.a.	152	n.a.	0.86	-0.002	n.a.
2010	Hausfater et al.	Vidas Brahms	Vidas system	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre Se	305	PB	1.03	-0.063	1.000
2011	Sanders et al.	Advia Brahms	Advia Centuar	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	97	PB	0.88	-0.025	0.994
2012	Lloyd et Kuyl et al.	Advia Brahms	Advia Centuar	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre	41	Li	0.86	0.233	0.977
		Elecsys Brahms	Cobas e601	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre	41	Li	1.07	-0.606	0.987
2014	Dipalo et al.	Diazyme	Beckman AU5800	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre Se	129	De	1.10	-0.890	0.960

2015	Dipalo et al.	Liaison Brahms	Liaison	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	1.02	0.220	0.986
		Vidas Brahms	Vidas	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	1.40	-0.090	0.979
		Elecsys Brahms	Cobas e601	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	1.12	-0.470	0.988
		Advia Brahms	Advia Centuar	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	0.80	0.400	0.984
		Diazyme	Architect	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	0.95	-0.160	0.899
		Diazyme	Advia Centuar	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	1.01	-0.230	0.927
		Diazyme	Cobas C501	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	0.85	0.070	0.899
		Diazyme	Beckman AU5800	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	100	De	0.87	-0.040	0.899
2016	Du puy et al.	Lumipulse Brahms	Lumipulse G600II	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	138/70	PB	1.07	0.045	0.990
2016	Fortunato et al.	Liaison Brahms	Liaison	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	193	De	1.04	0.050	0.990
2016	Ruzzenente et al.	Lumipulse Brahms	Lumipulse G1200	Vidas Brahms	Vidas	Fro Se	100	PB	0.76	0.040	0.995
2017	Lueng et al.	Architect Brahms	Architect	Vidas Brahms	Vidas	Fro	78	Li	0.77	0.024	0.954
		Architect Brahms	Architect	Elecsys Brahms	Elecsys	Fro	78	Li	0.96	0.014	0.972
2017	Ceriotti et al.	Diazyme	Cobas c702	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	239	PB	0.65	0.014	0.850
		Elecsys Brahms	Cobas e602	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro Se	239	PB	0.91	0.021	0.99
2018	Eidizadeh et al.	Liaison Brahms	Liaison XL	Elecsys Brahms	Cobas e411	P	64	PB	1.79	-0.014	0.995
		Liaison Brahms	Liaison XL	Architect Brahms	Architect i2000SR	P	64	PB	1.72	0.010	0.996
		Elecsys Brahms	Cobas e411	Architect Brahms	Architect i2000SR	P	64	PB	0.98	0.016	0.998
2018	Mouatani et al.	Architect Brahms	Architect i2000SR	Brahms Kryptor	Kryptor	P	62	Li	1.10	0.050	0.990
2018	Soh et al.	Architect Brahms	Architect i2000SR	Elecsys Brahms	Cobas	Fro Se	322	De	0.82	0.300	0.990
		Architect Brahms	Architect i2000SR	Liaison Brahms	Liaison	Fro S	82	De	0.76	-0.500	0.970

		Architect Brahms	Architect i2000SR	Vidas Brahms	Vidas	Fro S	128	De	0.69	0.100	0.990
		Architect Brahms	Architect i2000SR	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro S	584	De	0.91	-0.200	0.990
2019	Chamlisse et al.	Architect Brahms	Architect i2000	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro S	39	PB	0.81	-0.006	0.886
		Elecsys Brahms	Cobas e411	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro S	37	PB	0.79	0.005	0.897
2019	Wang et al.	Architect Brahms	Architect i2000	Vidas Brahms	Vidas 3	Fro P	108	PB	0.79	0.042	0.995
2019	Dipalo et al.	Liaison Brahms	Liaison XL	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro	171	PB	1.17	-0.010	0.990
		Access	Access	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.12	-0.030	0.997
		Access	UniCel DXI	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.19	-0.070	0.994
		Lumipulse Brahms	Lumipulse	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.14	-0.010	0.986
		Diazyme	Cobas C702	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.19	0.010	0.922
2019	Lippi et al.*	Elecsys Brahms	Cobas E801	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	0.89	-0.010	0.985
		Vidas Brahms	Vidas	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.19	-0.060	0.994
		Liaison Brahms	Liaison XL	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.15	-0.020	0.997
		Maglumi	Maglumi	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	1.51	-0.100	0.991
		Architect Brahms	Architect c16000	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	176	PB	0.97	-0.010	0.995
2019	Gruzdys et al.	Architect Brahms	Architect Ci8200	Brahms Kryptor	Kryptor	Fro P	192	PB	0.83	-0.013	n.a.
2019	Katz et al.	Elecsys Brahms	Cobas e411	Vidas Brahms	Vidas 3	Fro P	213	Li	0.64	-0.270	0.950
2020	Lippi et al.	Access	Access	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre P	208	PB	1.12	-0.030	0.999
2020	Dupuy et al.	Diasys	Cobas C502	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre Se	136	PB	1.152	0.032	n.a.
		Diazyme	Cobas C502	Brahms Kryptor	Kryptor	Fre Se	136	PB	1.692	0.178	n.a.

Fro: frozen; Fre: fresh; P: plasma; Se: serum; PB: Passing Bablok analysis; De: Deming analysis; Li: linear analysis. n.a.: not available

(*): only regression analysis data using Brahms Kryptor as comparative assay was presented in this table

Supplemental Table 2. Published concordance between assays at different clinical cutoff concentrations

Date	Study	Test assay (Instrument)	Comparative assay (Instrument)	Concordance at clinical cutoffs (%)					
				0.1 µg/L	0.25 µg/L	0.5 µg/L	1 µg/L	2 µg/L	10 µg/L
2017	FDA K170652	Architect Brahms	Brahms Kryptor			100		100	
2018	FDA K173683	Liaison Brahms	Vidas Brahms	95	95	97		99	
2017	FDA K172713	Lumipulse Brahms	Brahms Kryptor			96		98	
2018	FDA K173927	Elecsys Brahms	BrahmsKryptor	98	98	97		97	
2018	FDA K181002	Atellica Brahms	BrahmsKryptor	99	98	97		97	
2017	FDA K162297	Diazyme	Vidas Brahms			95		95	
2019	FDA K192271	Access	Vidas Brahms			98		98	
2020	FDA K200236	Vitros Brahms	Brahms Kryptor	99	98	97		98	
2009	De Wolf et al	Elecsys Brahms	Brahms Kryptor		99	98			
2009	Schuetz et al	Vidas Brahms	Brahms Kryptor		95				
2009	Prieto et Alvarez	Elecsys Brahms (Cobas)	Brahms Kryptor		97	94			
2010	Hausfater et al.	Vidas Brahms	Brahms Kryptor		91	96		99	
2012	Lloyd et Kuyl	Advia Brahms	Brahms Kryptor			98			
		Elecsys Brahms	Brahms Kryptor			95			
2014	Dipalo et al	Diazyme (Beckman)	Brahms Kryptor		92	85		91	96
2015	Dipalo et al.	Liaison Brahms	Brahms Kryptor			97		96	98
		Vidas Brahms	Brahms Kryptor			97		94	98
		Elecsys Brahms (Cobas)	Brahms Kryptor			98		97	98
		Advia Brahms	Brahms Kryptor			95		96	98
		Diazyme (Architect)	Brahms Kryptor			84		90	98
		Diazyme (Advia)	Brahms Kryptor			86		91	98
		Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor			86		92	98
		Diazyme (AU5800)	Brahms Kryptor			83		91	98
2016	Fortunato et al.	Liaison Brahms	Brahms Kryptor			98			
2016	Ruzzenente et al.	Lumipulse Brahms	Vidas Brahms			100		97	95
2017	Lueng et al.	Architect Brahms	Vidas Brahms	95	91	99			

		Architect Brahms	Elecsys Brahms	94	94	100			
2017	Ceriotti et al.	Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor		78	75	88	90	
		Elecsys Brahms	Brahms Kryptor	99	99	97	98	98	
2018	Soh et al.	Architect Brahms	Elecsys Brahms		97	98			
		Architect Brahms	Liaison Brahms		93	94			
		Architect Brahms	Vidas Brahms		94	98			
		Architect Brahms	Brahms Kryptor		95	96			
2019	Wang et al.	Architect Brahms	Vidas Brahms	94	94	94		95	
2019	Lippi et al.	Access (Access)	Brahms Kryptor	97	98	100		98	97
		Access (DXI)	Brahms Kryptor	97	97	100		97	96
		Lumipulse Brahms	Brahms Kryptor	98	96	96		97	97
		Diazyme (Cobas)	Brahms Kryptor	94	83	84		95	96
		Elecsys Brahms (Cobas)	Brahms Kryptor	96	96	99		96	98
		Vidas Brahms	Brahms Kryptor	96	99	99		97	96
		Liaison Brahms	Brahms Kryptor	97	98	99		97	98
		Maglumi	Brahms Kryptor	96	96	93		96	91
		Architect Brahms	Brahms Kryptor	97	96	99		98	99
		Acces (DXI)	Access (on Access)	99	98	100		98	99
		Lumipulse Brahms	Access (on Access)	98	97	96		98	99
		Diazyme (Cobas)	Access (on Access)	92	84	84		96	99
		Elecsys Brahms (Cobas)	Access (on Access)	99	95	99		97	97
		Vidas Brahms	Access (on Access)	98	98	99		98	99
		Liaison Brahms	Access (on Access)	99	98	99		98	97
		Maglumi	Access (on Access)	98	97	93		97	94
		Architect Brahms	Access (on Access)	99	95	99		99	97
		Lumipulse Brahms	Access (on DXI)	97	95	96		98	98
		Diazyme (Cobas)	Access (on DXI)	91	82	84		95	98
		Elecsys Brahms (Cobas)	Access (on DXI)	98	96	99		94	95
		Vidas Brahms	Access (on DXI)	98	97	99		99	99
		Liaison Brahms	Access (on DXI)	99	96	99		99	97
		Maglumi	Access (on DXI)	98	95	93		98	95
		Architect Brahms	Access (on DXI)	99	97	99		97	96
		Diazyme (Cobas)	Lumipulse Brahms	94	84	83		97	99

		Elecsys Brahms (Cobas)	Lumipulse Brahms	97	93	96	95	97
		Vidas Brahms	Lumipulse Brahms	96	94	96	99	99
		Liaison Brahms	Lumipulse Brahms	98	97	97	99	97
		Maglumi	Lumipulse Brahms	97	97	92	97	94
		Architect Brahms	Lumipulse Brahms	98	94	95	97	97
		Elecsys Brahms (Cobas)	Diazyme (on Cobas)	92	82	83	94	95
		Vidas Brahms	Diazyme (on Cobas)	90	84	84	97	99
		Liaison Brahms	Diazyme (on Cobas)	92	83	85	97	96
		Maglumi	Diazyme (on Cobas)	91	84	86	95	94
		Architect Brahms	Diazyme (on Cobas)	92	81	84	95	96
		Vidas Brahms	Elecsys Brahms (on Cobas)	97	96	98	94	95
		Liaison Brahms	Elecsys Brahms (on Cobas)	98	96	98	94	97
		Maglumi	Elecsys Brahms (on Cobas)	97	91	92	94	90
		Architect Brahms	Elecsys Brahms (on Cobas)	98	97	98	98	98
		Liaison Brahms	Vidas Brahms	98	97	99	100	96
		Maglumi	Vidas Brahms	97	94	94	98	95
		Architect Brahms	Vidas Brahms	98	96	98	97	96
		Maglumi	Liaison Brahms	99	96	94	98	93
		Architect Brahms	Liaison Brahms	99	95	98	97	98
		Architect Brahms	Maglumi	98	93	91	97	91
2019	Gruzdys et al.	Architect Brahms	Brahms Kryptor	93	93	89	95	
2019	Katz et al.	Elecsys Brahms	Vidas Brahms		95	92		
2020	Lippi et al.	Access (Access)	Brahms Kryptor			100	98	98
2019	Chamlisse et al.	Architect Brahms	Brahms Kryptor	79% for 4 ranges < 0.1, 0.1-0.24, 0.25-0.5, > 0.5				
		Elecsys Brahms (Cobas)	Brahms Kryptor	84% for 4 ranges < 0.1, 0.1-0.24, 0.25-0.5, > 0.5				
2011	Sanders et al.	Advia Brahms	Brahms Kryptor	77% for < 0.25/ 91% for 0.25-0.5/ 96% for > 0.5				
2020	Dupuy et al.	Diasys	Brahms Kryptor	81% for 4 ranges < 0.25, 0.25-0.50, 0.50-2.0, > 2.0				
		Diazyme	Brahms Kryptor	62% for 4 ranges < 0.25, 0.25-0.50, 0.50-2.0, > 2.0				

Supplemental Table 3. Summarized data of 137 EQAS from 10 EQA providers

EQA provider	Country	Number of surveys	Laboratory participants Mean (median)	Year of study	EQA material	Consensus value range (µg/L)	Mean Interlaboratory CV (%)	SD (%)
ANSM	France	4	564 (564)	2014-2015	LyoS	0.22-9.97	17.1	4.1
CSCQ	Switzerland	8	104 (105)	2017-2018-2019	LyoS	0.55-3.22	24.3	8.1
Equalis	Sweden	8	47 (47)	2018-2019	FroNS	0.15-3.77	8.1	2.6
Instand	Germany	7	193 (211)	2016-2017-2018-2019	FreNS	1.80-20.20	17.6	4.5
Labquality	Finland	10	105 (108)	2017-2018-2019	LyoS	0.44-27.19	19.1	3.3
ProBioQual	France	14	689 (692)	2018-2019	LyoS	0.45-43.66	22.1	6.9
RCPAQAP	Australia	8	38 (39)	2019	LyoNS	0.36-21.48	13.0	3.6
RfB	Germany	24	440 (451)	2016-2017-2018	LyoS	0.35-39.49	24.3	6.4
SKML	Netherlands	44	23 (23)	2018-2019	LyoNS	0.05-9.22	6.5	3.7
Weqas	UK	10	17 (18)	2019-2020	FroS	0.26-7.91	21.0	5.3
Total	-	137	2220	2014-2020	-	0.05-43.66	-	-

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT

FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT

FroS: frozen with spiking with exogenous PCT

LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 4. Detailed data of 137 EQA surveys

EQA providers	Date of the EQAS	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ANSM	08/2015	LyoS	0.22	17.3	548
	09/2015	LyoS	9.97	19.9	548
	12/2014	LyoS	0.61	11.2	580
	12/2014	LyoS	4.74	20.0	580
CSCQ	08/2017	LyoS	0.55	13.1	106
	10/2017	LyoS	0.55	15.0	108
	02/2018	LyoS	0.64	18.2	105
	04/2018	LyoS	1.59	29.2	106
	08/2018	LyoS	3.02	34.6	105
	10/2018	LyoS	3.22	33.4	101
	02/2019	LyoS	1.70	24.9	101
	04/2019	LyoS	1.66	25.6	103
Equalis	01/2018	FroNS	0.15	9.2	43
	01/2018	FroNS	3.67	6.1	44
	03/2018	FroNS	0.15	13.9	50
	03/2018	FroNS	3.53	6.5	49
	01/2019	FroNS	0.95	6.5	44
	01/2019	FroNS	0.29	7.1	46
	03/2019	FroNS	0.93	7.2	48
	03/2019	FroNS	3.77	8.5	48
Instand	05/2016	FreNS	7.03	17.6	211
	11/2016	FreNS	3.93	25.8	194
	05/2017	FreNS	20.20	17.0	96
	11/2017	FreNS	6.48	12.1	205
	05/2018	FreNS	5.23	19.9	215
	11/2018	FreNS	1.80	17.8	219
	05/2019	FreNS	8.87	13.1	213
Labquality	04/2017	LyoS	2.06	21.3	80
	04/2017	LyoS	27.19	18.5	80
	10/2017	LyoS	0.89	16.1	81
	10/2017	LyoS	6.00	17.7	81
	04/2018	LyoS	1.62	20.1	108
	04/2018	LyoS	15.99	23.4	108
	10/2018	LyoS	0.86	17.7	117
	10/2018	LyoS	3.57	21.7	117
	04/2019	LyoS	0.44	12.5	140
	04/2019	LyoS	9.80	22.1	140
ProBioQual	05/2019	LyoS	13.47	22.8	706
	05/2019	LyoS	4.36	28.2	706
	04/2019	LyoS	43.15	12.8	698
	04/2019	LyoS	0.45	30.2	701
	02/2019	LyoS	4.47	29.6	691
	02/2019	LyoS	43.66	13.2	678
	10/2018	LyoS	0.50	27.9	702
	10/2018	LyoS	11.31	23.2	692
	07/2018	LyoS	11.13	21.2	687
	07/2018	LyoS	3.94	25.0	692
	04/2018	LyoS	41.95	12.0	674
	04/2018	LyoS	0.49	25.2	683
RCPAQAP	03/2019	LyoNS	1.38	17.1	40
	04/2019	LyoNS	0.36	8.6	37
	05/2019	LyoNS	5.71	15.0	35
	06/2019	LyoNS	21.48	12.2	39
	08/2019	LyoNS	1.38	13.3	38
	09/2019	LyoNS	10.46	17.8	39
	10/2019	LyoNS	5.68	11.9	39
	11/2019	LyoNS	0.36	7.9	39
SKML	2018.1A	LyoNS	4.48	6.7	19
	2018.1B	LyoNS	0.98	5.8	22
	2018.1C	LyoNS	2.25	9.3	21
	2018.1D	LyoNS	1.78	7.9	24
	2018.1E	LyoNS	0.32	6.3	23
	2018.1F	LyoNS	0.09	22.8	17
	2018.2A	LyoNS	3.28	4.6	23
	2018.2B	LyoNS	0.52	4.5	22
	2018.2C	LyoNS	0.75	6.5	23
	2018.2D	LyoNS	1.38	4.1	22
	2018.2E	LyoNS	5.44	4.1	24
	2018.2F	LyoNS	8.89	3.8	24
	2018.3A	LyoNS	5.62	6.1	22
	2018.3B	LyoNS	1.80	7.0	25
	2018.3C	LyoNS	0.08	1.3	17
	2018.3D	LyoNS	0.94	6.0	26
	2018.3E	LyoNS	0.73	4.1	25
	2018.3F	LyoNS	4.37	6.1	23
	2018.4A	LyoNS	9.03	12.3	22
	2018.4B	LyoNS	0.30	7.3	24
	2018.4C	LyoNS	1.36	6.0	23
	2018.4D	LyoNS	0.52	7.4	25
	2018.4E	LyoNS	3.32	2.8	23
	2018.4F	LyoNS	2.25	5.0	23
	2019.1A	LyoNS	9.17	5.3	21
	2019.1D	LyoNS	1.00	5.5	24
	2019.1E	LyoNS	0.05	17.6	16
	2019.1F	LyoNS	0.53	5.3	24
	2019.2A	LyoNS	0.29	9.1	21
	2019.2B	LyoNS	2.39	7.2	23
	2019.2C	LyoNS	1.46	6.0	23
	2019.2D	LyoNS	4.56	5.7	22
	2019.2E	LyoNS	0.77	7.7	24
	2019.2F	LyoNS	5.82	4.9	25
	2019.3A	LyoNS	9.22	7.2	26
	2019.3B	LyoNS	0.77	4.7	26
	2019.3E	LyoNS	0.29	7.7	27
	2019.3F	LyoNS	2.34	5.3	27
	2019.4A	LyoNS	1.47	4.4	25
	2019.4B	LyoNS	0.54	8.8	26
	2019.4C	LyoNS	4.65	4.3	29
	2019.4D	LyoNS	0.05	2.0	18

	02/2018	LyoS	4.05	26.7	671
	02/2018	LyoS	42.11	11.2	658
RfB	10/2018	LyoS	8.04	19.6	411
	10/2018	LyoS	5.48	20.7	411
	08/2018	LyoS	0.51	19.5	578
	08/2018	LyoS	1.53	18.8	578
	05/2018	LyoS	5.50	21.0	376
	05/2018	LyoS	8.11	21.0	376
	03/2018	LyoS	1.51	22.0	589
	03/2018	LyoS	3.02	21.3	589
	10/2017	LyoS	2.04	25.9	350
	10/2017	LyoS	0.59	33.3	350
	08/2017	LyoS	0.35	34.5	521
	08/2017	LyoS	4.05	25.7	521
	05/2017	LyoS	0.61	45.4	327
	05/2017	LyoS	2.07	28.8	327
	03/2017	LyoS	10.49	24.8	543
	03/2017	LyoS	1.64	31.5	543
	10/2016	LyoS	28.74	20.7	298
	10/2016	LyoS	10.15	24.5	298
	08/2016	LyoS	26.49	20.1	490
	08/2016	LyoS	39.49	17.0	490
	05/2016	LyoS	10.10	22.7	281
	05/2016	LyoS	28.78	18.9	281
	03/2016	LyoS	15.90	22.0	511
	03/2016	LyoS	4.86	24.0	511

	2019.4E	LyoNS	5.71	3.0	28
	2019.4F	LyoNS	1.00	5.5	28
Weqas	02/2020	FroS	0.27	19.8	19
	02/2020	FroS	0.91	14.5	19
	02/2020	FroS	3.54	14.9	20
	01/2020	FroS	0.49	18.4	18
	01/2020	FroS	1.80	17.0	18
	12/2019	FroS	7.91	23.2	17
	12/2019	FroS	0.26	27.8	17
	12/2019	FroS	0.91	20.6	17
	11/2019	FroS	0.26	30.4	13
	11/2019	FroS	1.81	23.9	13

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT
FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT
FroS: frozen with spiking with exogenous PCT
LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT
LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 5. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Elecsys Brahms immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ANSM	LyoS	0.22	7.2	137
	LyoS	7.76	4.0	137
	LyoS	0.59	4.7	123
	LyoS	3.78	5.4	123
CSCQ	LyoS	0.50	6.5	41
	LyoS	0.50	4.6	44
	LyoS	0.60	3.9	41
	LyoS	1.30	4.5	41
	LyoS	2.40	4.1	41
	LyoS	2.60	4.1	42
	LyoS	1.50	4.3	42
	LyoS	1.40	3.6	43
Equalis	FroNS	0.15	8.1	40
	FroNS	3.66	5.2	42
	FroNS	0.15	10.2	41
	FroNS	3.56	5.5	40
	FroNS	0.95	5.1	34
	FroNS	0.29	6.0	36
	FroNS	0.93	5.4	34
	FroNS	3.75	6.9	34
Instand	FreNS	6.39	7.7	47
	FreNS	3.53	26.2	48
	FreNS	18.80	13.1	25
	FreNS	6.29	7.5	52
	FreNS	5.20	12.5	55
	FreNS	1.71	9.0	52
	FreNS	8.57	8.0	56
ProBioQual	LyoS	11.33	3.1	237
	LyoS	3.45	3.3	236
	LyoS	41.09	3.1	241
	LyoS	0.38	4.9	237
	LyoS	3.49	3.3	234
	LyoS	41.35	3.6	231
	LyoS	0.40	4.0	232
	LyoS	9.34	3.6	232
	LyoS	9.33	3.7	224
	LyoS	3.11	3.4	225
	LyoS	39.78	3.8	217
	LyoS	0.4	4.8	220
	LyoS	3.17	3.4	213
	LyoS	40.36	3.8	213
RfB	LyoS	7.04	5.6	169
	LyoS	4.79	5.7	169
	LyoS	0.47	5.5	219
	LyoS	1.37	6.0	219
	LyoS	4.75	11.9	159
	LyoS	7.06	11.0	159
	LyoS	1.31	4.6	218
	LyoS	2.62	7.7	218
	LyoS	1.72	10.6	156
	LyoS	0.49	19.3	156
	LyoS	0.3	5.4	195
	LyoS	3.39	8.2	195
	LyoS	0.49	19.0	155
	LyoS	1.7	11.0	155
	LyoS	8.57	4.7	169
	LyoS	1.3	4.7	169
	LyoS	25.7	8.5	109
	LyoS	8.68	20.7	109
	LyoS	23.3	8.1	148
	LyoS	36.6	10.2	148
	LyoS	8.55	5.8	100
	LyoS	25.7	5.1	100
	LyoS	13.8	5.3	161
	LyoS	4.03	4.6	161

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT
FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT
FroS: frozen with spiking with exogenous PCT
LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT
LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 6. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Vidas Brahms immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ANSM	LyoS	0.2	12.8	302
	LyoS	11.19	7.4	302
	LyoS	0.65	7.7	327
	LyoS	5.18	5.4	327
CSCQ	LyoS	0.60	8.1	54
	LyoS	0.60	7.7	53
	LyoS	0.70	9.3	52
	LyoS	1.90	5.2	52
	LyoS	3.70	3.9	49
	LyoS	3.90	4.6	48
	LyoS	2.00	6.1	46
	LyoS	2.00	6.2	45
Instand	FreNS	8.89	9.0	38
	FreNS	5.04	18.0	33
	FreNS	25.60	12.7	20
	FreNS	8.30	9.7	25
	FreNS	6.80	14.7	24
	FreNS	2.30	10.4	26
ProBioQual	LyoS	16.24	6.6	233
	LyoS	5.46	4.5	230
	LyoS	47.1	7.2	238
	LyoS	0.55	7.6	236
	LyoS	5.63	4.5	241
	LyoS	47.89	7.9	238
	LyoS	0.59	9.3	257
	LyoS	13.39	8.5	255
	LyoS	12.76	8.7	257
	LyoS	4.67	5.2	256
	LyoS	44.09	8.6	261
	LyoS	0.56	8.2	260
	LyoS	4.87	5.6	272
	LyoS	44.46	8.0	272
RfB	LyoS	10.20	11.8	48
	LyoS	6.86	6.6	48
	LyoS	0.62	27.3	79
	LyoS	2.07	11.8	79
	LyoS	6.89	6.1	51
	LyoS	10.60	10.8	51
	LyoS	2.07	5.4	85
	LyoS	4.04	5.0	85
	LyoS	2.74	6.5	48
	LyoS	0.69	6.8	48
	LyoS	0.35	8.9	86
	LyoS	5.28	13.0	86
	LyoS	0.62	11.9	51
	LyoS	2.55	13.1	51
	LyoS	13.60	8.4	99
	LyoS	1.97	7.9	99
	LyoS	36.80	8.0	44
	LyoS	13.80	9.3	44
	LyoS	33.60	7.4	93
	LyoS	47.70	7.0	93
	LyoS	13.50	7.2	46
	LyoS	36.20	6.2	46
	LyoS	21.10	8.0	96
	LyoS	6.20	8.0	96

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT
FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT
FroS: frozen with spiking with exogenous PCT
LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT
LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 7. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Brahms Kryptor immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ANSM	LyoS	0.27	6.4	46
	LyoS	7.76	4.1	46
	LyoS	0.56	5.7	50
	LyoS	3.23	4.4	50
Instand	FreNS	6.90	12.4	75
	FreNS	3.96	20.7	69
	FreNS	19.40	12.7	29
	FreNS	6.31	7.8	68
	FreNS	5.51	10.8	71
	FreNS	1.79	11.0	74
	FreNS	8.46	5.0	67
ProBioQual	LyoS	7.65	3.0	40
	LyoS	2.38	3.5	39
	LyoS	23.81	3.2	45
	LyoS	0.22	7.8	45
	LyoS	2.37	3.3	43
	LyoS	23.62	4.7	43
	LyoS	0.25	7.6	40
	LyoS	6.51	3.7	41
	LyoS	6.48	4.4	40
	LyoS	2.26	3.5	40
	LyoS	22.93	5.1	37
	LyoS	0.25	7.8	37
	LyoS	2.20	2.9	40
	LyoS	23.06	3.6	40
RfB	LyoS	7.19	8.3	33
	LyoS	4.84	14.4	33
	LyoS	0.47	6.0	87
	LyoS	1.36	5.4	87
	LyoS	4.78	11.4	26
	LyoS	7.14	12.0	26
	LyoS	1.33	5.5	80
	LyoS	2.65	6.1	80
	LyoS	1.70	13.3	23
	LyoS	0.48	9.8	23
	LyoS	0.29	8.2	73
	LyoS	3.38	5.6	73
	LyoS	0.43	8.9	25
	LyoS	1.62	5.1	25
	LyoS	8.51	5.5	63
	LyoS	1.27	4.8	63
	LyoS	24.40	7.5	38
	LyoS	8.37	5.1	38
	LyoS	21.80	7.6	61
	LyoS	32.40	9.5	61
	LyoS	8.35	5.5	50
	LyoS	24.90	10.2	50
	LyoS	13.10	7.6	73
	LyoS	4.07	4.4	73

FreNS: fresh pools of samples without spiking with exogenous PCT
FroNS: frozen without spiking with exogenous PCT
FroS: frozen with spiking with exogenous PCT
LyoNS: lyophilized without spiking with exogenous PCT
LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 8. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Architect Brahms immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ProBioQual	LyoS	11.58	4.8	86
	LyoS	3.53	4.8	85
	LyoS	38.61	4.6	74
	LyoS	0.33	5.2	74
	LyoS	3.58	4.6	69
	LyoS	38.79	5.0	68
	LyoS	0.37	4.7	54
	LyoS	9.89	5.0	54
	LyoS	9.91	4.9	51
	LyoS	3.33	5.2	51
	LyoS	38.46	6.4	44
	LyoS	0.37	5.4	44
	LyoS	3.23	4.7	32
	LyoS	37.70	6.3	32

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 9. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Advia/Atellica Brahms immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ANSM	LyoS	0.31	9.5	49
	LyoS	10.92	4.1	49
	LyoS	0.48	12.3	55
	LyoS	5.81	6.0	55
ProBioQual	LyoS	16.34	3.8	55
	LyoS	5.53	3.6	55
	LyoS	49.14	4.5	57
	LyoS	0.71	5.5	55
	LyoS	5.59	5.6	55
	LyoS	49.73	5.3	55
	LyoS	0.66	6.3	55
	LyoS	13.39	3.9	66
	LyoS	13.26	4.1	65
	LyoS	4.52	3.6	65
	LyoS	47.55	4.9	67
	LyoS	0.65	5.7	65
	LyoS	4.56	7.7	57
	LyoS	46.34	4.5	57

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 10. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Diazyme immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
RfB	LyoS	9.22	14.0	41
	LyoS	6.88	15.7	41
	LyoS	0.72	32.0	44
	LyoS	1.82	18.4	44
	LyoS	7.00	12.7	32
	LyoS	9.68	11.9	32
	LyoS	1.91	20.5	42
	LyoS	4.01	15.1	42
	LyoS	2.16	21.9	22
	LyoS	0.74	45.8	22
	LyoS	0.43	94.5	34
	LyoS	4.61	15.0	34
	LyoS	13.30	10.4	34
	LyoS	2.86	28.7	34
	LyoS	31.70	31.5	26
	LyoS	45.80	44.0	26
	LyoS	18.90	8.5	22
	LyoS	6.10	7.9	22

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

Supplemental Table 11. Data detailing intra-peer group CV% per immunoassay obtained from all studies with more than 20 participants for Radiometer immunoassay

EQA providers	Type of sample	Consensus value (µg/L)	Interlaboratory CV (%)	Number of participants
ProBioQual	LyoS	13.00	0.5	25
	LyoS	4.57	3.5	26
	LyoS	36.62	3.5	23
	LyoS	0.45	5.4	23
	LyoS	4.50	4.3	22
	LyoS	37.32	3.8	22
	LyoS	0.49	3.9	20
	LyoS	12.00	3.4	20
	LyoS	11.00	4.6	22
	LyoS	4.11	4.0	22
	LyoS	35.38	3.1	23
	LyoS	0.49	4.5	22
	LyoS	40.40	3.9	24
	LyoS	35.70	4.2	24

LyoS: lyophilized with spiking with exogenous PCT

I.2 Stratégie pour l'établissement d'une chaîne de traçabilité des mesures de la PCT

Les objectifs de l'IFCC sont d'améliorer le niveau scientifique, la qualité du diagnostic et le suivi thérapeutique des patients à travers le monde au travers de la promotion de la médecine de laboratoire, l'innovation scientifique et la formation (272). Au sein de l'IFCC, la division scientifique a pour mission de faire progresser les innovations scientifiques et techniques et de les appliquer à la pratique quotidienne des laboratoires de biologie médicale, constituant ainsi un facteur d'amélioration de la qualité des soins. Dans cette optique, de nombreuses activités ont été initiées pour améliorer la « standardisation » et l'harmonisation des examens de biologie médicale. Dans le but d'établir une chaîne de traçabilité métrologique de mesure de la PCT, d'améliorer la comparabilité et la fiabilité des résultats obtenus entre les différentes méthodes, et d'évaluer le besoin de « standardisation » et d'harmonisation de ces mesures, l'IFCC a créé en 2018 le groupe de travail sur la « standardisation » des méthodes de dosage de la PCT (WG-PCT) dont le LNE est membre coordinateur. Ce groupe de travail réunit toutes les parties prenantes nécessaires à l'évaluation de la nécessité et la faisabilité d'améliorer la comparabilité des dosages de la PCT, tels que les cliniciens, les biologistes, les fabricants de tests de diagnostic in vitro, les fournisseurs d'EEQ, les laboratoires d'étalonnage et les instituts de métrologie. Cela représente un prérequis important dans l'implémentation d'une nouvelle chaîne de traçabilité métrologique des résultats de dosage de la PCT.

La création de ce groupe de travail a nécessité l'établissement d'une stratégie autour de cinq objectifs afin de répondre aux besoins cités précédemment : le développement d'un système de référence (matériaux et procédures de référence), l'évaluation de la variabilité des résultats fournis par les différents tests PCT disponibles dans le commerce, l'évaluation du besoin et de la faisabilité de la standardisation des mesures de la PCT et la mise en œuvre de la standardisation de ces mesures si jugée nécessaire et faisable.

Le premier objectif est particulièrement focalisé sur le développement et la validation d'une méthode de référence candidate pour la quantification absolue de la PCT en sérum. Dans un premier temps, ceci a notamment nécessité de définir correctement le mesurande de cette méthode en analysant les différentes formes de la PCT mesurées actuellement par les méthodes immunoessais de routine. Dans le cadre clinique, les formes d'intérêt de la protéine sont les formes surexprimées lors d'une infection, c'est-à-dire la PCT intacte et les deux isoformes, correspondant à la perte d'un ou de deux acides aminés en N-terminal. Parmi ces trois formes circulantes de la PCT, la forme majoritaire observée en cas de sepsis est la forme où deux acides aminés en N-terminal ont été clivés (PCT (3-116)). Le mesurande de la méthode de référence candidate a donc été déterminé comme la forme totale de la PCT regroupant ces trois isoformes. Dans un second temps, une stratégie de quantification a été établie. Une quantification de la PCT par ID-LC-MS/MS avec une approche bottom-up a été sélectionnée et des peptides protéotypiques ont été sélectionnés comme cela sera

présenté dans la section A.II.1. Pour la préparation des échantillons, une approche sans anticorps (voir section A.II.3.3) basée sur les propriétés physico-chimiques de la PCT a été préférée par rapport aux approches d'immuno-affinité, qui sont actuellement utilisées dans les dosages immunologiques disponibles dans le commerce. Ceci permet de disposer d'une méthode de mesure orthogonale aux méthodes de routine ne présentant pas les mêmes biais de quantification potentiellement apportés par l'utilisation d'anticorps. Deux options d'étalonnage, peptidique et protéique, seront étudiées pour la quantification de la PCT en sérum (voir section A.II.3.4 et A.II.3.5). Ceci nécessite l'utilisation d'étalons primaires peptidiques ou protéiques dont la pureté et la concentration doivent être déterminées et la traçabilité aux unités SI établie (voir section A.II.2). La méthode ainsi développée devra atteindre des performances analytiques adaptées aux besoins cliniques (limite de quantification couvrant les seuils de décision clinique, incertitudes de mesure suffisamment faibles, haute fidélité, haute spécificité).

Le deuxième objectif concerne sur la documentation et l'analyse de la variabilité des résultats obtenus par les différentes méthodes de dosage de la PCT. Ces activités consistent à documenter rigoureusement la comparabilité des résultats par l'utilisation d'échantillons commutables pour évaluer le besoin de « standardisation ». En effet, comme cela a été mis en évidence dans la section précédente, l'état actuel des dosages de la PCT n'est pas correctement démontré. Les variabilités rapportées entre les méthodes ne permettent pas de conclure sur les différences des systèmes d'étalonnages car la commutabilité des échantillons n'a pas été démontrée. Par conséquent, il s'avère nécessaire d'évaluer la commutabilité des matériaux utilisés pour évaluer la comparabilité des résultats. Une étude de commutabilité doit donc être menée afin d'identifier et produire les matériaux les plus appropriés pour évaluer correctement la comparabilité des résultats de mesure de la PCT. Pour cela, il sera important d'identifier et produire des matériaux candidats tels que les pools lyophilisés ou congelés des échantillons sérums du patient, les matrices artificielles supplémentées ou non avec la protéine PCT recombinante venant des différentes sources, qui seront inclus dans l'étude de commutabilité. Enfin, une campagne EEQ sera mise en œuvre sur les matériaux adaptés afin d'évaluer correctement la comparabilité des résultats.

Le troisième objectif a pour but d'évaluer le besoin de standardisation des différentes méthodes de dosage de la PCT. La consultation des fabricants des méthodes de dosage de la PCT a révélé deux tendances : les fabricants d'immunoessais du groupe Brahms n'ont pas considéré que la « standardisation » de mesure était une priorité car un processus d'harmonisation a été mis en place par l'utilisation de la méthode Brahms Kryptor comme méthode de référence par consensus. Alors qu'au contraire, les fabricants d'autres méthodes, qui n'utilisent pas le même système d'étalonnage, ont exprimé le besoin de la « standardisation » des mesures de la PCT, en ligne avec les priorités décrites par l'ICHCLR.

Le quatrième objectif propose l'évaluation de la faisabilité de la standardisation des mesures de la PCT par les différentes méthodes de dosage commercialisées à travers la mise

en place d'un nouveau système de mesures de référence. Ces activités sont fortement dépendantes des résultats des activités des deux premiers objectifs. En effet, la « standardisation » sera mise en place si, et seulement si, une méthode de référence est disponible et répond aux exigences des performances analytiques, notamment la capacité de la méthode à quantifier des échantillons de concentrations proches des seuils de décision clinique et de besoin d'incertitude de mesure suffisamment faible. De plus, une bonne corrélation des résultats entre les méthodes immunoessai de routine et la méthode de référence candidate doit également être démontrée. La disponibilité des étalons commutables est également une nécessité.

Enfin, si cela s'avère nécessaire et réalisable, le dernier objectif consiste en la réalisation de la « standardisation » des méthodes de dosage de la PCT via l'utilisation d'étalons commutables dont la concentration sera déterminée par la méthode de référence ID-LC-MS/MS. La « standardisation » pourra être réalisée par l'utilisation d'un panel d'échantillons de patients ou d'étalons secondaires commutables dont la concentration aura été établie par la méthode de référence ID-LC-MS/MS. Les impacts du réétalonnage seront évalués par la suite par des campagnes d'EEQ. Il sera alors nécessaire d'évaluer si les seuils de décision clinique doivent être modifiés.

Les différentes activités du groupe de travail WG-PCT font l'objet d'une publication, intitulée « *Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders* » et soumise au journal Clinica Chimica Acta. Ce travail présente également l'implication des dosages de la PCT dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique chez les patients atteints du sepsis et un résumé des différentes caractéristiques techniques des méthodes d'immunoessais commercialisées.

Article 2 : Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders

Huu-Hien Huynh[a, b], Amandine Bœuf[a], Joëlle Vinh[b], Vincent Delatour[a, *], on behalf of IFCC Working Group on Standardization of Procalcitonin assays (WG-PCT)

Clinica Chimica Acta, 2021, 515, p.111-121

Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders

Huu-Hien Huynh[a, b], Amandine Bœuf[a], Joëlle Vinh[b], Vincent Delatour[a, *], on behalf of IFCC Working Group on Standardization of Procalcitonin assays (WG-PCT)

[a] Laboratoire National de Métrologie et d'Essai, Paris, France
[b] Biological Mass Spectrometry and Proteomics, SMBP, ESPCI Paris, Université PSL, CNRS, Paris, France

*****Corresponding author: Vincent Delatour at Laboratoire National de Métrologie et d'Essai (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France; Telephone: (33) 1 40 43 40 75; email: vincent.delatour@lne.fr.

Keywords: procalcitonin, standardization, harmonization, traceability, reference measurement system

Abbreviations

International system (SI)

External quality assessment (EQA)

In vitro diagnostic device (IVD)

Reference measurement procedure (RMP)

Isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS)

Analytical performance specifications (APS)

Isotope dilution mass spectrometry (IDMS)

Stable-isotope-labelled (SIL)

High-resolution mass spectrometry (HRMS)

Reference measurement system (RMS)

Abstract

Procalcitonin (PCT) is an important biomarker for sepsis diagnosis and management. To date, there is no higher-order reference measurement procedure (RMP) and certified reference material to achieve global standardization of results and results traceability to the SI units. Although efforts have been made to harmonize PCT results, a number of correlation

studies and external quality assessment (EQA) schemes show conflicting results regarding results comparability and to date, equivalence of PCT results across the assays remains questionable in absence of studies relying on commutable EQA materials. In this context, the IFCC initiated activities to fill these gaps through the creation of the working group on standardization of PCT assays that gathers experts from National Metrology Institutes, calibration laboratories, clinicians, biologists, EQA providers and assay manufacturers. Among the activities, a higher order RMP and commutable reference materials are under development to build a robust reference measurement system (RMS). A commutability study is being organized to identify EQA materials that are fit for purpose to reliably estimate the current comparability of PCT results. This work will make it possible to evaluate the necessity and the feasibility for establishing and maintaining a new RMS for PCT assays, if deemed necessary.

Introduction

Clinical laboratory tests play an important role across the healthcare continuum to diagnose and monitor patients and to guide treatment decisions. A study based on 72196 patients reported that 56% of patients from the emergency department and 98% of inpatients had at least one laboratory test ordered for diagnosis purpose during their care pathway [1]. Among clinical diagnostic technologies, immunoassays are the most widely used technique in routine laboratory [2]. In response to the high demand for testing, numerous immunoassays have been developed and commercialized. However, the co-existence of in vitro diagnostic medical devices marketed by different vendors may introduce some variability of the results between laboratories equipped with different analyzers. Depending on the purpose of the laboratory test prescription and the use of the test result in clinal management, such a variability could potentially lead to diagnostic errors, inappropriate treatment, and a misleading longitudinal patient monitoring [3]. This variability may have a crucial impact when an inpatient is moving from one unit to another, where different clinical laboratories with potentially different measurement procedures take over the patient follow-up, or when a biomarker has to be monitored for long period where analysis in different laboratories is inevitable. Moreover, from a research perspective as well as clinical decision, the lack of results comparability may impact conclusions and the subsequent definition of clinical practice guidelines and public healthcare strategies based on biomarkers measured values [3]. Thus, not only the measurement precision/reproducibility and accuracy of quantitative methods are fundamental prerequisites for a proper diagnosis and appropriate therapeutic monitoring, but also the comparability and the reliability of the results from different routine assays.

A privileged mean to ensure accuracy and comparability of the results is to establish metrological traceability of results to the International System (SI) of units [3–5] through the use of reference measurement system (RMS) consisting in a higher-order reference measurement procedure (RMP) and/or certified reference materials (CRMs) (Figure 1) [6]. By definition, metrological traceability is the property of a measurement result whereby the result can be related to a reference through a documented unbroken chain of calibrations, each contributing to the measurement uncertainty [7]. While standardization corresponds to the process of improving results comparability through the use of higher order RMPs or CRMs that allow establishing results traceability to the SI units, harmonization implies the use of references agreed by convention that do not necessarily allow establishing results traceability to the SI units [3]. As described in the recently revised ISO EN 17511:2020, both

approaches are suitable to fulfil requirements of the European regulation 2017/746 for in vitro diagnostic devices that will come into force in May 2022 to replace the 98/79/EC Directive and according to which values associated with the calibrators should be traceable to the available higher-order reference measurement procedure (RMP) and/or reference materials.

To establish a higher order RMS, primary RMP and primary reference material (pure) are needed to develop a secondary RMP and secondary reference materials (in matrix) (Figure 1). To be used in a calibration hierarchy of one or more end-user measurement procedures and successfully lead to harmonized results, it is crucial that the secondary reference material is commutable for the concerned assays, i.e. that it behaves the same way as patient samples [8–10]. While non-commutability of secondary calibrators breaks the traceability chain and results in the inability to achieve results harmonization [3,9], commutable reference materials are also needed to evaluate accuracy of routine assays [11–13]. Additionally, commutable CRMs are needed to conduct appropriate post-market vigilance to ensure that standardization has been achieved. Overall, establishing and maintaining a reference system leading to a consistent harmonization level appears demanding and only a limited number of success stories can be found in the field of clinical chemistry [14,15].

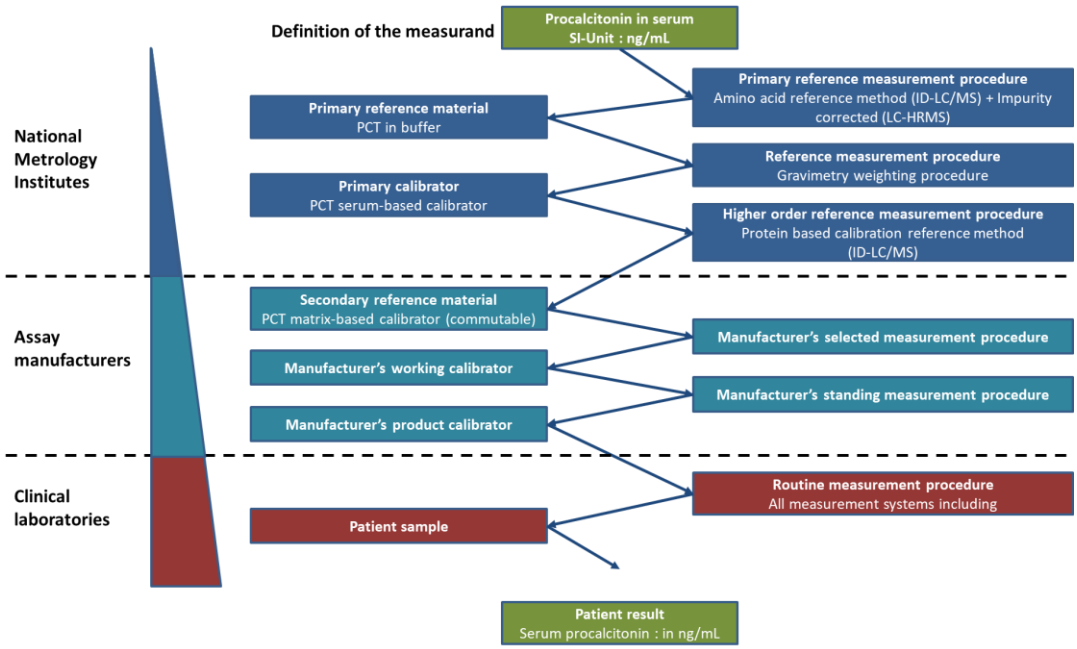


Figure 1. Example of a metrological traceability chain for procalcitonin (PCT) measurement (ISO 17511-2020) relying on the development of a reference measurement system consisting of a hierarchy of different reference materials and reference measurement procedures.

To improve global standardization and harmonization of laboratory tests, a wide range of activities are conducted by the Scientific Division of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Within this article, we describe the objectives and activities of the working group on standardization of procalcitonin (PCT) that was created in 2018.

1. Procalcitonin and its current measurement procedures

In the last 20 years, it has been shown that PCT is useful for both diagnosis and antibiotic stewardship in sepsis and lower respiratory tract infections [16–23], two global threats and health priorities [24–27]. Indeed, sepsis affects 48.9 million people, leading more than 11 million deaths worldwide [28], whereas antimicrobial resistance causes approximately 700,000 deaths every year. Without appropriate actions to address this issue, it is expected that the number of annual deaths caused by antimicrobial resistance could reach 10 million by 2050 [26].

Biochemistry of procalcitonin

PCT is produced by thyroid C-cells and is encoded by calcitonin I (CALC-I) gene on chromosome 11p15.4 [29]. The expression of the CALC-I gene is induced by an elevated calcium level, glucocorticoid, calcitonin related gene peptide, glucagon, gastrin and β-adrenergic stimulations [30]. The product of CALC-I is the 141 amino acid precursor polypeptide pre-PCT, which is further processed by endopeptidases to form PCT, a 116 amino acid protein. In non-infectious conditions, PCT is cleaved inside the C-cells to release the active hypocalcemic hormone calcitonin (32 amino acids), NProCT (57 amino acids) and katacalcin (21 amino acids) [31]. In non-infectious conditions, PCT concentration remains low in the bloodstream (≤ 0.05 µg/L) (Figure 2) [31]. In bacterial infection, PCT is produced in thyroid C-cells but also and in various tissues and organs such as liver, lung, pancreas and is directly released into the blood [32]. In these conditions, an increase up to 1100 folds of PCT concentration from the basal concentration was observed [32,33], and t PCT exists in three different isoforms in the bloodstream: intact PCT (1-116), PCT (2-116) in which the first amino acid is cleaved, and PCT (3-116) in which the first two amino acids are cleaved. Among these forms, PCT (3-116) has been reported as the predominant form but little is known about the clinical significance and role of the different forms [34,35]. Interestingly, PCT concentration remains low in the case of viral infections and localized bacterial infections, which allows distinguishing between viral and bacterial infection [36,37].

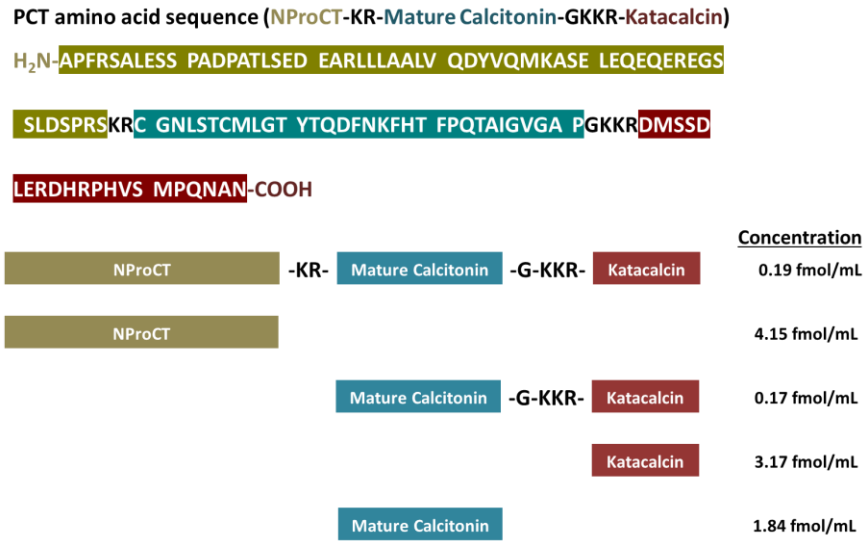


Figure 2. Amino acid sequence of procalcitonin (PCT) and the different forms of PCT derived products which can be detected at different concentrations in the bloodstream of healthy subjects (figure adapted from Maruna et al 2000 and Becker et al 2004 [31,38])

Clinical utility of procalcitonin

PCT concentration has been used to establish clinical guidelines for sepsis stratification and monitoring of antimicrobial therapy [16,17,39,40]. Decision making usually depends on specific cut-off values that have been validated for different populations (i.e., respiratory infection, critically ill patients with sepsis) [17,40]. An example of decision-making process based on PCT concentrations for sepsis diagnostic is presented in Figure 3. In addition, PCT measurement has already supported the clinical community for timely decision to start or terminate antibiotic treatment [41,42] supporting cost-effective patient management [43]. For example, cut-offs of 0.25 µg/L for non-ICU studies and 0.5 µg/L for ICU studies has been used in PCT stewardship trials to recommend for or against antibiotic treatment [17]. A large number of studies reported benefits of PCT monitoring regarding predicting mortality [44], reducing mortality [41], reducing antibiotic duration/exposure and antibiotic side effects [41–43,45–49] and reducing hospital, and ICU length of stay [50]. However, other studies reported more modest benefits of PCT measurements on mortality reduction and hospital length of stay. In a meta-analysis, Pepper et al. selected the randomized trials that used PCT to guide antibiotic de-escalation in critically ill patients and evaluated four outcomes: mortality, antibiotic duration/exposure, hospital, and ICU length of stay [51]. Separate analyses were done for two populations: all critically ill patients and sepsis-only patients. The results were significantly in favour of the use of PCT regarding reducing mortality and antibiotic duration/exposure in critical illness. However, in the sepsis sub-analysis, the mortality was not reduced, but antibiotic duration/exposure remained significantly beneficial with PCT. Hospital and ICU length of stay were not reduced with PCT in both study populations. More recently, elevation of PCT concentration has been reported in severe forms of coronavirus disease 2019 (COVID-19) presenting bacterial coinfection [52,53]. Longitudinal PCT measurement is recommended by IFCC Task Force on COVID-19 to predict its severity [54]. PCT measurement in COVID-19 patients has been associated with disease severity and mortality [55] but whether can serve as predictor of secondary bacterial infections is still unclear [56], possibly due to variations in PCT measurements that introduce limitations in meta-analyses.

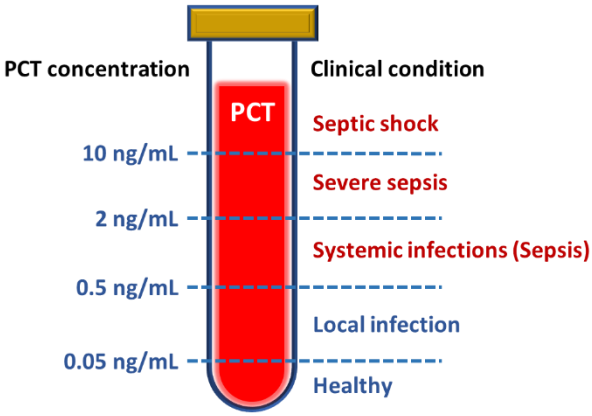


Figure 3. PCT clinical cut-off values for patient stratification (figure adapted from Meisner 2014 [57])

Methods of measurement

The use of PCT tests has been gaining widespread in the clinical laboratory settings [58,59]. In consequence, multiple immunoassays measuring PCT concentration in human serum or plasma have been developed to meet the important demand of PCT testing and developments are continuing with new assays commercialized recently (e.g. Architect Brahms PCT assay in 2017, B·R·A·H·M·S PCT direct in 2018, Access PCT assay in 2019, Diasys PETIA PCT assay in 2020). Table 1 summarizes the characteristics of the current available immunoassays for PCT. Particularly, this table highlights the variety of assays, detection methods (chemiluminescence, electroluminescence, time-resolved fluorescence, or immune-turbidimetry), antibodies (monoclonal vs. polyclonal, use of one, two or even three antibodies), reagent (biotin, streptavidin, ruthenium, acridinium), sample volume (varying from 10 µL to 200 µL) and measuring concentration range. Concerning the antibodies, these could recognize different epitopes of PCT and there is generally limited information available on the PCT isoform(s) being actually measured or on cross reactivity, e.g. with PCT fragments. Liaison Brahms and Lumipulse Brahms assays reported the use of two monoclonal antibodies targeting two epitopes situated in calcitonin and katacalcin segments (Table 1). Furthermore, Brahms PCT LIA was the first commercial kit employing two monoclonal antibodies that targeted against two different binding sites: the epitope residues 96-106, part of the katacalcin segment, and residues 70-76, part of the calcitonin segment [50]. However, these assays are not predominantly used in clinical practice. In addition, to meet the need for short turnaround times, an increasing number of point-of-care tests for PCT have also been developed for a rapid clinical decision and treatment initiation, multiplying even more the diversity of commercially available assays for PCT measurement. All these technical differences could potentially contribute to a lack of comparability across results provided by different immunoassays as they may cause differences in assay performance (specificity and selectivity, susceptibility to interferences or matrix effect). As demonstrated for other biomarkers, the use of different reagents may have a significant effect on measurement reliability [60–64].

***Table 1**. Characteristics of the current commercially available immunoassays for PCT*

Immunoassay (Company)	Date of first market authorization	Market authorization	Predicate Device	Instrument	Assay principle	Antibodies and reagents	Sample volume Sample matrix	Measuring range (µg/L)
BRAHMS PCT LIA (BRAHMS Diagnostica)	2005	FDA 510(k) - CE marked	Endotoxin Activity Assay	Luminometer	Immunoluminometric assay - non automated	Two mouse anti-PCT mAb	20 µL Se, P	0.3-500
BRAHMS PCT Sensitive Kryptor (BRAHMS diagnostica)	2009	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT LIA	Kryptor Test System analyzer	Time-resolved amplified cryptate emission (TRACE) immunoassay	Sheep anti-PCT pAb cryptate labelled Mouse anti-PCT mAb XL665 labelled	50 µL Se, H, E	0.02-50
Architect BRAHMS PCT (Abbott)	2017	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Architect i2000SR analyzer	Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)	Rat anti-PCT mAb microparticles coated Mouse anti- PCT mAb acridinium-labelled conjugate	100 µL Se, L, K2	0.02-100
Vidas BRAHMS PCT (Biomérieux)	2009	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT LIA	Vidas analyzer	Enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA)	Mouse anti-PCT mAb microwells coated Mouse anti- PCT mAb alkaline phosphatase-labelled	200 µL Se, L	0.05-200
Liaison BRAHMS PCT II Gen (Diasorin)	2015	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Vidas	Liaison analyzer	Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)	Mouse anti katacalcin PCT mAb magnetic particle coated. Mouse anti calcitonin PCT mAb isoluminol labelled	225 µL Se, L	0.02-100
Lumipulse G BRAHMS PCT (Fujirebio)	2016	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Lumipulse G system	Chemiluminescence Enzyme Immunoassay	Mouse anti PCT mAb Mouse anti calcitonin PCT mAb coated particles Mouse anti katacalcin PCT mAb alkaline phosphatase labelled	60 µL Se, N, L, K2	0.02-100
Elecsys BRAHMS PCT (Roche Diagnostics)	2009	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Cobas e 411 analyzer	Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)	Streptavidin-coated microparticles Mouse anti-PCT mAb biotinylated Mouse anti-PCT mAb ruthenium labelled	30 µL Se, K2, K3, L	0.02-100
Atellica IM BRAHMS PCT (Siemens healthcare)	2018	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Atellica IM analyzer	CLIA	Mouse anti-fluorescein mAb paramagnetic particles coated Mouse anti-PCT mAb acridinium ester labelled Mouse anti-PCT mAb fluorescein labelled	100 µL Se, E, L, N	0.04-50

Alinity I BRAHMS PCT (Abbott)	n/a	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Alinity i analyzer	Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)	Rat anti-PCT mAb microparticles coated Mouse anti- PCT mAb acridinium-labelled conjugate	100 µL Se, L, K2	0.02-100
Advia Centuar BRAHMS PCT (Siemens)	2011	CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Advia centaur XP and CP analyzers	CLIA	Mouse anti-fluorescein mAb paramagnetic particles coated Mouse anti-PCT mAb acridinium ester labelled Mouse anti-PCT mAb fluorescein labelled	100 µL Se, E, H	0.02-75
Vitros BRAHMS PCT (Ortho Clincal Diagnostics)	2020	FDA 510(k) - CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	VITROS 3600 analyzer	Luminescence immunoassay	Streptavidin-coated wells Anti-PCT mAb biotin labelled Anti-PCT mAb horseradish peroxidase labelled	30 µL Se, E, L	0.03-100
Access PCT (Beckman Coulter)	2019	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Vidas	UniCel DXI or Access 2 analyzer	CLIA	Anti-PCT mAb paramagnetic particles coated (does not use biotin-streptavidin particle) Anti-PCT mAb alkaline phosphatase conjugate	35 µL Se, L, E	0.01-100
Diazyme PCT (Diazyme Laboratories)	2017	FDA 510(k) – CE marked	BRAHMS PCT Vidas	Olympus Beckman AU400 chemistry analyzer	Latex-enhance immunoturbidimetric assay	Anti-human PCT mAb latex particles coated	15 µL Se, E, L	0.2-52
Diasys PCT FS (Diasys Diagnostic GmbH)	2020	CE marked	BRAHMS PCT Sensitive Kryptor	Cobas c501 chemistry analyzer	Latex-enhance immunoturbidimetric assay	Anti-human PCT pAb latex particles coated	10 µL Se, L	0.2-50
Maglumi PCT (Shenzhen)	n/a	CE marked	n/a	Maglumi analyzer	CLIA	Mouse anti-PCT mAb nano magnetic microbeads coated Mouse anti-PCT mAb ABEI labelled	40 µL Se, E, Ewb	0.13-100

mAb : monoclonal antibody ; pAb : polyclonal antibody ;
Se : serum ; P : plasma ; H : heparin plasma ; E : EDTA plasma ; L : lithium heparin plasma ; K2 : K2EDTA plasma ; N : sodium heparin plasma ; K3 : K3EDTA plasma ; Ewb : EDTA whole blood

To assess the comparability of PCT measurement results, a number of correlation studies have been conducted but these have shown conflicting results. Indeed, some studies showed significant differences between PCT concentration obtained from different immunoassays, whereas other studies reported the opposite [65–68]. In addition, the evaluation of different external quality assessment (EQA) schemes results has shown a substantial discrepancy across the different EQA schemes: while some highlighted quite good agreement between the different assays, other EQA schemes showed the contrary [69]. Although substantial variations in the PCT concentration measured by different immunoassays were reported in several correlation studies and EQA schemes, the current clinical decision for diagnosis of sepsis and therapy monitoring is based on common clinical cutoff values regardless of the immunoassay employed for PCT measurements. Even if a good clinical concordance at clinical cutoffs has been reported in the different correlation studies [69], several studies came up to the conclusion that it would be preferable to compare results obtained from the same immunoassay when interpreting serial evaluation of PCT concentration for a given patient [70–72].

The current situation regarding the comparability of PCT measurement results may be explained either by differences in assays selectivity or a calibration issue caused by the lack of higher-order reference materials for PCT measurement and thus a lack of traceability to the SI Units. It should be noted that manufacturers offering a PCT assay belonging to the Brahms-like family participate in a harmonization program through the use of the Brahms Kryptor assay as surrogate reference method in absence of any higher order RMP and certified reference materials. However, not all assays commercially available take part in this harmonization effort, thus there is currently no commonly agreed reference material for all available PCT immunoassays at the international level. Therefore, the need for a new reference system based on higher order reference materials and/or a higher-order reference method to achieve global standardization/harmonization of PCT results worldwide has been pointed out in a number of studies [65–68,73,74].

2. IFCC working group on standardization of PCT assays (IFCC WG-PCT)

To address the question of PCT measurements reliability and comparability and more specifically to evaluate the need and the feasibility for standardization or harmonization, a dedicated IFCC working group was created in 2018. This working group gathers clinicians, biologists, in vitro diagnostic manufacturers, EQA providers and metrology institutes. The participation of all concerned stakeholders is of upmost importance for the successful implementation of a RMS. Within this working group, the efforts focused on five terms of reference (Figure 4): the development of a RMS (reference materials and procedures), the evaluation of the variability of results provided by the different commercially available PCT assays, the evaluation of the need and the feasibility for standardization of PCT assays, and the implementation of standardization of PCT assays if deemed needed and feasible.

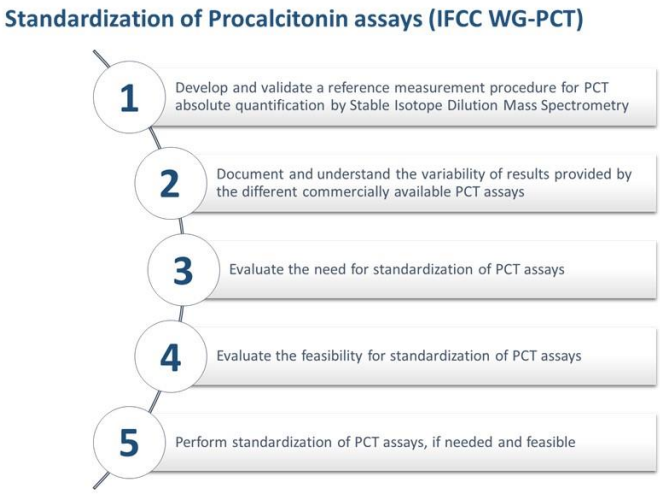


Figure 4. Terms of Reference of IFCC working group on Standardization of Procalcitonin (PCT) assays (IFCC WG-PCT)

The first term of reference consists in the development and validation of a RMP for PCT absolute quantification by stable isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS) in order to establish metrological traceability of measurement results to the SI Units. The standardization of PCT tests could only be implemented if the following prerequisites are met to achieve results comparability independent of time, location and measurement procedures [3]. First, a proper definition of the measurand should be established, i.e. clearly define what entity is intended to be measured. Then, the selectivity of the different assays should be close enough, i.e. measure the same entity. Finally, a RMS enabling to establish results traceability to the SI units should be established. This includes availability of primary reference materials, commutable secondary reference materials and a higher-order RMP meeting analytical performance specifications (APS) that are fit for purpose to meet the medical need (e.g. sufficiently small measurement uncertainties, high precision, high selectivity and high accuracy).

Definition of the clinically relevant measurand: , Measurand is defined by the International Vocabulary of Metrology as a quantity intended to be measured [7]. Defining the measurand comes down to respond to the question “What is being measured?”. At first sight the answer may seem simple, however that may be difficult to answer according to the complexity of analyte, particularly in case of proteins [8,75]. Indeed, proteins could be subjected to heterogeneity and present as a mixture of different molecular species in biological fluids such as it has been shown for human growth hormone [76], human cardiac Troponin I [8,77], brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal fragment of the BNP [78,79]. Thus, for an accurate quantitative analysis and implementation of a RMS, the isoforms of interest should be clearly defined as it has been performed for HbA1c [80]. In the case of PCT, there is currently no assay that detects the whole form of PCT, particularly the N-terminal side of the sequence to discriminate the three different PCT isoforms. Therefore, the most practical solution has been to define the measurand as total serum PCT, including PCT (1-116), PCT (2-116) and PCT (3-116) isoforms.

Selection and development of candidate reference measurement system

Isotope Dilution Mass spectrometry (IDMS) is widely applied for protein absolute quantification [76,81–89]. Thanks to its high selectivity and the use of stable-isotope-labelled (SIL) compounds as internal standards, IDMS allows accurate quantification of the measurand with low measurement uncertainties and is recognized as a primary reference method by the Consultative Committee for Amount of Substance of BIPM (Bureau International des Poids et Mesures). In a number of RMS, IDMS successfully serves as higher-order reference method and a number of IDMS-based RMPs are listed as such in JCTLM database [90]. Still, validation of an IDMS-based RMP remains a challenge for different reasons, including the need to extensively characterize purity of primary calibrators, to obtain stable-isotope-labelled (SIL) compounds which behavior is close enough to the endogenous compound to make them suitable for use as internal standards, and to reach sufficiently low limit of quantification with sufficiently small measurement uncertainties while achieving high accuracy and high precision.

In a healthy state or in the absence of infection, plasma or serum concentration of PCT is below 0.05 µg/L. Due to ion suppression phenomena occurring in mass spectrometry-based analysis, the sample preparation is critical for PCT absolute quantification in a complex serum matrix by mass spectrometry. For sample preparation, an antibody-free approach based on the physicochemical properties of PCT was preferred in contrast to immuno-affinity approaches, which are currently employed in commercially available immunoassays. After optimized sample purification, PCT is then digested into peptides with trypsin. Peptides are then quantified using high-resolution mass spectrometry in order to reduce interferences. The ID-LC MS/MS analysis consists in the separation, the fragmentation and the detection of PCT-related peptides generated by the digestion of the protein. The different strategies for targeted quantification of proteins by ID-LC MS/MS are described in Figure 5. As the selected bottom-up strategy provides an indirect detection of PCT through the quantification of peptides derived from tryptic digestion, it is crucial to select PCT-related peptides that are unique representatives of PCT protein (proteotypic peptides). Two PCT-related peptides, located in two different segments of PCT amino acid sequence, were selected to improve the specificity of the quantitative method by discriminating the different PCT cleavage forms such as NProCT, Calcitonin-GKKR-Katacalcin, Calcitonin and Katacalcin.

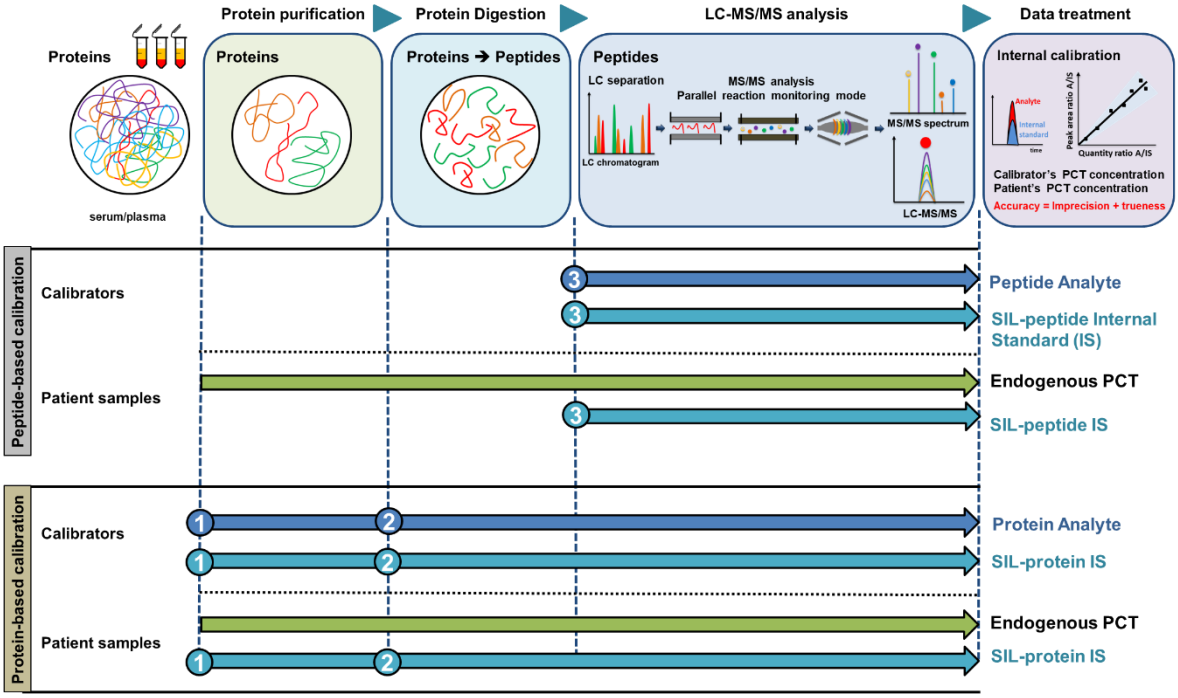


Figure 5. Different calibration strategies for procalcitonin (PCT) targeted quantification by ID-LC MS/MS.

Analyte and internal standard (IS) could be spiked at different steps of the sample preparation process: 1 – before protein purification step; 2 – after protein purification step and before protein digestion step; 3 – after digestion step and before LC-MS/MS analysis. Depending on when analyte and IS are added to calibrators or patient samples, results accuracy could be influenced by various random variabilities during the whole quantification process such as sample handling, inefficient protein purification/digestion, protein/peptides adsorption, LC injection volume or MS ion suppression/enhancement.

<u>Peptide-based calibration</u>: calibrator produced by the addition of peptide analyte and SIL-peptide internal IS after protein digestion step (3)

<u>Protein-based calibration</u>: calibrators produced by the addition of protein analyte and SIL-protein IS before (2) or after (3) protein purification step.

PCT concentration is obtained through the measurement of the concentration of the PCT-related proteotypic peptides calculated from a calibration curve that is established by measuring calibrators that are prepared by mixing known amounts of the labeled and non-labelled primary calibrators. Depending on the calibration strategy, the measured concentration of peptides might be negatively biased due to material loss during the different step of the sample preparation, incomplete protein extraction, incomplete proteolysis by trypsin, peptides loss by adsorption) [91]. The two commonly used calibration quantification strategies include peptide-based calibration or protein-based calibration, in which calibrators are prepared with synthetic PCT-related peptides or PCT recombinant protein, respectively (Figure 5). The protein-based calibration approach presents one main advantage: as the protein-based internal standard undergoes the same sample processing as the endogenous

protein, incomplete protein extraction, incomplete proteolysis by trypsin and any material loss during sample preparation steps occurring after spiking of the labeled protein are all compensated and do not affect method's accuracy. However, the characterization of protein-based primary calibrator is more challenging than for peptide-based calibrators as protein-based impurities are expected to present, impurity identification and impurities quantification is harder than for peptides. In addition, protein-based calibrators are expensive to produce and can be subject to batch to batch variations. In order to evaluate the most appropriate approach to ensure high accuracy and precision, these two approaches have been employed and compared for the development of a candidate higher-order RMP. Both peptide- and protein-based calibrators were obtained from different providers. The peptides and proteins PCT standards produced from the selected providers were then SI-traceably quantified by the primary RMP composed of amino acid reference method using ID-LC MS and correction of the contribution from impurities containing amino acids (Figure 1). The homogeneity and stability of these materials still need to be evaluated before certification of the primary reference material can be finalized.

The second term of reference consists in documenting and understanding the variability of measurement results provided by different commercially available PCT assays. The state of the art of PCT measurement shows conflicting results regarding the comparability of PCT measurement results [69]. Moreover, in almost all correlation studies available in the literature and all EQA programs, no information on the commutability of the study samples is available when the studies are performed using samples other than fresh single donations. However, this is a crucial aspect to accurately document the need for PCT standardization/harmonization. In this respect, agreement and correlation between the different PCT assays will be evaluated through the organization of an interlaboratory comparison involving most popular PCT assays and relying on samples of proven commutability. Thus, the two main tasks of second term of reference consist in the production of candidate EQA materials and the organization of a commutability study. This will result in the identification of appropriate EQA materials to properly evaluate the comparability of the different PCT assays and evaluate the need for further improving results consistency through calibration standardization.

In a recent review based on data provided from 10 EQA providers of PCT assays, the use of spiked materials was suspected to cause the inability to properly evaluate the comparability between measurement results obtained from the different commercially available PCT assays [69]. Surprisingly, the suitability of EQA materials consisting in pools of fresh unspiked human serum was not evidenced, possibly due to ethical issues and limitations in material stability and challenges to get sample collection, shipment and testing conducted in a sufficiently low period of time [69]. The fact that no data is provided regarding commutability of the materials and the measurement protocol of laboratory participants represents a major limitation to determine what lessons can be learned from such studies. In fact, various modifications/alterations of functional nature could occur during the process to produce commutable candidate material such as lyophilization, freezing, pooling, which could induce matrix effects for all or most of assays. As commutability of a reference material cannot be predicted, it has to be demonstrated against a set of authentic clinical specimens. Different EQA materials will therefore be evaluated to identify the most suitable way to consistently obtain commutable materials. Candidate EQA materials will consist in different

matrices, including frozen or lyophilized pools of human serum, artificial matrices, spiked or not with recombinant PCT from different sources. A number of EQA providers already agreed sharing their materials for inclusion in the commutability study. As recommended in the IFCC latest recommendation, commutability of the candidate EQA materials will be evaluated against a set of clinical specimens which PCT concentration brackets that of the EQA materials. Ideally, clinical specimens should consist in fresh unadulterated single donations (i.e. not pooled, not frozen, not spiked with any exogenous substance) because these are commutable by definition. However, maintaining materials stability from sample collection to testing is an important issue, it is challenging to collect within one or two days a set of 30-50 fresh single donations covering the entire concentration range, to ship the materials to all participating laboratories and to get samples tested with a sufficiently short turnaround time to maintain samples stability. It is therefore anticipated that clinical specimens will consist in frozen single donations. In such a case, the absence of freeze-thaw effect should be demonstrated beforehand. As a commutability assessment of a candidate reference material should ideally include all commercially available assays, another challenge lies in the need to collect a sufficiently large volume of each single donation to allow conducting measurements with the different assays with appropriate replication number. Although a commutability assessment should include as many PCT measurement procedures as possible, involved assay should target the same measurand and have adequate APS. The measurement results obtained will be analyzed using the difference in bias approach [92]. An important prerequisite will be to select appropriate acceptance criteria for commutability, ie. to decide what level of non-commutability is acceptable, which is the current topic of the IFCC Working Group on Commutability in Metrological Traceability (WG-CMT). It is expected that results of the commutability will allow identifying the manufacturing process leading to the highest commutability level. An EQA scheme relying on commutable material(s) will allow to accurately document the current state of the art of harmonization of PCT results and consequently to determine whether standardization is needed or not to improve the comparability of the results provided from the different PCT assays used in routine clinical practice.

The third term of reference consists in evaluating the need for standardization of PCT assays through a common calibration with commutable calibrators value assigned with the ID-LC HRMS RMP. The consultation of the International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results (ICHCLR) has already revealed that standardization/harmonization of PCT assays is considered as a high priority due to the growing utilization of PCT and to the implementation and integration in clinical guidelines and antimicrobial stewardship programs [93]. Moreover, a high medical impact of this standardization was pointed out by the ICHCLR. The strength of the IFCC working group on PCT assays, that gathers almost all IVD manufacturers marketing PCT assays, is particularly relevant for the objective of this term of reference. Indeed, the consultation of assay manufacturers was initiated with the creation of the working group and reveals that the need and demand for standardization on PCT assays differ across assay manufacturers. For some commercially available PCT assays (BRAHMS licensed assays group), a harmonization system is already in place through the use of the Kryptor method as a consensus reference method. Thus, for this group of methods, the recalibration of PCT assays is not perceived as a priority. On the contrary, for PCT assays other than BRAHMS PCT assays, there is currently no common calibrators nor reference system. Thus, standardization or harmonization is needed for these assays. Although views differ, all IFCC WG-PCT members

agreed that commutable EQA materials are needed to accurately estimate between-method agreement (second term of reference) and thus assess the need for standardization of PCT.

The fourth term of reference consists in evaluating the feasibility for standardization of PCT assays through common calibration with commutable calibrators, value assigned with the ID-LC HRMS RMP. This activity is highly dependent on the activities of the first and second terms of reference. Indeed, if a RMP is not available or does not meet appropriate APS, standardization will not be feasible. When validated, it will be necessary to evaluate if the candidate reference method by ID-LC MS/MS is robust enough at PCT concentration of clinical interest and if it enables to properly establish results traceability to the SI Units with sufficiently low measurement uncertainty. In addition, a sufficiently strong correlation between the different commercially available PCT assays and the candidate reference methods by ID-LC HRMS has to be demonstrated. Finally, the availability of the commutable calibrators has to be ensured. The feasibility of the standardization of PCT assays will thus be assessed if all these criteria are met.

The fifth term of reference consists in implementing the standardization of PCT assays at the global scale, if it appears desirable and feasible. If all the conditions for feasibility are met and if discrepant results between the different PCT assays are still observed from the EQA scheme relying on commutable EQA materials, standardization of PCT assays could be done either through panels of patient or commutable secondary calibrators value assigned with the ID-LC HRMS RMP. As recalibration of commercially available assays for PCT would require important efforts from IVD manufacturers, there should be strong evidence that standardization is necessary and feasible. EQA schemes will be needed to assess the accuracy and comparability of PCT measurement and evaluate the impact of the recalibration. Subsequently, it would be necessary to assess if the current clinical decision used in clinical practice need to be reconsidered or not.

Conclusion

Due to the growing threat of antimicrobial resistance and high mortality associated with sepsis, having accurate and comparable PCT results appears of high importance. Still, in absence of neither any higher order reference material nor any accuracy-based program relying on EQA materials of proven commutability, the current state of the art regarding comparability of PCT results across the different commercially available assays remains to be properly documented. In this context, the IFCC Working Group on standardization of PCT assays has initiated activities to fill this gap. A higher order RMP and commutable reference material are under development to evaluate the necessity and the feasibility for establishing and maintaining a new RMS for PCT. As cooperation from all stakeholders is of major importance, the working group gathers experts from National Metrology Institutes, calibration laboratories, clinicians, biologists, EQA providers and assay manufacturers.

Acknowledgements: This paper is written on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine working group on standardization of PCT assays. The authors thank all working group members: Qinde Liu and Yizhao Chen (HSA), Klaus Schneider (Fresenius University), Patricia Kaiser (Instand e.V.), Pierre Hausfater (AP-HP), Philipp Schütz (University of Basel), Christos Tsatsanis (University of Crete), Anne-Marie Dupuy (University Hospital of Montpellier), Stefano Pastori (Grande Ospedale Metropolitano Niguarda), Jens Pfannkuche (Panaceca UG), Chong Yuan & Birger Machetanz (Diazyme), Michael Rottmann (Roche Diagnostics), Andrew Rybin & Neil Parker (Siemens Healthineers), Jutta Odarjuk & Barbara Thomas (Thermo Fisher Scientific), Michelle Solari, & Kim Paulsen (Beckman Coulter), Scott Ruetten & Lauren Seaver (Abbott), Helene Briand & Carole Tourneur (Biomerieux), Luca Pallavicini & Nadia Corocher (DiaSorin), Godwin Ogbonna, Maria Patru, Philip Bryan & Sameh Zion (Ortho CD), Matthias Grimmler & Thomas Masetto (DiaSys), Piitu Jauria (Radiometer).

We would like to thank Dr. Sophie Vaslin-Reimann and Dr. Béatrice Lalere from LNE for scientific discussions.

Funding: This work was supported by the European Metrology Programme for Innovation and Research (EMPIR) joint research projects [15HLT07] “AntiMicroResist” and [18HLT03] “SEPTIMET” which have received funding from the EMPIR programme co-financed by the Participating States and the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme. Huu-Hien Huynh was supported by a CIFRE scholarship provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie)

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References:

[1] A. Ngo, P. Gandhi, W.G. Miller, Frequency that Laboratory Tests Influence Medical Decisions, J. Appl. Lab. Med. 1 (2017) 410–414. https://doi.org/10.1373/jalm.2016.021634.

[2] Sciex, Trends and outlook for clinical diagnostics testing, (2015). https://sciex.com/Documents/brochures/clinical_diagnostics_trends2015.pdf (accessed August 29, 2020).

[3] H.W. Vesper, G.L. Myers, W.G. Miller, Current practices and challenges in the standardization and harmonization of clinical laboratory tests, Am. J. Clin. Nutr. 104 (2016) 907S-912S. https://doi.org/10.3945/ajcn.115.110387.

[4] D. Armbruster, Metrological Traceability of Assays and Comparability of Patient Test Results, Clin. Lab. Med. 37 (2017) 119–135. https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.09.010.

[5] M. Panteghini, J.C. Forest, Standardization in laboratory medicine: New challenges, Clin. Chim. Acta. 355 (2005) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.12.003.

[6] G.H. White, Metrological traceability in clinical biochemistry, Ann. Clin. Biochem. 48 (2011) 393–409. https://doi.org/10.1258/acb.2011.011079.

[7] Bipm, International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms (VIM 3rd edition JCGM 200:2012), (2012). https://www.bipm.org/fr/publications/guides/vim.html (accessed August 29, 2020).

[8] D.M. Bunk, Reference materials and reference measurement procedures: an overview from a national metrology institute., Clin. Biochem. Rev. 28 (2007) 131–137. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392127 (accessed August 29, 2020).

[9] I. Zegers, R. Beetham, T. Keller, J. Sheldon, D. Bullock, F. MacKenzie, S. Trapmann, H. Emons, H. Schimmel, The Importance of Commutability of Reference Materials Used as Calibrators: The Example of Ceruloplasmin, Clin. Chem. 59 (2013) 1322–1329. https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.201954.

[10] W.G. Miller, J. Budd, N. Greenberg, C. Weykamp, H. Althaus, H. Schimmel, M. Panteghini, V. Delatour, F. Ceriotti, T. Keller, D. Hawkins, C. Burns, R. Rej, J.E. Camara, F. MacKenzie, E. van der Hagen, H. Vesper, IFCC Working Group Recommendations for Correction of Bias Caused by Noncommutability of a Certified Reference Material Used in the Calibration Hierarchy of an End-User Measurement Procedure, Clin. Chem. 66 (2020) 769–778. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa048.

[11] W.G. Miller, G.R. Jones, G.L. Horowitz, C. Weykamp, Proficiency Testing/External Quality Assessment: Current Challenges and Future Directions, Clin. Chem. 57 (2011) 1670–1680. https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.168641.

[12] V. Delatour, N. Clouet-Foraison, S. Jaisson, P. Kaiser, P. Gillery, Beware of Noncommutability of External Quality Assessment Materials for Hemoglobin A1c, Clin. Chem. 66 (2020) 390–391. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvz024.

[13] W.G. Miller, G.L. Myers, Commutability Still Matters, Clin. Chem. 59 (2013) 1291–1293. https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.208785.

[14] C. Weykamp, W.G. John, A. Mosca, T. Hoshino, R. Little, J.-O. Jeppsson, I. Goodall, K. Miedema, G. Myers, H. Reinauer, D.B. Sacks, R. Slingerland, C. Siebelder, The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report, Clin. Chem. 54 (2008) 240–248. https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097402.

[15] T.J. Hoerger, J.S. Wittenborn, W. Young, A cost-benefit analysis of lipid standardization in the United States, Prev. Chronic Dis. 8 (2011) A136. www.cdc.gov/pcd/issues/2011/nov/10_0253.htm (accessed August 29, 2020).

[16] R. Sager, A. Kutz, B. Mueller, P. Schuetz, Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited, BMC Med. 15 (2017) 15. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0795-7.

[17] P. Schuetz, A. Beishuizen, M. Broyles, R. Ferrer, G. Gavazzi, E.H. Gluck, J. Gonzalez Del Castillo, J.U. Jensen, P.L. Kanizsai, A.L.H. Kwa, S. Krueger, C.E. Luyt, M. Oppert, M. Plebani, S.A. Shlyapnikov, G. Toccafondi, J. Townsend, T. Welte, K. Saeed, Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: An international experts consensus on optimized clinical use, Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) 1308–1318. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1181.

[18] S.J. Kim, S.O. Hwang, Y.W. Kim, J.H. Lee, K.C. Cha, Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis/septic shock in the emergency department; a study based on Sepsis-3 definition, Am. J. Emerg. Med. 37 (2019) 272–276. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.05.047.

[19] D. Liu, L. Su, G. Han, P. Yan, L. Xie, Prognostic value of procalcitonin in adult patients with sepsis: A systematic review and meta-analysis, PLoS One. 10 (2015) e0129450. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129450.

[20] F.M. Brunkhorst, K. Wegscheider, Z.F. Forycki, R. Brunkhorst, Procalcitonin for early diagnosis and differentation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock, Intensive Care Med. Suppl. 26 (2000) S148–S152. https://doi.org/10.1186/cc469.
[21] S. Harbarth, K. Holeckova, C. Froidevaux, D. Pittet, B. Ricou, G.E. Grau, L. Vadas, J. Pugin, G.S. Network, Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 (2001) 396–402. https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.3.2009052.
[22] F. Müller, M. Christ-Crain, T. Bregenzer, M. Krause, W. Zimmerli, B. Mueller, P. Schuetz, P.S. Group, Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: A prospective cohort trial, Chest. 138 (2010) 121–129. https://doi.org/10.1378/chest.09-2920.
[23] P. Schuetz, Y. Wirz, R. Sager, M. Christ-Crain, D. Stolz, M. Tamm, L. Bouadma, C.E. Luyt, M. Wolff, J. Chastre, F. Tubach, K.B. Kristoffersen, O. Burkhardt, T. Welte, S. Schroeder, V. Nobre, L. Wei, H.C. Bucher, N. Bhatnagar, D. Annane, K. Reinhart, A. Branche, P. Damas, M. Nijsten, D.W. de Lange, R.O. Deliberato, S.S. Lima, V. Maravić-Stojković, A. Verduri, B. Cao, Y. Shehabi, A. Beishuizen, J.U.S. Jensen, C. Corti, J.A. Van Oers, A.R. Falsey, E. de Jong, C.F. Oliveira, B. Beghe, M. Briel, B. Mueller, Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections, Cochrane Database Syst. Rev. (2017) CD007498. https://doi.org/10.1002/14651858.CD007498.pub3.
[24] WHO, Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis, (2017). http://www.who.int/servicedeliverysafety/areas/sepsis/en/ (accessed August 29, 2020).
[25] WHO, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, (2017). http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ (accessed August 29, 2020).
[26] APO, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, (2016). https://apo.org.au/node/63983 (accessed August 29, 2020).
[27] K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F.R. Machado, R.D. Schachter, S. Finfer, Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution, N. Engl. J. Med. 377 (2017) 414–417. https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170.
[28] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kievlan, D. V. Colombara, K.S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F.R. Machado, K.K. Reinhart, K. Rowan, C.W. Seymour, R.S. Watson, T.E. West, F. Marinho, S.I. Hay, R. Lozano, A.D. Lopez, D.C. Angus, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study, Lancet. 395 (2020) 200–211. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
[29] P.M. Broad, A.J. Symes, R. V. Thakker, R.K. Craig, Structure and methylation of the human calcitonin/α-CGRP gene, Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6999–7011. https://doi.org/10.1093/nar/17.17.6999.
[30] A.L. Vijayan, S. Ravindran, R. Saikant, S. Lakshmi, R. Kartik, G. Manoj, Procalcitonin: A promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy, J. Intensive Care. 5 (2017) 51. https://doi.org/10.1186/s40560-017-0246-8.
[31] K.L. Becker, E.S. Nylén, J.C. White, B. Müller, R.H. Snider, Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: A journey from calcitonin back to its precursors, J. Clin. Endocrinol. Metab. 89 (2004) 1512–1525. https://doi.org/10.1210/jc.2002-021444.
[32] B. Müller, K.L. Becker, Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis, Swiss Med Wkly. 131 (2001) 595–602.
[33] M. Oberhoffer, I. Stonans, S. Russwurm, E. Stonane, H. Vogelsang, U. Junker, L. Jäger, K. Reinhart, Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro, J. Lab. Clin. Med. 134 (1999) 49–55. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90053-7.
[34] S. Wrenger, T. Kähne, C. Bohuon, W. Weglöhner, S. Ansorge, D. Reinhold, Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV), FEBS Lett. 466 (2000) 155–159. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01779-2.
[35] W. Weglöhner, J. Struck, C. Fischer-Schulz, N.G. Morgenthaler, A. Otto, C. Bohuon, A. Bergmann, Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis, Peptides. 22 (2001) 2099–2103. https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00541-1.
[36] D. Gendrel, J. Raymond, J. Coste, F. Moulin, M. Lorrot, S. Guérin, S. Ravilly, H. Lefèvre, C. Royer, C. Lacombe, P. Palmer, C. Bohuon, Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections, Pediatr. Infect. Dis. J. 18 (1999) 875–881. https://doi.org/10.1097/00006454-199910000-

00008.
[37] H. Lee, Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases, Korean J. Intern. Med. 28 (2013) 285–291. https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.3.285.
[38] P. Maruna, K. Nedelníková, R. Gürlich, Physiology and genetics of procalcitonin, Physiol Res. 49 (2000) S57-61.
[39] P. Schuetz, W. Albrich, B. Mueller, Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: Past, present and future, BMC Med. 9 (2011) 107. https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-107.
[40] C.C. Lee, A.L.H. Kwa, A. Apisarnthanarak, J.Y. Feng, E.H. Gluck, A. Ito, A. Karuniawati, P. Periyasamy, B. Pratumvinit, J. Sharma, R. Solante, S. Swaminathan, N. Tyagi, D.M. Vu, K. Zirpe, P. Schuetz, Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship in Asia-Pacific countries: Adaptation based on an expert consensus meeting, Clin. Chem. Lab. Med. 58 (2020) 1983–1991. https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1122.
[41] E. de Jong, J.A. van Oers, A. Beishuizen, P. Vos, W.J. Vermeijden, L.E. Haas, B.G. Loef, T. Dormans, G.C. van Melsen, Y.C. Kluiters, H. Kemperman, M.J. van den Elsen, J.A. Schouten, J.O. Streefkerk, H.G. Krabbe, H. Kieft, G.H. Kluge, V.C. van Dam, J. van Pelt, L. Bormans, M.B. Otten, A.C. Reidinga, H. Endeman, J.W. Twisk, E.M.W. van de Garde, A.M.G.A. de Smet, J. Kesecioglu, A.R. Girbes, M.W. Nijsten, D.W. de Lange, Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: A randomised, controlled, open-label trial, Lancet Infect. Dis. 16 (2016) 819–827. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00053-0.
[42] M.A. Meier, A. Branche, O.L. Neeser, Y. Wirz, S. Haubitz, L. Bouadma, M. Wolff, C.E. Luyt, J. Chastre, F. Tubach, M. Christ-Crain, C. Corti, J.U.S. Jensen, R.O. Deliberato, K.B. Kristoffersen, P. Damas, V. Nobre, C.F. Oliveira, Y. Shehabi, D. Stolz, M. Tamm, B. Mueller, P. Schuetz, Procalcitonin-guided Antibiotic Treatment in Patients with Positive Blood Cultures: A Patient-level Meta-analysis of Randomized Trials, Clin. Infect. Dis. 69 (2019) 388–396. https://doi.org/10.1093/cid/ciy917.
[43] K. Jeon, J.K. Suh, E.J. Jang, S. Cho, H.G. Ryu, S. Na, S.B. Hong, H.J. Lee, J.Y. Kim, S.M. Lee, Procalcitonin-guided treatment on duration of antibiotic therapy and cost in septic patients (PRODA): A multi-center randomized controlled trial, J. Korean Med. Sci. 34 (2019) e110. https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e110.
[44] P. Schuetz, R. Birkhahn, R. Sherwin, A.E. Jones, A. Singer, J.A. Kline, M.S. Runyon, W.H. Self, D.M. Courtney, R.M. Nowak, D.F. Gaieski, S. Ebmeyer, S. Johannes, J.C. Wiemer, A. Schwabe, N.I. Shapiro, Serial procalcitonin predicts mortality in severe sepsis patients: Results from the multicenter procalcitonin monitoring SEpsis (MOSES) Study, Crit. Care Med. 45 (2017) 781–789. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002321.
[45] O. Burkhardt, S. Ewig, U. Haagen, S. Giersdorf, O. Hartmann, K. Wegscheider, E. Hummers-Pradier, T. Welte, Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection, Eur. Respir. J. 36 (2010) 601–607. https://doi.org/10.1183/09031936.00163309.
[46] W. Long, X. Deng, Y. Zhang, G. Lu, J. Xie, J. Tang, Procalcitonin guidance for reduction of antibiotic use in low-risk outpatients with community-acquired pneumonia, Respirology. 16 (2011) 819–824. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.01978.x.
[47] L. Bouadma, C.E. Luyt, F. Tubach, C. Cracco, A. Alvarez, C. Schwebel, F. Schortgen, S. Lasocki, B. Veber, M. Dehoux, M. Bernard, B. Pasquet, B. Régnier, C. Brun-Buisson, J. Chastre, M. Wolff, Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial, Lancet. 375 (2010) 463–474. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61879-1.
[48] P. Schuetz, M. Briel, M. Christ-Crain, D. Stolz, L. Bouadma, M. Wolff, C.E. Luyt, J. Chastre, F. Tubach, K.B. Kristoffersen, L. Wei, O. Burkhardt, T. Welte, S. Schroeder, V. Nobre, M. Tamm, N. Bhatnagar, H.C. Bucher, B. Mueller, Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: An individual patient data meta-analysis, Clin. Infect. Dis. 55 (2012) 651–662. https://doi.org/10.1093/cid/cis464.
[49] W.C. Albrich, F. Dusemund, B. Bucher, S. Meyer, R. Thomann, F. Kühn, S. Bassetti, M. Sprenger, E. Bachli, T. Sigrist, M. Schwietert, D. Amin, P. Hausfater, E. Carre, J. Gaillat, P. Schuetz, K. Regez, R. Bossart, U. Schild, B. Mueller, Effectiveness and safety of procalcitonin-guided antibiotic therapy in lower respiratory tract infections in "real life": An international, multicenter poststudy survey (ProREAL), Arch. Intern. Med. 172 (2012) 715–722. https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.770.
[50] R.A. Balk, S.S. Kadri, Z. Cao, S.B. Robinson, C. Lipkin, S.A. Bozzette, Effect of Procalcitonin Testing on Health-care Utilization and Costs in Critically Ill Patients in the United States, Chest.

151 (2017) 23–33. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.06.046.
[51] D.J. Pepper, J. Sun, C. Rhee, J. Welsh, J.H. Powers, R.L. Danner, S.S. Kadri, Procalcitonin-Guided Antibiotic Discontinuation and Mortality in Critically Ill Adults: A Systematic Review and Meta-analysis, Chest. 155 (2019) 1109–1118. https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.029.
[52] G. Lippi, M. Plebani, Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis, Clin. Chim. Acta. 505 (2020) 190–191. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.004.
[53] G. Lippi, M. Plebani, Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection, Clin. Chem. Lab. Med. 58 (2020) 1131–1134. https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0198.
[54] IFCC, IFCC Information Guide on COVID-19 Tuesday 14 April updates, (2020). https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/ (accessed September 15, 2020).
[55] J. bo Xu, C. Xu, R. bing Zhang, M. Wu, C. kun Pan, X. jie Li, Q. Wang, F. fang Zeng, S. Zhu, Associations of procalcitonin, C-reaction protein and neutrophil-to-lymphocyte ratio with mortality in hospitalized COVID-19 patients in China, Sci. Rep. 10 (2020) 15058. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72164-7.
[56] N. Vazzana, F. Dipaola, S. Ognibene, Procalcitonin and secondary bacterial infections in COVID-19: association with disease severity and outcomes, Acta Clin. Belg. 23 (2020) 1–5. https://doi.org/10.1080/17843286.2020.1824749.
[57] M. Meisner, Update on Procalcitonin Measurements, Ann. Lab. Med. 34 (2014) 263–273. https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.4.263.
[58] M. Jin, A.I. Khan, Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis, Lab. Med. 41 (2010) 173–177. https://doi.org/10.1309/LMQ2GRR4QLFKHCH9.
[59] E. Gluck, H.B. Nguyen, K. Yalamanchili, M. McCusker, J. Madala, F.A. Corvino, X. Zhu, R. Balk, Real-world use of procalcitonin and other biomarkers among sepsis hospitalizations in the United States: A retrospective, observational study, PLoS One. 13 (2018) e0205924. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205924.
[60] N.J. Rulander, D. Cardamone, M. Senior, P.J. Snyder, S.R. Master, Interference from anti-streptavidin antibody, Arch. Pathol. Lab. Med. 137 (2013) 1141–1146. https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0270-CR.
[61] A. Gessl, S. Blueml, C. Bieglmayer, R. Marculescu, Anti-ruthenium antibodies mimic macro-TSH in electrochemiluminescent immunoassay, Clin. Chem. Lab. Med. 52 (2014) 1589–1594. https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0067.
[62] M.J. Vos, J.M.M. Rondeel, G.S. Mijnhout, E. Endert, Immunoassay interference caused by heterophilic antibodies interacting with biotin, Clin. Chem. Lab. Med. 55 (2017) e122–e126. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0786.
[63] M. Ostrowska, Z. Bartoszewicz, T. Bednarczuk, K. Walczak, W. Zgliczyński, P. Glinicki, The effect of biotin interference on the results of blood hormone assays, Endokrynol. Pol. 70 (2019) 102–121. https://doi.org/10.5603/EP.a2018.0084.
[64] FDA, The FDA Warns that Biotin May Interfere with Lab Tests: FDA Safety Communication, (2017). https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/fda-warns-biotin-may-interfere-lab-tests-fda-safety-communication (accessed August 29, 2020).
[65] A. Soh, L. Binder, M. Clough, M.H. Hernandez, G. Lefèvre, K. Mostert, T.B. Nguyen, K.M. Otte, O. Portakal, M.S. Sandri, J.L. Yen, J. Huang, A. Beshiri, Comparison of the novel ARCHITECT procalcitonin assay with established procalcitonin assay systems, Pract. Lab. Med. 12 (2018) e00110. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2018.e00110.
[66] A.B. Chambliss, J. Hayden, J.M. Colby, Evaluation of procalcitonin immunoassay concordance near clinical decision points, Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) 1414–1421. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1362.
[67] G. Lippi, G.L. Salvagno, M. Gelati, M. Pucci, C. Lo Cascio, D. Demonte, D. Faggian, M. Plebani, Two-center comparison of 10 fully-automated commercial procalcitonin (PCT) immunoassays, Clin. Chem. Lab. Med. 58 (2019) 77–84. https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0888.
[68] A. Eidizadeh, A.R. Asif, N. Von Ahsen, L. Binder, M. Schnelle, Differences in procalcitonin measurements between three BRAHMS-partnered immunoassays (Liaison, Elecsys and Architect), Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) e207–e220. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0916.
[69] H.H. Huynh, A. Boeuf, J. Pfannkuche, P. Schuetz, M. Plebani, P. Kaiser, M. Thelen, T. Badrick, A. Kessler, B. Poggi, G. Nordin, U. Tiikkainen, G.J. Davies, D. Kesseler, J. Vinh, V. Delatour, Harmonization status of procalcitonin measurements: what correlation studies and EQA

schemes tell us ?, n.d.
[70] M. Dipalo, L. Guido, G. Micca, S. Pittalis, M. Locatelli, A. Motta, V. Bianchi, T. Callegari, R. Aloe, G. Da Rin, G. Lippi, Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays, Pract. Lab. Med. 2 (2015) 22–28. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2015.07.001.
[71] O. Ruzzenente, G.L. Salvagno, M. Gelati, G. Lippi, Analytical evaluation of the novel Lumipulse G BRAHMS procalcitonin immunoassay, Pract. Lab. Med. 6 (2016) 8–13. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2016.07.001.
[72] E. Leung, Comparison of a New Automated Abbott Architect Procalcitonin Assay with Biomerieux Vidas and Roche Elecsys Methods, J. Clin. Lab. Med. 2 (2017). https://doi.org/10.16966/2572-9578.117.
[73] M. Dipalo, C. Gnocchi, P. Avanzini, R. Musa, M. Di Pietro, R. Aloe, Comparison of procalcitonin assays on KRYPTOR and LIAISON® XL analyzers, Diagnostics. 9 (2019) 94. https://doi.org/10.3390/diagnostics9030094.
[74] A.M. Dupuy, A.S. Bargnoux, R. Larcher, A. Merindol, T. Masetto, S. Badiou, J.P. Cristol, Bioanalytical Performance of a New Particle-Enhanced Method for Measuring Procalcitonin, Diagnostics. 10 (2020) 461. https://doi.org/10.3390/diagnostics10070461.
[75] H. Schimmel, I. Zegers, H. Emons, Standardization of protein biomarker measurements: Is it feasible?, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 70 (2010) 27–33. https://doi.org/10.3109/00365513.2010.493362.
[76] C. Pritchard, K.J. Groves, S. Biesenbruch, G. Oconnor, A.E. Ashcroft, C. Arsene, D. Schulze, M. Quaglia, Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: Essential considerations, Anal. Chem. 86 (2014) 6525–6532. https://doi.org/10.1021/ac501032q.
[77] D.M. Bunk, M.J. Welch, Characterization of a New Certified Reference Material for Human Cardiac Troponin I, Clin. Chem. 52 (2006) 212–219. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051359.
[78] T. Seidler, C. Pemberton, T. Yandle, E. Espiner, G. Nicholls, M. Richards, The amino terminal regions of proBNP and proANP oligomerise through leucine zipper-like coiled-coil motifs, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (1999) 495–501. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0225.
[79] U. Schellenberger, J. O'Rear, A. Guzzetta, R.A. Jue, A.A. Protter, N. Stephen Pollitt, The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein, Arch. Biochem. Biophys. 451 (2006) 160–166. https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.03.028.
[80] J.O. Jeppsson, U. Kobold, J. Barr, A. Finke, W. Hoelzel, T. Hoshino, K. Miedema, A. Mosca, P. Mauri, R. Paroni, L. Thienpont, M. Umemoto, C. Weykamp, Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood, Clin. Chem. Lab. Med. 40 (2002) 78–89. https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.016.
[81] T. Kinumi, R. Mizuno, A. Takatsu, Quantification of serum C-peptide by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Enhanced detection using chemical modification and immunoaffinity purification, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 953–954 (2014) 138–142. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.019.
[82] A. Leinenbach, J. Pannee, T. Dülffer, A. Huber, T. Bittner, U. Andreasson, J. Gobom, H. Zetterberg, U. Kobold, E. Portelius, K. Blennow, I.S.D.W.G. on C. Proteins, Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid-β in Cerebrospinal fluid, Clin. Chem. 60 (2014) 987–994. https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.220392.
[83] J.C. Lieske, O. Bondar, W.G. Miller, L.M. Bachmann, A.S. Narva, Y. Itoh, I. Zegers, H. Schimmel, K. Phinney, D.M. Bunk, A reference system for urinary albumin: current status, Clin. Chem. Lab. Med. 51 (2013) 981–989. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0768.
[84] A. V Stoyanov, S. Connolly, C.L. Rohlfing, E. Rogatsky, D. Stein, R.R. Little, Human C-peptide Quantitation by LC-MS Isotope-Dilution Assay in Serum or Urine Samples, J. Chromatogr. Sep. Tech. 04 (2013) 172. https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000172.
[85] A.F. Torma, K. Groves, S. Biesenbruch, C. Mussell, A. Reid, S. Ellison, R. Cramer, M. Quaglia, A candidate liquid chromatography mass spectrometry reference method for the quantification of the cardiac marker 1-32 B-type natriuretic peptide, Clin. Chem. Lab. Med. 55 (2017) 1397–1406. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1054.
[86] T.T.H. Tran, J. Lim, J. Kim, H.J. Kwon, G.C. Kwon, J.S. Jeong, Fully international system of units-traceable glycated hemoglobin quantification using two stages of isotope-dilution high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1513 (2017) 183–193. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.056.

[87] P. Kaiser, T. Akerboom, R. Ohlendorf, H. Reinauer, Liquid Chromatography–Isotope Dilution–Mass Spectrometry as a New Basis for the Reference Measurement Procedure for Hemoglobin A1c Determination, Clin. Chem. 56 (2010) 750–754. https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.139477.

[88] H. Liu, L. Wong, S. Yong, Q. Liu, T.K. Lee, Achieving comparability with IFCC reference method for the measurement of hemoglobin A1c by use of an improved isotope-dilution mass spectrometry method, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 7579–7587. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8961-2.

[89] H. Liu, L. Wong, S. Yong, Q. Liu, T.L. Teo, T.K. Lee, T.P. Loh, S.K. Sethi, M.S. Wong, S.M.D.S. Cosio, C.K.M. Ho, J.W.S. Setoh, S.F.M. Lim, G.L.L. Lee, H. Khalid, S. Lim, C.W. Lam, M.Y. Lee, C.P. Yeo, P.R. Chincholkar, R. Hawkins, B.Y. Ng, Commutable whole blood reference materials for hemoglobin A1c validated on multiple clinical analyzers, Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) 648–658. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0861.

[90] BIPM/JCTLM, Database of higher-order reference materials, measurement methods/procedures and services, (2020). https://www.bipm.org/jctlm/ (accessed September 15, 2020).

[91] A.N. Hoofnagle, J.R. Whiteaker, S.A. Carr, E. Kuhn, T. Liu, S.A. Massoni, S.N. Thomas, R. Reid Townsend, L.J. Zimmerman, E. Boja, J. Chen, D.L. Crimmins, S.R. Davies, Y. Gao, T.R. Hiltke, K.A. Ketchum, C.R. Kinsinger, M. Mesri, M.R. Meyer, W.J. Qian, R.M. Schoenherr, M.G. Scott, T. Shi, G.R. Whiteley, J.A. Wrobel, C. Wu, B.L. Ackermann, R. Aebersold, D.R. Barnidge, D.M. Bunk, N. Clarke, J.B. Fishman, R.P. Grant, U. Kusebauch, M.M. Kushnir, M.S. Lowenthal, R.L. Moritz, H. Neubert, S.D. Patterson, A.L. Rockwood, J. Rogers, R.J. Singh, J.E. Van Eyk, S.H. Wong, S. Zhang, D.W. Chan, X. Chen, M.J. Ellis, D.C. Liebler, K.D. Rodland, H. Rodriguez, R.D. Smith, Z. Zhang, H. Zhang, A.G. Paulovich, Recommendations for the generation, quantification, storage, and handling of peptides used for mass spectrometry-based assays, Clin. Chem. 62 (2016) 48–69. https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.250563.

[92] W.G. Miller, H. Schimmel, R. Rej, N. Greenberg, F. Ceriotti, C. Burns, J.R. Budd, C. Weykamp, V. Delatour, G. Nilsson, F. MacKenzie, M. Panteghini, T. Keller, J.E. Camara, I. Zegers, H.W. Vesper, IFCC Working Group Recommendations for Assessing Commutability Part 1: General Experimental Design, Clin. Chem. 64 (2018) 447–454. https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.277525.

[93] ICHCLR, Measurands, (n.d.). https://www.harmonization.net/measurands/ (accessed August 29, 2020).

Conclusions

En raison de la forte utilisation des dosages de la PCT dans la prise en charge des patients souffrant de sepsis et dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques, l'obtention de résultats justes et comparables de la mesure de concentration de la PCT est primordiale. Or, à l'état actuel, la comparabilité des résultats obtenus entre les différentes méthodes utilisées en routine reste à être démontrée correctement du fait du manque de matériaux de référence certifiés (et donc commutables) et d'EEQ basée sur un matériau commutable. La situation actuelle sera améliorée à travers les différentes activités du groupe de travail IFCC WG-PCT, particulièrement sur l'organisation d'une étude de commutabilité afin d'identifier un matériel adapté à l'évaluation de la comparabilité des résultats et le développement d'une méthode de référence d'ordre supérieur afin d'établir une chaîne de traçabilité des résultats de dosage de la PCT. Le LNE, en tant qu'Institut National de Métrologie et membre coordinateur de l'IFCC WG-PCT, a plus particulièrement initié le développement d'une méthode de référence d'ordre supérieur pour la quantification de la PCT dans le sérum humain au travers de ce projet de thèse. Selon la stratégie de quantification décrite dans le premier objectif de l'IFCC WG-PCT, la méthode développée repose sur une quantification par ID-LC-MS/MS par l'approche bottom-up. Cela nécessite donc d'optimiser la préparation d'échantillons et les conditions LC-MS/MS pour assurer une quantification à une concentration inférieure au nanogramme par millilitre dans une matrice complexe. Deux approches d'étalonnage sont envisagées pour la quantification de la PCT dans le sérum humain : l'étalonnage peptidique et l'étalonnage protéique. Quelle que soit l'approche utilisée, afin d'assurer une quantification juste et traçable aux unités SI, il faut donc développer des étalons primaires de type peptidique ou protéique bien caractérisés et traçables aux unités SI pour assurer la continuité de la chaîne de traçabilité métrologique.

Chapitre II
Développement d'une méthode de quantification de la PCT en sérum

II.1 Sélection des peptides pour la quantification de la PCT en sérum par une approche bottom-up..... 178

II.2 Quantification et caractérisation des étalons primaires 181

II.2.1 Etalon primaire peptidique 185

II.2.2 Etalon primaire protéique 204

II.3 Méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain 217

II.3.1 Optimisation des conditions chromatographiques 218

II.3.2 Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse 231

II.3.3 Optimisation de la méthode de préparation d'échantillon 239

II.3.4 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage peptidique..... 254

Article 3 : Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin at sub-nanogram per milliliter level in human serum using a peptide-based calibration..... 257

II.3.5 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage protéique 300

Article 4 : A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator..... 303

Comme décrit dans le chapitre précédent, afin d'assurer la traçabilité des méthodes de dosages de la PCT utilisées dans les LBM, il est important de disposer de méthode(s) de référence mais également de matériaux de référence. Ce chapitre est divisé en trois parties. La première partie porte sur la sélection des peptides pour la quantification de la PCT en sérum. La deuxième partie est consacrée à la caractérisation et à la détermination de la concentration exacte des étalons primaires de type peptidique et protéique. La troisième partie porte sur le développement et la validation des méthodes de quantification de la PCT dans le sérum humain par ID-LC-MS/MS.

II.1 Sélection des peptides pour la quantification de la PCT en sérum par une approche bottom-up

Dans la stratégie de quantification de protéines en LC-MS par l'approche *bottom-up*, il est important de sélectionner des peptides protéotypiques qui sont spécifiques à la protéine d'intérêt et facilement détectables par l'analyse LC-MS. Pour la sélection de ces peptides spécifiques à la PCT, une étude théorique a tout d'abord été réalisée par une digestion *in silico* de la PCT. Le choix de la protéase utilisée pour cette digestion s'est porté sur la trypsine en raison de sa haute spécificité de clivage. La sélection des peptides protéotypiques pour la quantification de la PCT dans le sérum humain est illustrée dans la *Figure 39*.

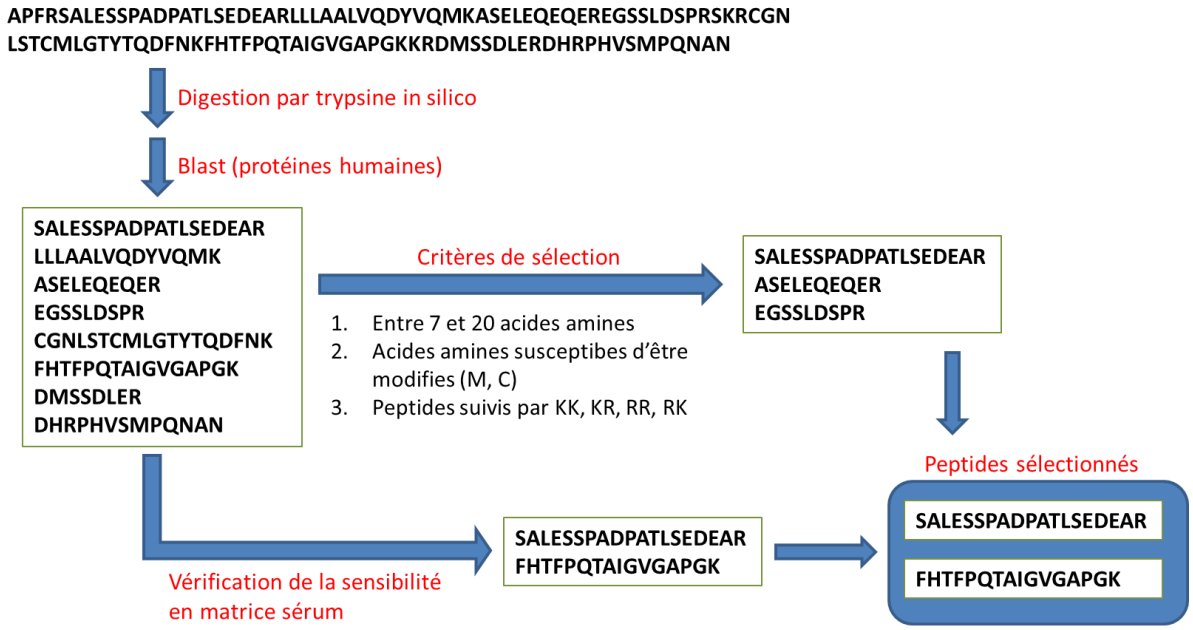


Figure 39. Stratégie de sélection des peptides protéotypiques de la PCT

L'enzyme trypsine, coupant sélectivement la séquence protéique après les lysines et les arginines a permis de générer une liste de huit peptides candidats à partir de la séquence

d'acides aminés de la PCT. Ces huit peptides ont été détectés par analyse ciblée en LC-MS/MS en mode PRM d'un échantillon digéré de la protéine recombinante PCT en solution tampon sans matrice sérum (*Figure 40*).

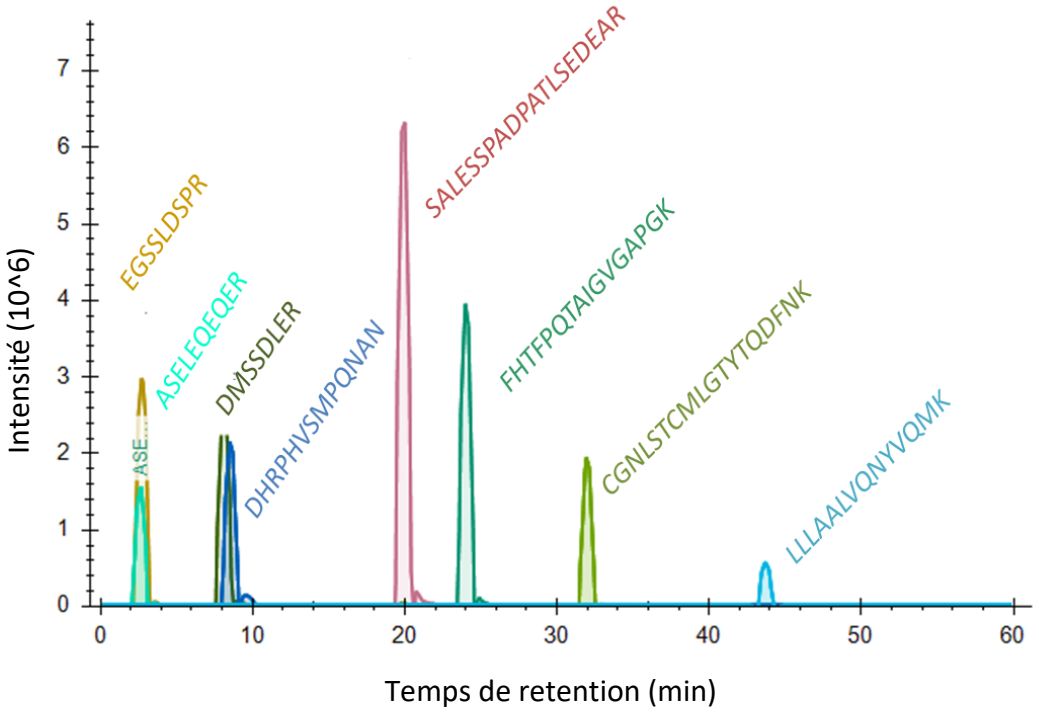


Figure 40. Superposition des chromatogrammes d'ion extrait des 8 peptides issus de la digestion par l'enzyme trypsine de la PCT en milieu tampon sans matrice sérum.

Injection du mélange peptidique issu de la digestion de 5 ng de la PCT recombinante en tampon. Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 100 µL/min. Gradient : gradient de 5 % à 30 % en 38 min. Détection : MS/MS en PRM

La spécificité des séquences de ces peptides à la PCT a été vérifiée à l'aide du programme Blast (https://web.expasy.org/blast/) permettant un alignement de séquence des peptides avec l'ensemble des séquences d'une base de données et ainsi de trouver des similarités entre le peptide d'intérêt et d'autre protéines que la protéine d'intérêt. Une base de données de protéines humaines a été utilisée lors de cette étude. Pour le choix de la liste finale, les peptides spécifiques ont ensuite été sélectionnés selon certains critères : la taille du peptide (entre 7 et 20 acides aminés), la présence d'acides aminés susceptibles d'être modifiés (modifications post-traductionnelles ou modifications susceptibles de se produire lors de la préparation d'échantillons comme l'oxydation des méthionines, alkylation des cystéines), la séquence d'acides aminés présente juste avant et juste après le peptide d'intérêt dans la séquence protéique est susceptible d'avoir une influence sur la digestion (e.g. les peptides suivis par des régions avec KK, KR, RR, RK, pouvant provoquer des

omissions de coupure par l'enzyme de digestion). Selon l'ensembles de critères de sélection théoriques, trois peptides ont finalement été retenus : SALESSPADPATLSEDEAR, ASELEQEQER, EGSSLDSPR. Cependant, il est important de s'assurer de la détection par spectrométrie de masse de ces peptides en matrice avec une sensibilité suffisante pour atteindre la limite de quantification désirée de l'ordre de 0,5 ng/mL correspondant au seuil de diagnostic du sepsis. Suite à l'analyse LC-MS/MS d'un échantillon digéré de sérum supplémenté en PCT à une concentration de 50 ng/mL, les peptides ASELEQEQER et EGSSLDSPR n'ont été détectés qu'avec un faible signal, potentiellement préjudiciable pour atteindre la limite de quantification désirée (*Figure 41*). Cette observation est en accord avec la littérature, ces deux peptides ne sont pas rapportés comme peptides protéotypiques de la PCT de quantification comme de confirmation, dans l'étude de Krastins *et al.* (183). Par ailleurs, dans le manuscrit de thèse du docteur Christelle Dubois, seuls deux peptides ASELEQEQER et SALESSPADPATLSEDEAR ont été retenus (184), cependant seul le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été utilisé en raison de faible rendement de l'immunoaffinité du peptide ASELEQEQER . Ainsi, parmi la liste initiale des peptides d'intérêt, seul le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a réuni l'ensemble des critères de sélection et semble le plus approprié pour la suite du développement de la méthode.

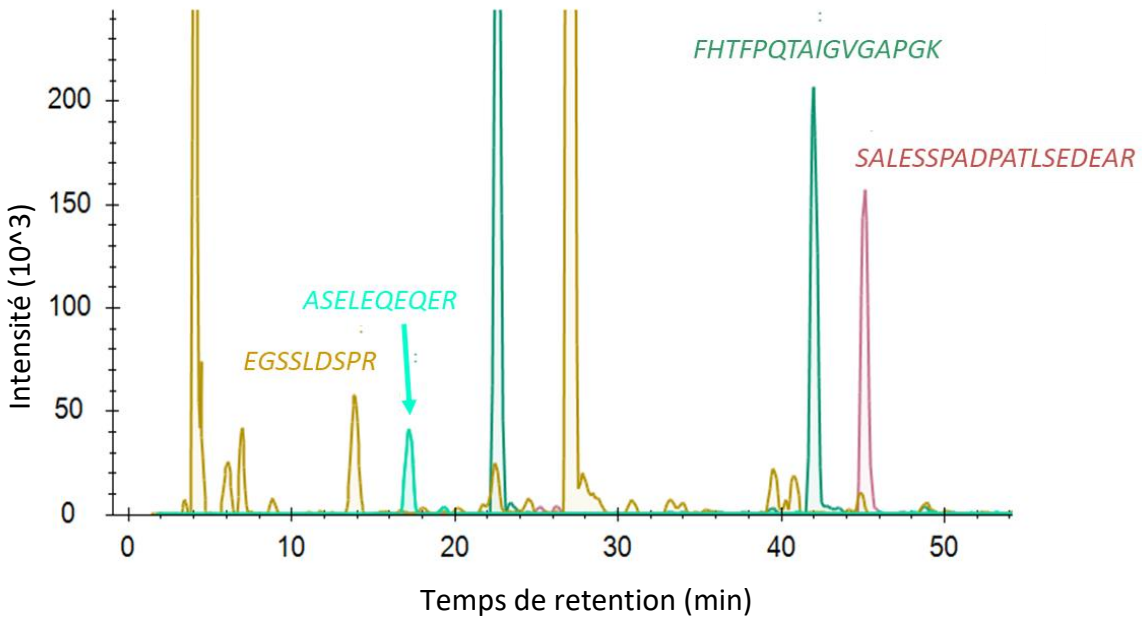


Figure 41. Superposition des chromatogrammes d'ion extrait des peptides issus de la digestion par l'enzyme trypsine de la PCT en sérum

Les 8 peptides de la PCT ont été suivis en PRM. Injection de 20 µL d'un extrait de sérum digéré à une concentration de la PCT de 50 ng/mL. Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 100 µL/min. Gradient : gradient de 2 % à 35 % en 46 min. Détection : MS/MS en mode PRM

Cependant, l'utilisation d'un peptide unique pour la quantification d'une protéine n'est pas un cas idéal. Lors de l'analyse LC-MS/MS d'un échantillon digéré de sérum

supplémenté en PCT, un second peptide a montré un signal en spectrométrie de masse compatible avec le besoin de quantification de la PCT à faible niveau de concentration, le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Il n'avait initialement pas été sélectionné car il est immédiatement suivi par une lysine et une arginine dans la séquence de la PCT, combinaison susceptible de générer des omissions de coupure. Le rendement de formation de ce peptide lors la digestion tryptique peut donc potentiellement être variable. Cependant, en envisageant une stratégie de quantification avec l'utilisation de la protéine recombinante PCT marquée comme étalon interne, les variations liées à la digestion de la protéine peuvent être corrigées. Ce peptide a donc été retenu pour le développement de la méthode. Ainsi, la quantification de la PCT par une stratégie *bottom-up* a été réalisée par la quantification des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK. En plus de la spécificité apportée par la quantification de deux peptides différents, le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK présente l'avantage de permettre de discriminer la PCT de ses différentes formes de clivages majoritaires (NproCT, calcitonine et katacalcine), ce que ne permet pas le peptide SALESSPADPATLSEDEAR (voir section A.III.1.1). En effet, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR partage sa séquence avec le produit de clivage NProCT et ne permet donc pas de distinguer entre la PCT intacte et cette forme de clivage. Le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK est situé à cheval entre la calcitonine et le tripeptide KKR liant la calcitonine à la katacalcine (calcitonine-GKKR-katacalcine). Cependant, l'analyse LC-MS de ces deux peptides tryptiques ne peut pas seule discriminer la PCT, des deux produits de clivage NProCT et de la calcitonine-KKR-katacalcine. La spécificité de la méthode de quantification repose donc sur la purification de la PCT en se basant sur les différences des propriétés physicochimiques.

II.2 Quantification et caractérisation des étalons primaires

Comme nous l'avons vu précédemment, la chaine de traçabilité métrologique aux SI pour les mesures de la PCT n'est pas complète et présente notamment un manque d'étalons primaires. Une partie du travail de cette thèse s'est donc axée sur le développement de ces étalons primaires. Dans le cadre de la « standardisation »/harmonisation du dosage de la PCT, il est essentiel de quantifier et caractériser les étalons primaires pour assurer la justesse de la méthode de quantification par ID-LC-MS/MS de la PCT dans le sérum. Pour déterminer la concentration exacte de l'étalon primaire de type peptidique ou protéique, l'approche PICAA a été utilisée. L'approche PICAA est décrite dans la *Figure 42* pour le peptide fictif PEPTIDEINTERET. Elle se déroule en deux étapes : une quantification par analyse des acides aminés (AAA) et une analyse des impuretés d'ordre peptidique ou protéique. La première étape consiste à quantifier certains acides aminés d'intérêt (la proline et l'isoleucine dans l'exemple décrit) après hydrolyse en milieu acide du peptide. La quantification de ces acides aminés permet alors de déterminer la concentration du peptide. La deuxième étape consiste à identifier puis à quantifier les impuretés qui sont susceptibles d'interférer soit dans la quantification d'acides aminés, soit dans l'utilisation de l'étalon primaire pour l'étalonnage de la méthode de quantification de la PCT dans le sérum par ID-LC-MS/MS. Dans l'exemple de la *Figure 42*, le peptide PEPTIDEIMPVRETE a été identifié. Celui-ci peut également

produire les acides aminés proline et isoleucine lors de la réaction d'hydrolyse. Par conséquent, la quantité de proline et d'isoleucine obtenue par l'AAA est le résultat de quantification du peptide PEPTIDEINTERET et du peptide PEPTIDEIMPVRETE. La concentration du peptide PEPTIDEIMPVRETE doit alors être déterminée. Suite à la quantification du peptide PEPTIDEIMPVRETE, le résultat obtenu par AAA pour la proline et l'isoleucine est corrigé par les contributions venant du peptide PEPTIDEIMPVRETE afin d'obtenir la concentration exacte du peptide PEPTIDEINTERET dans la solution de l'étalon primaire.

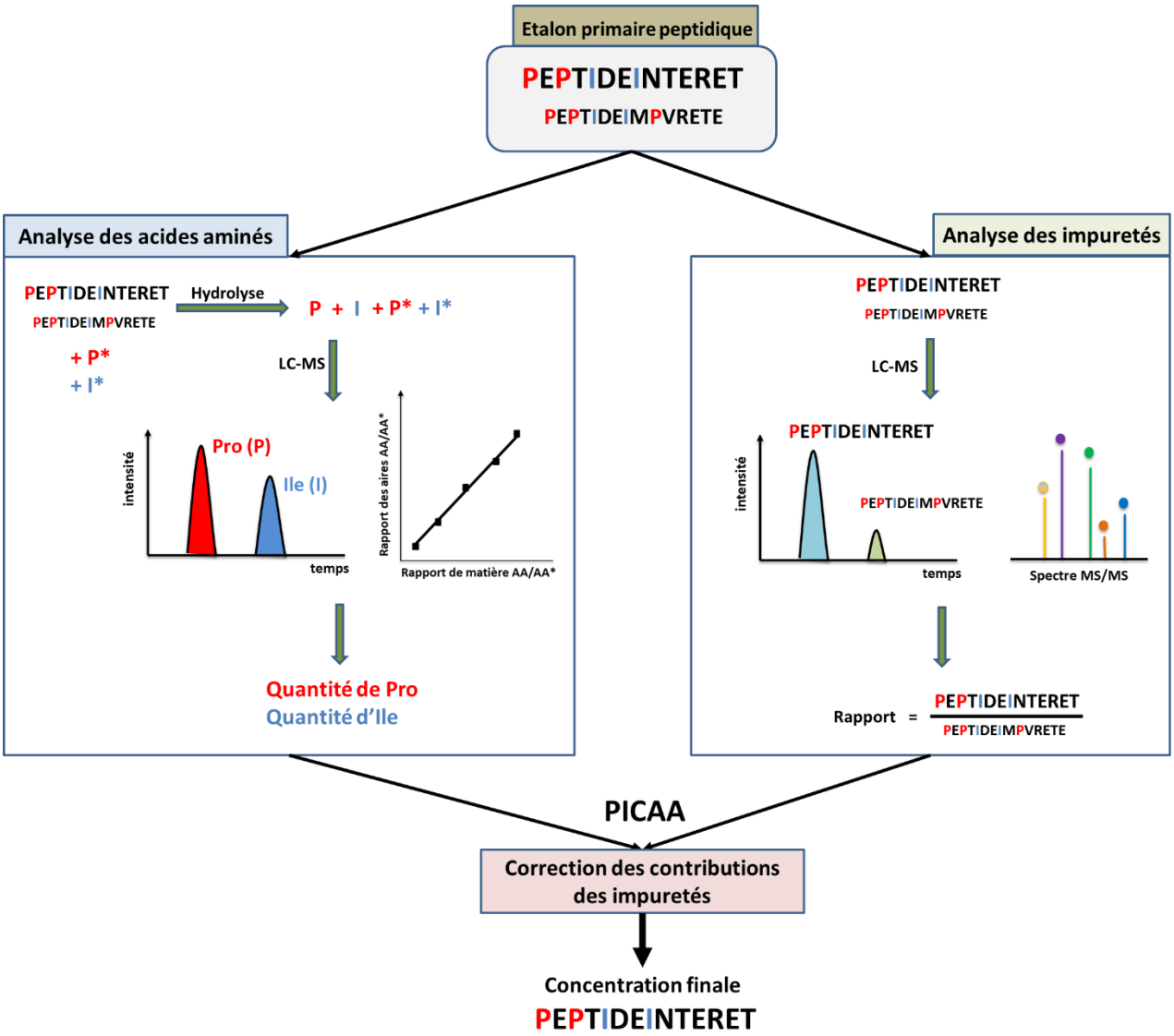


Figure 42. Stratégie PICAA pour la détermination de la concentration exacte de l'étalon primaire de type peptidique ou protéique

Le principe de la quantification par AAA en ID-LC-MS est décrit dans la section A.IV.3.2.4. La première étape de l'AAA est une hydrolyse complète des peptides ou protéines

en acides aminés libres. L'hydrolyse peut être réalisée en phase gazeuse ou en phase liquide. Au cours de l'hydrolyse en phase gazeuse, les peptides/protéines sont exposés à une vapeur saturée en HCl 6M à haute température dans un tube d'hydrolyse hermétique et sous atmosphère d'azote. Au cours de l'hydrolyse en phase liquide, les peptides/protéines sont solubilisés directement dans une solution d'HCl 6M à haute température dans un tube d'hydrolyse hermétique. Les hydrolysats sont ensuite analysés par LC-MS. Le protocole simplifié de l'hydrolyse en phase gazeuse, technique la plus utilisée au laboratoire, est présenté en *Figure 43*.

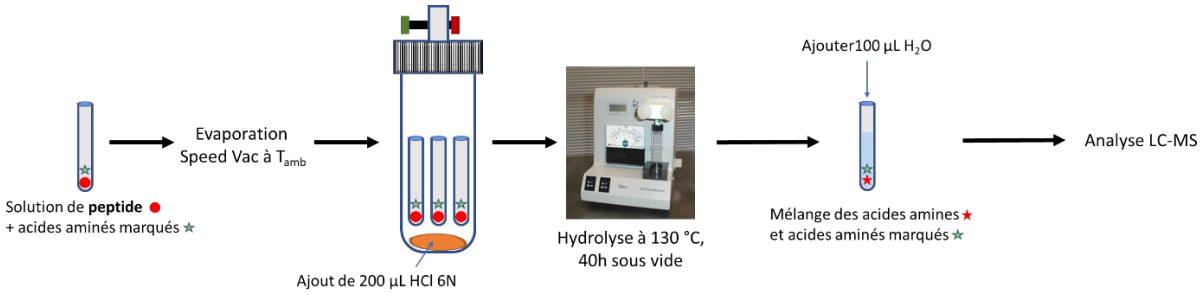


Figure 43. Schéma de l'analyse des acides aminés par l'hydrolyse en phase gazeuse

Afin de corriger les variations éventuelles produites durant les différentes étapes du protocole, la dilution isotopique a également été mise en œuvre pour l'AAA. Les analogues des acides aminés marqués avec les isotopes stables ^{13}C et ^{15}N sont ajoutés dans l'échantillon avant l'étape d'hydrolyse. La concentration en acide aminé d'un échantillon est ensuite déterminée par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage issue de l'analyse d'étalons constitués de mélanges d'acides aminés libres et leurs analogues marqués. Afin d'assurer la traçabilité au SI, des matériaux de référence certifiés des acides aminés libres (concentrations et incertitudes associées définies) ont été utilisés comme étalon primaire pour la préparation des solutions étalons. De plus, le matériau de référence certifié NIST SRM 2389a, constitué d'un mélange équimolaire de 16 acides aminés, a été utilisé comme contrôle qualité interne pour cette quantification des acides aminés. Un profil chromatographique d'un contrôle qualité interne obtenu par une analyse LC-MS est présenté dans la *Figure 44*.

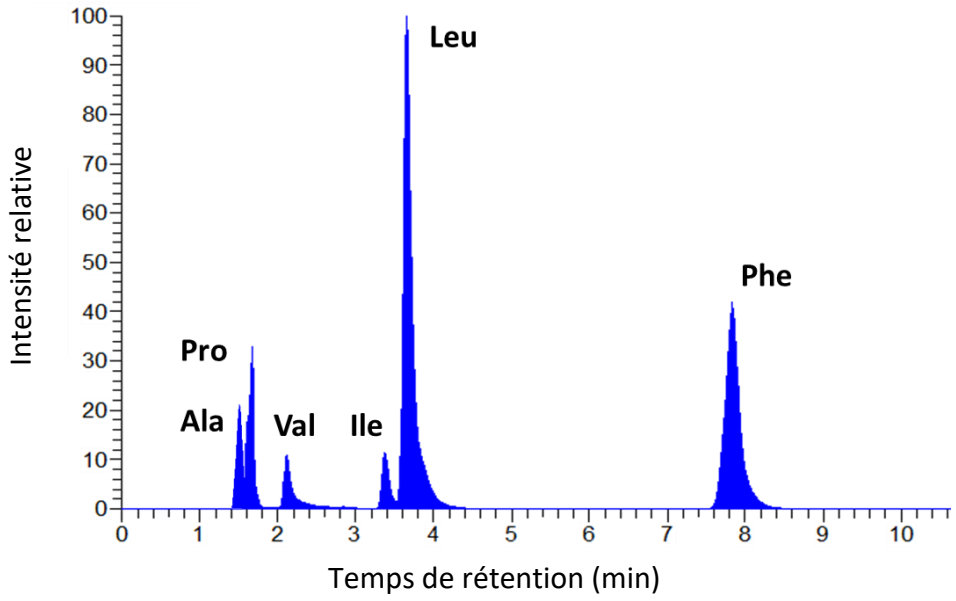


Figure 44. Superposition de chromatogrammes d'ion extrait des six acides aminés d'un contrôle de qualité interne issu de l'analyse LC-MS du matériau de référence certifié 2389a

Phases mobiles H_20 + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acquity UPLC, BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm. Débit : 150 µL/min. Température de la colonne : 25 °C. Gradient : 1 % entre 0 et 10 min, de 1 % à 2,5 % en 3 min. Détection : MS en mode SIM.

La quantification des peptides et protéines est réalisée par le biais de la quantification des acides aminés générés lors de l'hydrolyse. Il est donc essentiel que la réaction d'hydrolyse soit totale. Ceci peut être vérifié soit par une technique complémentaire, soit par l'optimisation des différents paramètres tels que la température ou le temps d'hydrolyse.

Après avoir déterminé la concentration brute de chaque acide aminé issu de l'hydrolyse de la solution de l'étalon primaire, il est nécessaire de déterminer le profil des impuretés par des analyses LC-HRMS et LC-MS/MS. Leur identification repose sur l'analyse de la masse exacte obtenue en LC-HRMS et sur l'analyse des spectres de fragmentation obtenus en LC-MS/MS. Idéalement, en LC-MS, la quantité de chaque impureté est déterminée à l'aide d'un étalonnage externe utilisant des étalons de l'impureté de pureté connue (273). En réalité ces étalons sont difficiles à obtenir et nécessiteraient eux aussi une caractérisation rigoureuse (e.g. PICAA) afin de connaitre leur pureté. Une alternative utilise la détermination du rapport des aires de pics chromatographiques obtenus en analyse LC-HRMS entre l'impureté et l'analyte d'intérêt. Cette approche est considérée raisonnable/satisfaisante lorsque les impuretés identifiées ont des structures similaires à l'analyte d'intérêt (273). Lorsque les impuretés identifiées sont quantifiées, la concentration finale est obtenue par la correction des contributions des impuretés, si nécessaire.

II.2.1 Etalon primaire peptidique

Lors de l'utilisation d'une approche de quantification en matrice basée sur un étalonnage peptidique, il est nécessaire de disposer d'un étalon primaire du/des peptide(s) d'intérêt. Cet étalon est généralement un peptide synthétique. Dans cette partie, l'exemple du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est présenté.

Le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été produit par Pepscan Presto (Lelystad, Pays-Bas) avec une pureté supérieure à 99 % estimée par le fabricant en HPLC-UV. Le peptide lyophilisé a été mis en solution dans un mélange DMSO/eau milliQ (50 :50, (v/v)). Cette solution sera appelée solution mère du peptide dans la section A.II.2.1. La concentration de la solution mère est déterminée par l'approche PICAA comme décrit ci-dessus.

II.2.1.1 Analyses des acides-aminés

La concentration de la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été déterminée par la quantification de trois acides aminés : alanine, leucine et proline, qui sont stables dans les conditions d'hydrolyse acide. Deux techniques d'hydrolyse (en phase liquide et en phase gazeuse) pour la quantification des peptides sont utilisées en routine au LNE. La technique d'hydrolyse en phase liquide est utilisée principalement pour confirmer les résultats obtenus en phase gazeuse, car elle a montré une plus faible fidélité intermédiaire. Les conditions expérimentales pour la quantification du peptide SALESSPADPATLSEDEAR dans la solution mère sont basées sur le protocole disponible au laboratoire et sont détaillées dans l'Annexe A. Lors de la quantification par AAA suite à une hydrolyse, il est important de s'assurer que l'hydrolyse est totale afin de ne pas apporter de biais de quantification. D'après les différentes études menées au laboratoire sur des peptides, les conditions standards en phase gazeuse sont une température de 130°C pendant 40h. Un exemple de chromatogramme d'ion total obtenu lors de l'analyse LC-MS d'un échantillon de la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR hydrolysé (phase gazeuse, 130°C,40h) est présenté dans la *Figure 45*.

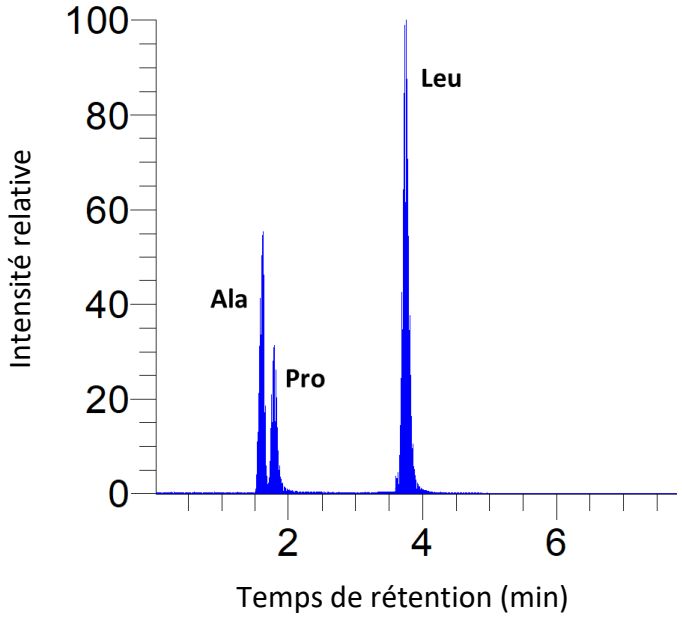


Figure 45. Chromatogramme d'ion total obtenu pour un échantillon du peptide SALESSPADPATLSEDEAR issu d'une hydrolyse en phase gazeuse à 130°C pendant 40 heures

Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acquity UPLC, BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm. Débit : 150 µL/min. Température de la colonne : 25 °C. Gradient : 1 % entre 0 et 10 min, de 1 % à 2,5 % en 3 min. Détection : MS en mode SIM.

Dans la séquence du peptide S**AL**ESS**PA**D**PA**T**L**SEDE**A**R, il y a quatre alanines, deux leucines et deux prolines. En supposant que la pureté du peptide soit de 100%, la concentration molaire $C_{peptide}$ (µmol/g) et la fraction massique $FM_{peptide}$ (µg/g) de la solution mère peut être calculée en fonction de la concentration molaire des acides aminés C_{AA} et de la masse molaire $M_{peptide}$ (g/mol) du peptide selon les équations 1 et 2:

$$C_{peptide} = \frac{1}{4} C_{alanine} = \frac{1}{2} C_{leucine} = \frac{1}{2} C_{proline} \text{ (en µmol/g)} \quad \text{Equation 1}$$

$$FM_{peptide} = C_{peptide} * M_{peptide} \quad \text{Equation 2}$$

La concentration de l'acide aminé C_{AA} dans la solution mère est déterminée selon l'équation 2 à partir de la faction massique et la masse molaire de l'acide aminé. La fraction massique est déterminée à partir des aires de pic chromatographique et la fonction d'étalonnage selon les équations 3 à 7.

$$C_{AA} = FM * \frac{1}{M_{AA}} \quad \text{Equation 3}$$

$$FM_{AA} = \frac{m_{AA*} * C_{AA*} * Q}{m_{ech}} * Dil \quad \text{Equation 4}$$

$$Q = f(R_{aires})$$ Equation 5

$$Q = \frac{\text{Masse d'acide aminé}}{\text{Masse d'acide aminé marqué}}$$ Equation 6

$$R_{aires} = \frac{\text{Aire du pic d'acide aminé}}{\text{Aire du pic d'acide aminé marqué}}$$ Equation 7

Avec :

C_{AA} : concentration d'acide aminé dans l'échantillon (µmol/g)
FM : Fraction massique de l'acide aminé dans l'échantillon (µg/g)
M_{AA}: masse molaire d'acide amine (g/mol)
m_{AA*} : masse de solution d'acide amine marqué ajoutée (g)
C_{AA*} : concentration de la solution d'acide amine marqué (µg/g)
m_{ech}: masse d'échantillon (g)
Dil : facteur de dilution lié à la préparation d'échantillon à partir de la solution mère

Les résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes d'hydrolyse en phase gazeuse et de deux expériences indépendantes d'hydrolyse en phase liquide sont présentés dans le *Tableau 11*. L'ensemble des préparations des échantillons et des étalons étant réalisé par gravimétrie, les concentrations sont ici présentées en µmol/g.

Tableau 11. Concentrations molaires du peptide SALESSPADPATLSEDEAR dans la solution mère obtenues par analyse des acides aminés après hydrolyse en phase gazeuse et en phase liquide

	Hydrolyse en phase gazeuse (N = 3, n = 10)			**Hydrolyse en phase liquide (N = 2, n = 7)**		
	Alanine	Leucine	Proline	Alanine	Leucine	Proline
FM_{AA} (µg/g)	228,65	166,19	145,3	214,53	165,14	136,54
$C_{acide\ aminé}$ (µmol/g)	2,567	1 ,267	1,262	2,408	1,259	1,186
CV entre les hydrolyses (n=10 (phase gazeuse) ; n=7 (phase liquide))	**0,8 %**	**2,2 %**	**1,0 %**	**5,6 %**	**10,1 %**	**5,9 %**
$C_{peptide}$ (µmol/g)	0,642	0,634	0,631	0,602	0,630	0,593
$C_{peptide}$ non-corrigée (µmol/g)	**0,635**			**0,608**		
$FM_{peptide}$ (µg/g)	**1235,70**			**1183,16**		
CV inter acides aminés	**0,9 %**			**3,1 %**		
Différence entre deux techniques	**4,3 %**					

N : nombre d'expériences indépendants ; n = nombre total des réplicas d'hydrolyse

Ces résultats montrent que la fidélité intermédiaire des résultats de quantification du peptide SALESSPADPATLSEDEAR entre les réplicas d'hydrolyse est meilleure avec le processus d'hydrolyse en phase gazeuse (n=10, coefficient de variation inférieur à 2,2 %) qu'avec le processus en phase liquide (n=7, coefficient de variation entre 5 % et 11 %). Ce résultat confirme des observations précédentes au laboratoire. Quant à la concordance des résultats obtenus entre les différents acides aminés, l'hydrolyse en phase gazeuse présente également un meilleur accord entre acides aminés (coefficient de variation de 0,9 %) par rapport à l'hydrolyse en phase liquide (coefficient de variation de 3,1 %). La variabilité observée lors des hydrolyses en phase liquide peut être expliquée par la multiplication d'étapes de transfert de solution en amont de l'hydrolyse causant des pertes par l'adsorption passive, tandis que pour l'hydrolyse en phase gazeuse, une seule étape de transfert est nécessaire. En effet, l'utilisation des acides aminés marqués comme étalons internes dans ce protocole ne permet pas de corriger toutes les pertes au niveau peptidique. Le résultat a également montré une comparabilité des résultats obtenus pour les deux techniques d'hydrolyse en phase gazeuse et en phase liquide avec une différence de 4,3 %.

En tenant compte de la variation engendrée par l'hydrolyse en phase liquide, seul le résultat obtenu par l'hydrolyse en phase gazeuse a été utilisé pour la détermination de la concentration finale du peptide SALESSPADPATLSEDEAR dans la solution mère du peptide.

Cependant, le résultat obtenu par AAA n'est pas suffisant. En effet, la concentration mesurée pour chaque acide aminé représente la contribution du peptide d'intérêt et des impuretés peptidiques potentiellement présentes dans la solution mère du peptide. Il est donc nécessaire de déterminer la présence d'impureté, d'identifier ces impuretés potentielles et d'estimer leurs concentrations dans la solution mère du peptide afin d'obtenir la concentration finale en peptide SALESSPADPATLSEDEAR.

II.2.1.2 Identification des impuretés peptidiques

Dans le cadre de ce travail, le profil d'impureté du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été déterminé par chromatographie en phase liquide Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific) couplée à la spectrométrie de masse haute résolution sur le spectromètre de masse Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis). Une analyse LC-MS de masse intacte a été réalisée afin de séparer les impuretés du peptide d'intérêt et de les identifier en fonction de leur masse exacte. Une analyse LC-MS/MS a ensuite été réalisée afin de confirmer la nature peptidique des impuretés et leur identité grâce au spectre de fragmentation.

L'identification des impuretés par LC-MS a été réalisée en analysant une solution diluée de la solution mère à une concentration massique d'environ 16 ng/g dans de l'eau ultrapure. Différents gradients de chromatographie liquide (e.g. variation de 1,2 %/min, 0,48 %/min et 0,24 %/min de phase organique acétonitrile) ont été testés afin d'obtenir la meilleure séparation possible des impuretés. En effet, une séparation chromatographique des impuretés confirme leur présence dans la solution analysée et permet d'exclure la génération d'artéfacts dans la source du spectromètre de masse. Les conditions finales de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse sont détaillées dans l'Annexe B. Un exemple de chromatogrammes d'ion extrait des impuretés obtenues en conditions optimisées est présenté dans la *Figure 46*.

Différents volumes d'injection ont été testés afin d'identifier les impuretés faiblement abondantes présentes dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR.

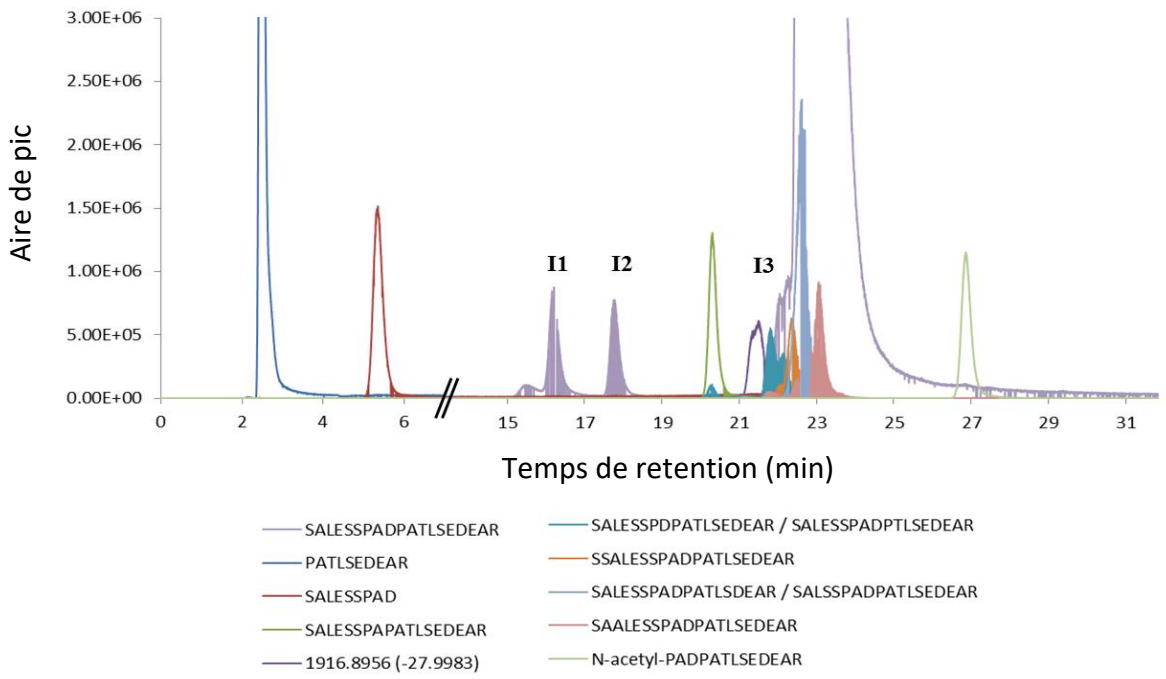


Figure 46. Superpositions des chromatogrammes d'ion extrait du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et des impuretés majeures d'une solution diluée de la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR

Les impuretés I1, I2 et I3 correspondent à des formes isobariques isoleucine à la place de leucine. Injection de 8 µL d'une solution diluée de 16 ng/g. Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 250 mm, 5 µm. Débit : 100 µL/min. Température de colonne : 60°C. Gradient : gradient de 5 % à 30 % en 52 min. Détection : MS en mode masse intacte

L'analyse de masse intacte a montré la présence de différentes impuretés peptidiques et la présence de différentes isoformes du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Les impuretés identifiées sont majoritairement des formes tronquées du peptide SALESSPADPATLSEDEAR (e.g. PATLSEDEAR, SALESSPAD), des formes avec la perte d'un acide aminé (e.g. SALESSPA-PATLSEDEAR, SALESSP-DPATLSEDEAR) ou des formes avec l'incorporation d'un acide aminé supplémentaire (e.g. SSALESSPADPATLSEDEAR, SAALESSPADPATLSEDEAR). Ce sont des formes communément trouvées lors de l'analyse de peptides synthétiques. Les différentes isoformes du peptide SALESSPADPATLSEDEAR observées vers 16, 18 et 22 min sur le chromatogramme de la *Figure 46*, peuvent être liées à présence de l'acide aminé isobarique isoleucine à la place de l'acide aminé leucine en position 3 et 13. Ceci est également commun et s'explique par la pureté de la solution de leucine utilisée pendant la production du peptide. Cependant, l'identité de chaque isoforme n'a pas pu être confirmée pour chaque pic chromatographique en raison de l'absence des peptides étalons pour chaque isoforme. Lors des analyses LC-HRMS et LC-MS/MS des adduits du peptides SALESSPADPATLSEDEAR avec du sodium ou du potassium ont également été observés et ont été exclus de la liste finale des impuretés car ce sont des artéfacts

générés lors de l'analyse LC-MS. L'identification de chaque impureté majoritaire a été confirmée par une analyse en mode ciblé LC-MS/MS (PRM).

Idéalement, la quantification de chacune des impuretés doit être menée par ID-LC-MS avec un étalonnage externe. Or, ceci nécessite la disponibilité des peptides synthétiques de chaque impureté et la détermination de la pureté de chacun de ces peptides synthétiques. Cette démarche est très couteuse en temps et nécessite un budget supplémentaire d'autant plus si le nombre d'impuretés est élevé. De plus, dans certains cas, les résultats obtenus par l'étalonnage externe avec les peptides synthétiques d'impuretés sont moins précis en raison de pertes de peptides lors des différentes étapes de dilution (273). Une étude sur la caractérisation du peptide angiotensine II a montré une comparabilité des résultats de quantification des impuretés obtenus entre la méthode des ajouts dosés des impuretés et la méthode d'approche relative en comparant des aires des pics chromatographiques obtenus entre les impuretés et le peptide d'intérêt (274). La quantité de chaque impureté dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a donc été estimée par une approche relative. Pour cela, il est nécessaire d'assurer qu'il n'y pas de phénomènes de saturation de signal pour le peptide d'intérêt SALESSPADPATLSEDEAR. Ainsi, différents volumes de la solution diluée à une concentration d'environ 16 µg/g ont été injectés en LC-MS pour déterminer le seuil à partir duquel la saturation de signal est observée (*Figure 47*). Le résultat a montré que le signal du peptide SALESSPADPATLSEDEAR commence à saturer à partir d'un volume d'injection de 8 µL avec un biais de -2,5 % par rapport à la valeur théorique sans saturation de signal. Le volume d'injection de 8 µl, correspondant à 128 ng de peptide injecté sur colonne, a été sélectionné pour estimer la quantité des impuretés par l'approche relative.

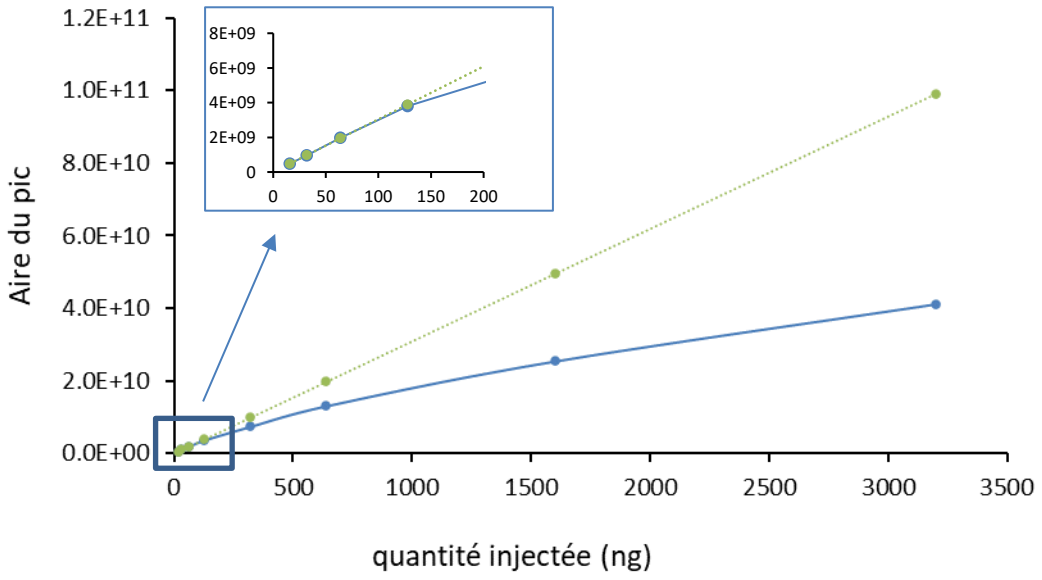


Figure 47. Relation entre l'aire du pic majoritaire correspondant au peptide SALESSPADPATLSEDEAR et le de la quantité injectée de peptide SALESSPADPATLSEDEAR

Différents volumes d'une solution à environ 16 µg/g de peptide SALESSPADPATLSEDEAR ont été injectés. *La courbe en bleu représente l'aire du pic observée en fonction de la quantité injectée. La droite en pointillés verts représente la courbe théorique en l'absence de phénomène de saturation.*

Afin d'estimer la quantité de chaque impureté, un spectre déconvolué a été généré. La déconvolution permet de déterminer la masse exacte des différents composés présents dans la solution du peptide SALESSPADPATLSEDEAR à partir des différents états de charges observés lors de l'analyse LC-MS. L'aire du pic chromatographique a été extraite avec la masse monoisotopique après déconvolution pour chaque impureté et pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR avec une erreur de masse de 5 ppm. Une aire de pic relative au peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été calculée pour chaque impureté. Seules les impuretés dont l'aire sous le pic représentait plus de 0,1 % de l'aire du pic principal (peptide SALESSPADPATLSEDEAR) ont été retenues. La liste finale des impuretés avec leurs identifications est présentée dans le *Tableau 12*.

Tableau 12. Liste des impuretés identifiées par l'analyse en masse intacte LC-HRMS et en LC-MS/MS. Seules les impuretés retenues avec une aire relative supérieure à 0,1 % sont présentées

Code	Peptide et impuretés	RT (min)	Masse monoisotopiq. Expérimentale	Masse monoisotopiq. Théorique	Erreur de masse (ppm)	Confirmation par MS/MS	Aire relative (%)
	SALESSPADPATLSEDEAR	22,74	1944,8933	1944,8912	1,08	Oui	100
I1	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 1	16,13	-	-	-	Oui *	0.20
I2	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 2	17,62	-	-	-	Oui *	0.14
I3	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 3	22,51	-	-	-	Oui *	0.25
I4	PATLSEDEAR	2,48	1087,515	1087,5146	0,37	Oui	0.24
I5	SALESSPAD	5,35	875,3885	875,3872	1,48	Oui	1.15
I6	SALESSPAPATLSEDEAR	20,29	1829,8648	1829,8643	0,27	Oui	0.21
I7**	1916,8956 (– 27,9983)	21,51	1916,8956	1916,8851	5,47	N	0.22
I8	SALESSPDPATLSEDEAR / SALESSPADPTLSEDEAR	20,26-21,82	1873,8526	1873,8541	-0,80	Oui	0.15
I9	SSALESSPADPATLSEDEAR	23,01	2031,9229	2031,9232	-0,15	Oui	0.10
I10	SALESSPADPATLSDEAR	22,63	1815,8460	1815,8486	-1,43	Oui	0.42
I11	SAALESSPADPATLSEDEAR	23,04	2015,9288	2015,9283	0,25	Oui	0.14
I12	N-acétyl-PADPATLSEDEAR	26,85	1412,6461	1412,6419	2,97	Oui	0.22

(*) les données de fragmentation MS/MS ne permettent pas de discriminer l'isoleucine et la leucine
(**) Impureté peptidique avec la modification non identifiée en C-terminal

L'identification de chaque impureté a été confirmée par une analyse en LC-MS/MS en mode PRM. Les spectres PRM MS/MS obtenus ont été vérifiés manuellement pour confirmer l'identité des impuretés observées en LC-HRMS. A titre d'exemple, le spectre de fragmentation du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est présenté dans la *Figure 48*. Les exemples de spectres de fragmentation des impuretés I4, I8, I11 correspondants à la forme tronquée PATLSEDEAR, la forme avec perte d'une alanine SALESSP-DPATLSEDEAR / SALESSPADP-TLSEDEAR et la forme avec incorporation d'une alanine SAALESSPADPATLSEDEAR sont présentés dans la *Figure 49*.

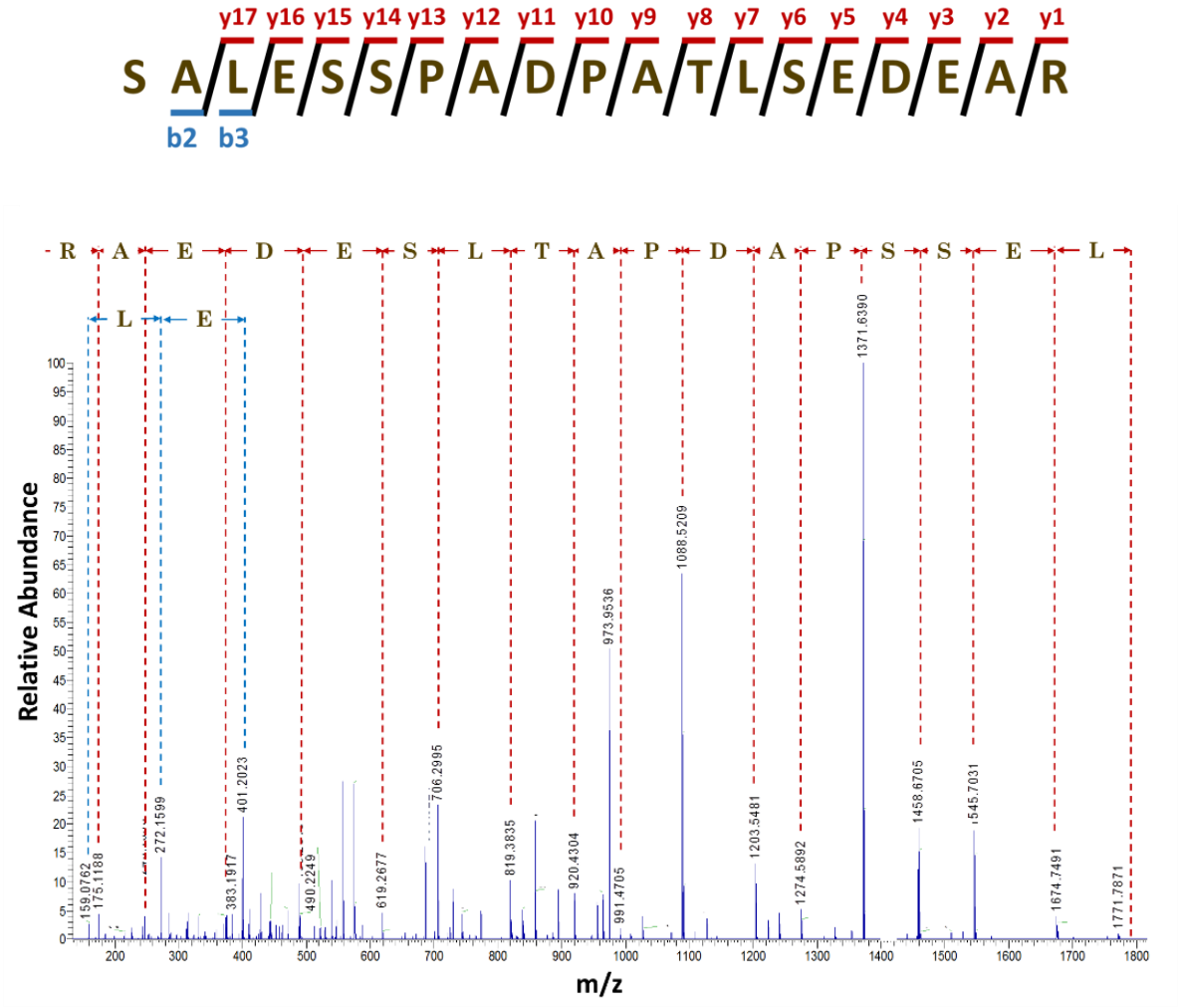
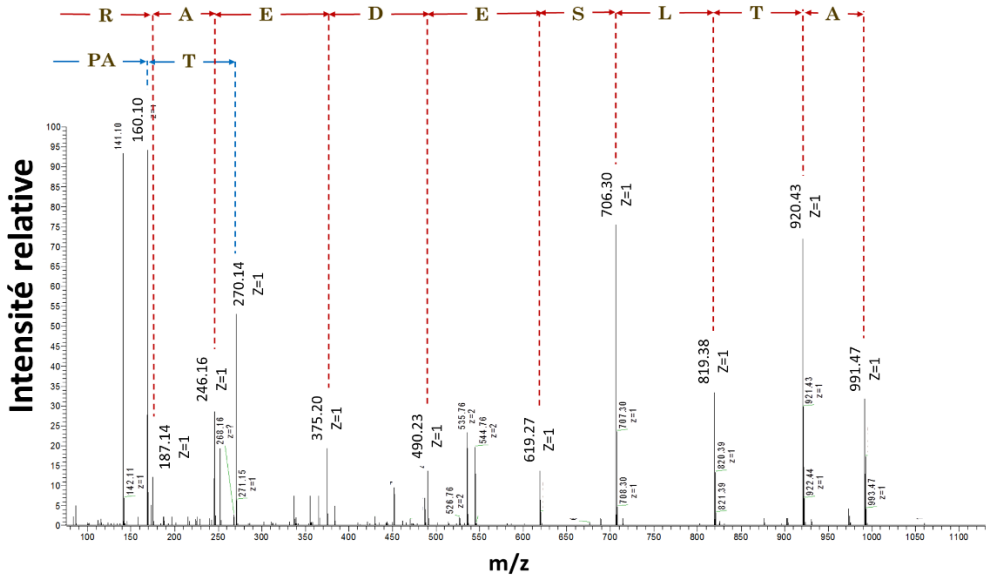


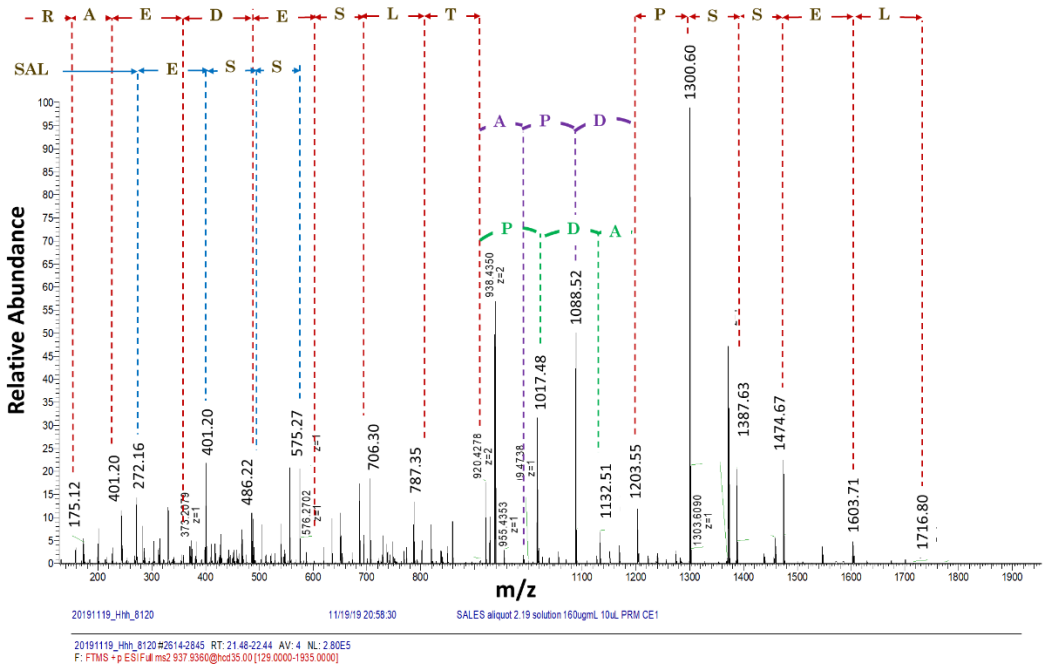
Figure 48. Spectre de fragmentation du peptide SALESSPADPATLSEDEAR (m/z 973.4469, z=2)

L'analyse LC-MS/MS en mode PRM d'une solution diluée de la solution mère à une concentration de 16 µg/g avec un volume d'injection 10 µL a été réalisée. Le précurseur m/z 973,4469 (z=2) a été isolé avec une fenêtre de 2 m/z et fragmenté avec une énergie de collision de 35eV.

(A) Impureté I4 : PATLSEDEAR



(B) Impureté I8 SALESSP-DPATLSEDEAR / SALESSPADP-TLSEDEAR



(C) Impureté 11 : S**A**ALESSPADPATLSEDEAR

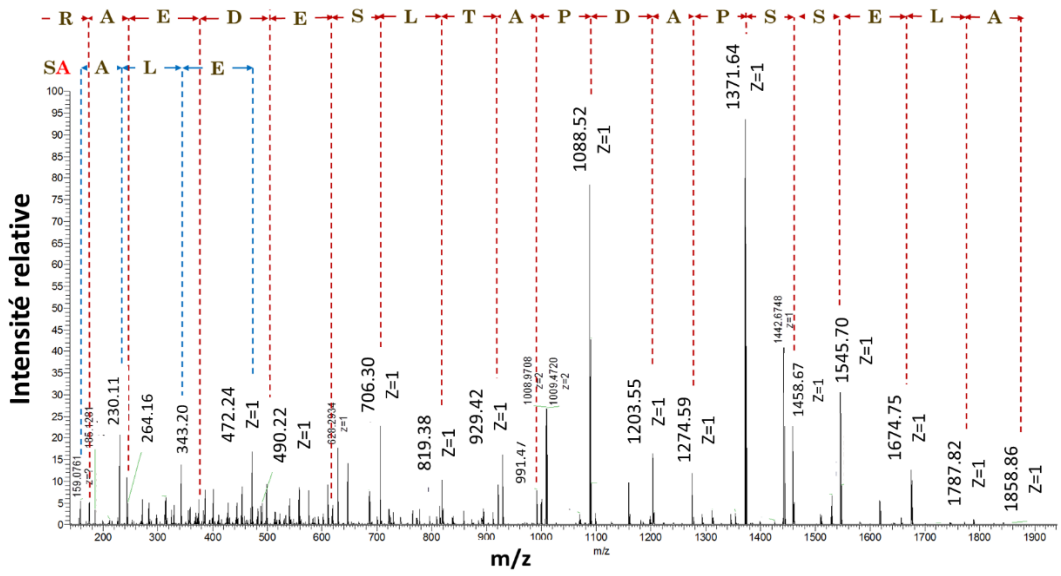


Figure 49. Spectres de fragmentation des impuretés I4, I8 et I11

L'analyse LC-MS/MS en mode PRM d'une solution diluée de la solution mère à une concentration 16 µg/g, volume d'injection 10 µL. (A) précurseur de 544,7646 (z=2), (B) précurseur de 937,9360 (z=2), (C) précurseur 1008,9668 (z=2). Les précurseurs ont été isolés avec une fenêtre de 2 m/z et fragmentés avec une énergie de collision de 35eV.

Tableau 13. Liste des impuretés majoritaires identifiées dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR

Identification	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	Masse monoisot.
SALES [1-19]	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	1944,8939
Isoforme 1	**S**	**A**	**I**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	-
Isoforme 2	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**I**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	-
Isoforme 3	**S**	**A**	**I**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**I**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	-
SALES [1-9]	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**											1087,515
SALES [10-19]										**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	875,3885
SALES [1-8, 10-19]	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**		**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	1829,8648
1944,8933(– 27,9983)*	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**R**	**D**	**E**	**A**	**R**	1916,8956
SALES [1-7, 9-19]	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**		**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	1873,8526
SALES [1-19] + S	**S S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	2031,9229
1815.8460	**S**	**A**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**		**D**	**E**	**A**	**R**	1815,8460
SALES [1-19] + A	**S**	**AA**	**L**	**E**	**S**	**S**	**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	2015,9288
Acétyl-SALES [7-19]							**P**	**A**	**D**	**P**	**A**	**T**	**L**	**S**	**E**	**D**	**E**	**A**	**R**	1412.6461

(*) modification non-identifiée en C-terminal du peptide, hypothèse que la modification n'introduit pas un acide aminé supplémentaire de type alanine, leucine ou proline

II.2.1.3 Détermination de la concentration corrigée

Comme décrit au-dessus, la quantité de chaque impureté a été estimée par l'approche relative via le rapport entre l'aire du pic chromatographique de l'impureté et celle du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. L'estimation des rapports des aires a été effectuée à partir de quatre analyses LC-MS de masse intacte. Le coefficient de variation des rapports des aires obtenues sur 4 analyses est inférieur à 9 %. La quantité des acides aminés (alanine, leucine et proline) appartenant au peptide SALESSPADPATLSEDEAR est déterminée par la soustraction des contributions en acide aminé des impuretés identifiées selon les équations 8, 9 et 10. Les concentrations sont exprimées en µmol/g, les calculs sont réalisés pour une même solution, le volume n'intervient pas dans ces calculs.

$$C_{AAi}^{SALES} = C_{AAi}^{measurée} - \sum_{i=1}^{N} C_{AAi}^{impureté\ i} \quad \text{Equation 8}$$

$$C_{AAi}^{impureté\ i} = C^{impureté\ i}\ x\ N_{AAi} \quad \text{Equation 9}$$

$$C^{impureté\ i} = C^{SALES}\ x\ R_{aire}^{impureté\ i}\ x\ F_r \quad \text{Equation 10}$$

Avec :

C_{AAi}^{SALE} : concentration de l'acide aminé i issu de l'hydrolyse du peptide SALESSPADPATLSEDEAR
: : concentration de l'acide aminé i obtenue par l'analyse des acides aminés
$C_{AAi}^{impureté\ i}$: concentration de l'acide aminé i issu de l'hydrolyse de l'impureté i
$C^{impureté\ i}$: concentration de l'impureté i
N_{AAi}: nombre d'acides aminés AA dans l'impureté i
N : nombre d'impuretés identifiées dans l'échantillon
$R_{aire}^{impureté\ i}$: ratio des aires sous le pic de l'impureté i et du peptide SALESSPADPATLSEDEAR dans l'échantillon
F_r : $facteur\ de\ réponse\ en\ LC-MS$: facteur de réponse en LC-MS
$F_r = 1$ par rapport au peptide SALESSPADPATLSEDEAR avec une incertitude type relative de 80 %

La fraction massique du peptide ou de l'impureté peptidique $C_{peptide}$ (µg/g) dans la solution mère est déterminée selon l'équation 11 :

$$C_{peptide\ (\mu g/g)} = C_{peptide\ (\mu mol/g)} * M_{peptide} \quad \text{Equation 11}$$

Avec :

$C_{peptide}$: concentration du peptide standard ou de l'impureté (µmol/g)

$M_{peptide}$: masse molaire du peptide standard ou de l'impureté (g/mol)

Les fractions massiques du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et de chaque impureté sont détaillées dans le *Tableau 14*.

Tableau 14. Fractions massiques des impuretés dans la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR après la correction des contributions des impuretés

Code	Peptide et impuretés	Aire relative (%)	Fraction massique (µg/g) (*)	Incertitude élargie (µg/g) (k=2)	Incertitude élargie relative (k=2) (%)	Fraction massique relative (%)
	SALESSPADPATLSEDEAR	100	1206	39	3,3	97,36
I1	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 1	0.20	2,4	2,2	92,4	0,20
I2	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 2	0.14	1,7	1,6	92,4	0,14
I3	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 3	0.25	3,0	3,4	113,2	0,24
I4	PATLSEDEAR	0.24	7,8	7,2	92,4	0,11
I5	SALESSPAD	1.15	1,3	1,2	92,5	0,63
I6	SALESSPAPATLSEDEAR	0.21	2,4	2,2	92,4	0,19
I7*	1916,8956 (– 27,9983)	0.22	2,6	2,4	92,4	0,21
I8	SALESSPDPATLSEDEAR / SALESSPADPTLSEDEAR	0.15	1,8	1,7	92,4	0,15
I9	SSALESSPADPATLSEDEAR	0.10	1,3	1,2	92,4	0,10
I10	SALESSPADPATLSDEAR	0.42	4,7	4,4	93,0	0,38
I11	SAALESSPADPATLSEDEAR	0.14	1,8	1,6	92,7	0,14
I12	N-acétyl-PADPATLSEDEAR	0.22	1,9	1,8	92,4	0,16

(*) hypothèse : modification non-identifiée en C-terminal du peptide, hypothèse que la modification n'introduit pas un acide aminé supplémentaire de type alanine, leucine ou proline

L'estimation de la quantité des impuretés par l'approche relative a montré une pureté de 97,36 % pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Les deux impuretés majeures sont la forme tronquée SALESSPAD (0,63 %) et la forme avec perte d'un acide glutamique SALESSPADPATLSDEAR (0,38 %). Cependant, il est important de noter qu'en utilisant l'approche relative, un facteur de réponse de 1 par rapport au peptide SALESSPADPATLSEDEAR en LC-MS a été appliqué pour les impuretés. Cette approche relative est utilisée pour estimer la quantité des impuretés ayant des séquences similaires avec le peptide avec, de préférence, un acide aminé de différence (273). Or, parmi les impuretés identifiées, les impuretés I4, I5 et I12 ont respectivement une différence de 47 %, 53 % et 32 % en termes de séquence d'acides aminés

par rapport au peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Ces impuretés ont probablement une réponse en LC-MS très différente de celle du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Cela peut impacter la détermination des quantités des impuretés par l'approche relative. De plus, les trois formes isobariques sont distribuées de façon aléatoire pour les trois pics chromatographiques dans l'estimation du rapport des aires. L'impureté I7 n'est pas identifiée, et la correction de concentration finale pose l'hypothèse que l'alanine, la leucine et la proline ne sont pas impactées. Dans cette étude, la caractérisation de l'étalon peptidique est réalisée par l'approche de quantification relative dans une première étape, puis une étude plus poussée avec les peptides étalons des impuretés sera réalisée si la faisabilité d'un étalonnage peptidique pour le développement d'une méthode de référence d'ordre supérieur est démontrée.

II.2.1.4 Estimation des incertitudes

L'estimation des incertitudes sur la concentration finale du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été menée selon l'approche de propagation des incertitudes de mesures décrite dans le GUM (28). Cette estimation des incertitudes prend en compte les incertitudes liées à la concentration de l'étalon primaire (acide aminé pur), à la préparation des solutions étalons (Q_{etal}), au modèle d'étalonnage (Q_{lin}), à la préparation des échantillons (Pesées), et à la fidélité intermédiaire de la méthode de quantification (Fidélité). Il est d'abord nécessaire d'estimer l'incertitude de la concentration de chaque acide aminé, puis l'incertitude liée à la variation entre les concentrations du peptide estimées à travers la quantification des différents acides aminés

- <u>Estimation des incertitudes sur la concentration des acides aminés</u>

La concentration des acides aminés dans la solution mère a été déterminée comme la moyenne des résultats obtenus par les dix réplicas d'hydrolyse sur trois expérimentations indépendantes. . Les incertitudes associées à la valeur de concentration (µmol/L) de chaque acide aminé ont été calculées selon l'équation 12. La concentration de l'acide aminé C_{AA} est exprimée en µmol/g et non en µmol/L en raison de la préparation gravimétrique (la densité de la solution n'est pas encore prise en compte dans ces calculs).

$$\boldsymbol{C_{AA}} = \frac{\boldsymbol{m_{AA*}\ x\ C_{AA*}\ x\ Q}}{\boldsymbol{m_{ech}}}\ \boldsymbol{x}\ \frac{\boldsymbol{1}}{\boldsymbol{M_{AA}}}\ \boldsymbol{x\ Dil} + \boldsymbol{F} \quad \textit{Equation 21}$$

Avec :

C_{AA} : concentration d'acide aminé dans l'échantillon (µmol/g)

m_{AA*} : masse de solution d'acide amine marqué ajoutée (g)
C_{AA*} : concentration de la solution d'acide aminé marqué (µg/g)
Q : rapport des quantités de matière déterminé par la courbe d'étalonnage
m_{ech}: masse d'échantillon (g)
M_{AA}: masse molaire d'acide amine (g/mol)
Dil : facteur de dilution lié à la préparation d'échantillon à partir de la solution mère
F : fidélité des mesures $(F = 0)$

Dont les incertitudes types associées sont :

u(m_{AA*}), u(m_{ech}), u(Dil), sont déterminées par les incertitudes de pesée lors de la préparation des échantillons.
u(C_{AA*}) = 0
u(F) = $\frac{s}{\sqrt{N}}$ (s : écart-type entre les hydrolyses, N : le nombre d'hydrolyses indépendantes)
$Q = Q_{lin} * Q_{etal} = (a * R_{ech} + b) * Q_{etal}$
R_{ech} : rapport des aires du signal correspondant dans l'échantillon
Q_{etal} $(Q_{etal} = 1)$: facteur de correction lié à l'incertitude de la concentration des solutions étalons
a, b : pente et ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage

L'incertitude finale de la concentration de chaque acide aminé u(C_{AAi}) prend donc en compte l'incertitude liée à la préparation d'échantillon, au modèle d'étalonnage, à la pureté de l'étalon primaire utilisé pour la quantification de l'acide aminé concerné et à la fidélité des mesures.

- <u>Estimation de l'incertitude sur la concentration du peptide SALESSPADPATLSEDEAR après la correction des contributions des impuretés</u>

Après avoir déduit la contribution de chaque impureté contenant un ou plusieurs acides aminés utilisés pour la quantification du peptide, la concentration molaire finale de la solution mère du peptide a été déterminée en effectuant la moyenne des concentrations molaire obtenues par chaque acide aminé (alanine, leucine et proline). L'incertitude pour la concentration moyenne est calculée selon l'équation 13.

$$\boldsymbol{u\left(C_{AA,moyenne}\right) = \frac{1}{3}\sqrt{u^2(C_{alanine}) + u^2(C_{isoleucine}) + u^2\left(C_{proline}\right)}} \quad \textit{Equation 13}$$

Il faut également prendre en compte l'incertitude liée à la variabilité entre les acides aminés, cette composante u(interAA) est évaluée au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. L'incertitude finale de la concentration molaire mesurée du peptide est calculée selon l'équation 14 :

$$u(C_{peptide}) = \sqrt{u^2(C_{AA,moyenne}) + u^2(interAA)} \quad \textit{Equation 14}$$

La fraction massique du peptide (µg/g) est obtenue en multipliant la concentration molaire du peptide par sa masse molaire. L'incertitude associée à la masse molaire étant nulle, l'incertitude associée à la fraction molaire est déterminée en multipliant l'incertitude de la concentration molaire par la masse molaire. L'incertitude obtenue pour la fraction massique de chaque impureté et du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est détaillée dans le *Tableau 14*. La fraction finale du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est de :

1206 ± 39 µg/g (k=2)

soit une incertitude élargie relative de 3,3 %. La *Figure 50* représente la fraction massique moyenne du peptide dans la solution mère, ainsi que la fraction massique du peptide obtenue en fonction de chaque acide aminé.

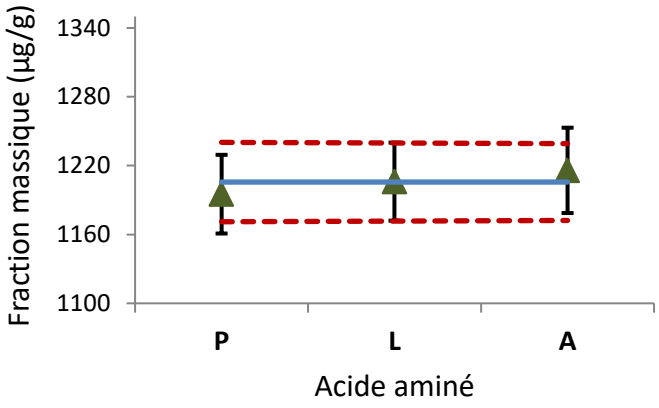


Figure 50. Représentation de la fraction massique du peptide SALESSPADPATLSEDEAR en fonction de l'acide aminé utilisé

Le triangle en vert représente la fraction massique du peptide obtenue pour chaque acide aminé. La ligne bleue représente la fraction massique moyenne obtenue en utilisant les trois acides aminés alanine, leucine et proline. Les lignes pointillées en rouge représentent les incertitudes élargies de la fraction massique moyenne.

La *Figure 51* représente le budget d'incertitude de chaque composante dans l'évaluation de l'incertitude associée à la fraction massique moyenne du peptide standard. La contribution majeure de l'incertitude finale est associée à la fidélité intermédiaire entre les hydrolyses de la quantification des acides aminés et à l'estimation des fractions massiques des impuretés. Ces contributions peuvent être diminuées dans un premier temps en répliquant le nombre

d'hydrolyses indépendantes (N). En effet, comme le montre la *Figure 51 B*, la contribution majeure de l'incertitude finale sur la quantification de chaque acide aminé est liée à la fidélité entre les hydrolyses. Dans un deuxième temps, l'incertitude finale peut être réduite en réalisant une quantification absolue plus fine des impuretés. En effet, comme décrit pour la quantification des impuretés avec l'approche relative, un facteur de réponse de 1 a été utilisé pour toutes les impuretés, or il y a des impuretés ayant des séquences d'acides aminés très différentes de celle du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Ce facteur de réponse peut être différent pour chaque impureté, une incertitude relative de 80 % (k=1) a été appliquée pour le facteur de réponse afin de couvrir ses variations. Une quantification de chaque impureté par ID-LC/MS/MS permettrait une meilleure estimation de cette incertitude de mesure.

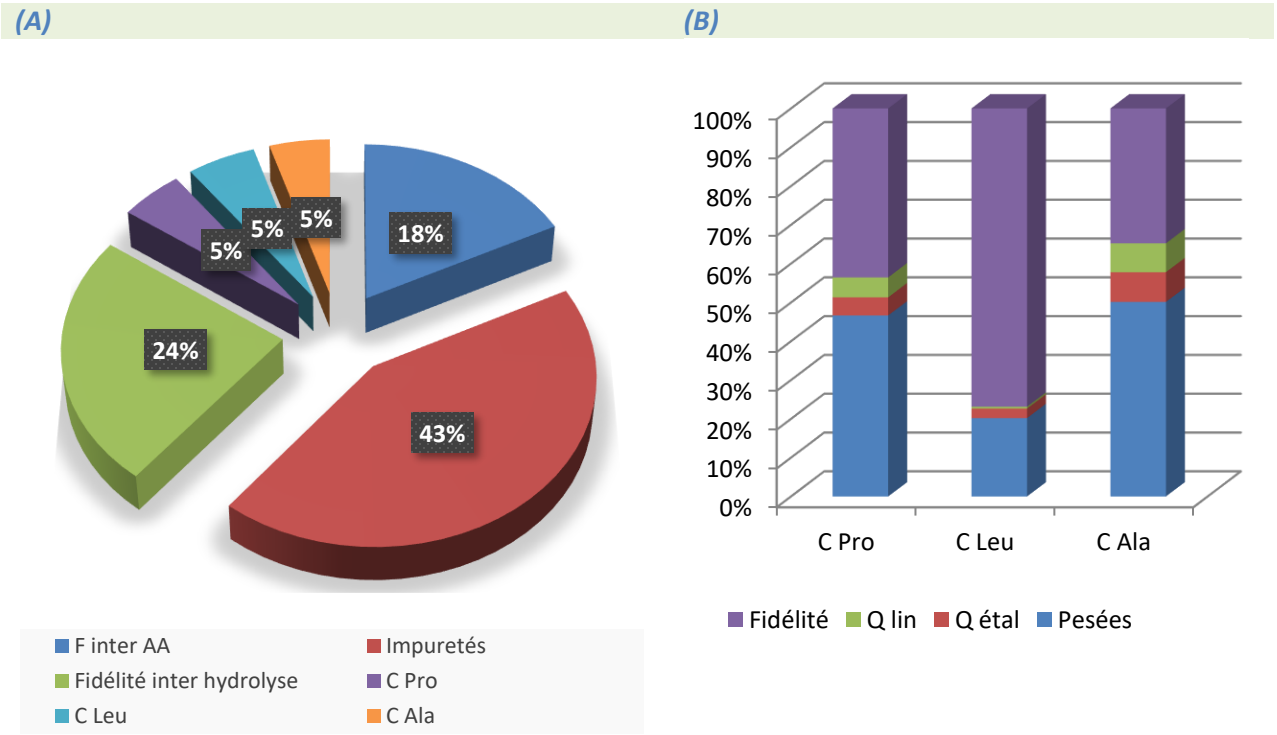


Figure 51. Représentation graphique de la contribution relative de chaque composante du budget d'incertitude dans l'incertitude associée à la fraction massique moyenne du peptide SALESSPADPATLSEDEAR (A), ainsi que les contributions relatives des composantes du budget d'incertitude de la fraction massique obtenue pour chaque acide aminé (B)

Impuretés : incertitude liée à la détermination des impuretés ; F inter AA : incertitude liée à la variabilité entre les acides aminés ; Fidélité inter hydrolyse : incertitude liée à la reproductibilité de j'hydrolyse ; C Pro, C Leu, C Alan : incertitude liée à la détermination de la concentration d'acide aminé Pro, Leu et Ala dans la solution mère du peptide ; Q lin : incertitude liée à la régression linéaire ; Q étal : incertitude liée à l'étalon, Pesées : incertitude liée à la préparation des solutions

La solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été analysée par l'approche PICAA, la fraction massique finale est de 1206 ± 39 µg/g (k=2) avec une incertitude relative de 3,3 %. Cette incertitude étant suffisamment faible pour répondre au besoin de la méthode de quantification de la PCT, la solution mère du peptide a été donc utilisée pour la préparation des solutions étalon pour la quantification de la PCT dans le sérum humain avec l'approche d'étalonnage peptidique (voir A.II.3.4).

II.2.2 Etalon primaire protéique

Lors de l'utilisation d'une approche de quantification basée sur un étalonnage protéique, il est nécessaire de disposer d'un étalon primaire de la protéine d'intérêt, constitué d'une protéine recombinante.

La protéine PCT recombinante utilisée dans ce projet est une forme modifiée par rapport à la séquence de la protéine PCT entière. Il s'agit de l'isoforme PCT (3-116) avec une méthionine supplémentaire en position N-terminale de la protéine. Cette protéine a été produite par Promise Advanced Proteomics (Grenoble, France) avec une pureté supérieure à 95 % estimée par le fabricant en HPLC-UV. La protéine a été purifiée par trois techniques orthogonales : chromatographie en phase inverse, chromatographie échangeuse de cation et chromatographie d'exclusion stérique afin d'éliminer au maximum les impuretés. La protéine PCT recombinante est disponible en solution dans un tampon à pH 7,8 contenant 20mM de Tris et 100mM de NaCl. La concentration en protéine recombinante dans la solution fournie par Promise Advanced Proteomics a été déterminée par un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA pour BiCinchoninic acid Assay). Cette solution est appelée solution mère de la protéine dans la section B.II.2.2. La concentration de la solution mère de la protéine est déterminée par l'approche PICAA.

II.2.2.1 Analyse des acides aminés :

Dans la séquence de la PCT (*Figure 52*), six acides aminés stables dans les conditions d'hydrolyse acide peuvent être utilisés pour la détermination de la concentration par AAA selon le protocole disponible au laboratoire (alanine, proline, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine). Cependant, l'acide aminé isoleucine ne présente qu'un seul résidu dans la séquence de la PCT et est connu pour être difficilement hydrolysé (274). Une faible variabilité dans la quantification de l'isoleucine peut donc engendrer une forte variabilité dans la quantification de la protéine recombinante. L'alanine est l'acide aminé le plus hydrophile de l'ensemble des six acides aminés quantifiés selon le protocole. Par conséquent il est faiblement retenu sur une colonne chromatographique en phase inverse. Dans le cas présent, la

quantification de l'alanine a été exclue d'un point de vue technique car la rétention de cet acide aminé n'était pas suffisante lors des expérimentations (temps de rétention correspondant au volume mort). La concentration de la solution mère de la protéine a finalement été déterminée par la quantification de la leucine, la phénylalanine, la proline et la valine.

Figure 52. Séquence d'acides aminés de la protéine PCT recombinante et stœchiométrie des différents acides aminés obtenue après hydrolyse en milieu acide

Comme décrit dans la section A.IV.3.2.4, une hydrolyse complète est cruciale pour assurer une quantification juste par l'AAA. Comme démontrée dans la section précédente, l'hydrolyse en phase gazeuse présente une meilleure fidélité par rapport à l'hydrolyse en phase liquide. Seule l'hydrolyse en phase gazeuse a donc été appliquée pour la protéine PCT recombinante. Dans la section précédente, l'hydrolyse du peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été réalisée dans des conditions classiques d'hydrolyse de peptides. Cependant, dans le cas d'une protéine, dont la taille est plus importante par rapport aux peptides, les conditions optimales d'hydrolyse peuvent être différentes. Par conséquent, différents temps d'hydrolyse (24 h, 40 h et 72 h) ainsi que différentes températures (110 °C, 130 °C, 150 °C) ont été évalués afin de déterminer les conditions d'hydrolyse optimales pour la quantification de l'étalon primaire protéique.

Le *Tableau 15* présente les résultats obtenus en fonction des conditions d'hydrolyse. La concentration maximale a été obtenue lors de l'hydrolyse à 130 °C pendant 40h. La condition d'hydrolyse avec la température moins élevée (110 °C, 40h) a abouti une concentration plus faible de 8,1 % de moins par rapport à la condition (130 °C, 40h). Cela peut être expliqué par une hydrolyse incomplète en raison de la température insuffisante. Pour les conditions avec une température plus élevée (150 °C, 40h) ou avec un temps d'hydrolyse plus long (130 °C, 72h), la concentration obtenue est plus faible, respectivement 4,1 % et 10,1 %. Cette observation est liée à la dégradation des acides aminés dans de telles conditions. Parmi les deux conditions d'hydrolyse à 130°C (24h et 40h), la concentration maximale pour la valine est obtenue pour un temps d'hydrolyse plus long (40h d'hydrolyse). En effet, la liaison peptidique de valine est connue pour être difficile à hydrolyser (275). Cependant, après 40h d'hydrolyse, la concentration obtenue par les 4 acides aminés est plus dispersée (coefficient de variation de

3,8 %) par rapport à la condition de 24h (0,9 %). Cette plus grande dispersion des résultats entre acides aminés peut être expliquée par la présence des impuretés ayant des résidus valine. La condition d'hydrolyse (130 °C, 40h) a été finalement retenue pour la détermination de la concentration de la solution mère.

Tableau 15. Résultats non corrigés par la contribution des impuretés obtenus par analyse des acides aminés dans différentes conditions d'hydrolyse en phase gazeuse (température et temps d'hydrolyse)

Condition d'hydrolyse	Concentration (µg/g) (CV %, n = 4) *				Concentration moyenne (µg/g) (CV %)
	Leu	Phe	Pro	Val	
110 °C, 40 h	814,4 (1,0)	808,7 (1,4)	804,7 (1,3)	814,4 (1,0)	819,5 (2,6)
130 °C, 24h	871,0 (1,6)	**867,3 (0,5)**	866,4 (2,1)	882,5 (3,3)	871,8 (0,9)
130 °C, 40h	**878,2 (1,9)**	864,4 (1,8)	**881,2 (2,1)**	**941,3 (2,1)**	891,3 (3,8)
130 °C, 72h	851,1 (3,5)	839,2 (3,0)	848,4 (4,9)	881,5 (5,4)	855,1 (2,1)
150 °C, 40h	775,6 (1,1)	773,5 (1,5)	783,2 (0,8)	873,6 (1,3)	801,5 (6,0)

(*) résultat exprimé en fraction massique de la protéine PCT dans la solution mère en supposant que la pureté de la protéine est de 100 %

Un exemple de chromatogramme d'ion total obtenu lors de l'analyse de l'échantillon de la protéine PCT recombinante est présenté dans la *Figure 53*.

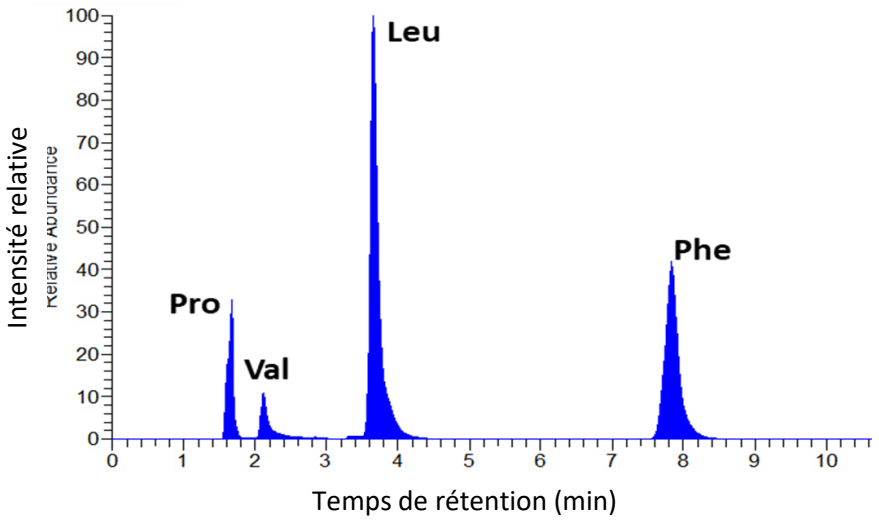


Figure 53. Chromatogramme d'ion total obtenu pour un échantillon d'étalon primaire protéique issu d'une hydrolyse en phase gazeuse à 130 °C pendant 40 °C.

Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA. Colonne : Acquity UPLC, BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm. Débit : 150 µL/min. Température de la colonne : 25 °C. Gradient : 1 % entre 0 et 10 min, de 1 % à 2,5 % en 3 min. Détection : MS en mode SIM.

II.2.2.2 Analyses des impuretés

La caractérisation d'étalon primaire de type protéique est d'autant plus complexe que celle d'un étalon primaire de type peptidique. En effet, les impuretés pouvant être de nature protéique proche ou non de la séquence de la protéine d'intérêt, avec ou sans modifications chimiques ou post-traductionnelles, il est difficile d'identifier la séquence d'acides aminés entière des impuretés protéiques et d'estimer la quantité de chaque impureté dans la solution mère par LC-HRMS et LC-MS/MS. Pour la quantification de chaque impureté, il est également difficile de disposer des impuretés protéiques avec des modifications précises pour une quantification avec un étalonnage externe. L'approche de quantification relative à partir des aires du pic représente alors la stratégie la moins complexe. Cependant, la concentration finale de la protéine dans la solution mère est obtenue suite à la correction du résultat de l'AAA par les contributions des impuretés. Il est donc primordial de connaitre la séquence exacte de chaque impureté retenue. En outre, la stratégie de correction dépend également de la stratégie de la méthode de quantification en matrice). La *Figure 54* décrit un exemple fictif d'une solution mère de la PCT contenant trois impuretés, correspondant à une forme oxydée de la PCT sur une méthionine n'appartenant ni au peptide SALESSPADPATLSEDEAR, ni au peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, une forme tronquée de la PCT et une forme de la PCT avec une modification de la phénylalanine du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Selon la stratégie de quantification de la PCT en sérum développée dans le cadre de cette thèse, la PCT est quantifiée par le biais de deux peptides protéotypiques SALESSPADPATLSEDEAR et

FHTFPQTAIGVGAPGK. Dans ce cas, la correction ne sera pas nécessaire pour le premier peptide car les trois impuretés peuvent produire également le peptide SALESSPADPATLSEDEAR lors de la digestion tryptique. En revanche, il faut faire une correction pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, car la troisième impureté est une forme modifiée de ce peptide après digestion enzymatique. Pour la correction des contributions des analyses AAA, il ne faut pas, dans le cas de l'impureté 3, tenir en compte l'acide aminé phénylalanine modifié dans la correction du résultat obtenu pour la phénylalanine. La stratégie est donc extrêmement complexe et toutes ces étapes soulignent l'importance de connaitre la séquence entière des impuretés protéiques présentes en très faible quantité, ce qui est difficilement envisageable. Afin de diminuer la complexité de la caractérisation d'un étalon primaire protéique, il est impératif de purifier au maximum cet étalon afin de minimiser la présence d'impureté. Cette stratégie a été sélectionnée dans le cadre de ce projet de thèse, grâce à une relation étroite établie avec Promise Advanced Proteomics pour la purification de la protéine recombinante produite. Ainsi, trois étapes de purification orthogonales ont été développées par le fournisseur (chromatographie en phase inverse, chromatographie échangeuse de cation et chromatographie d'exclusion stérique).

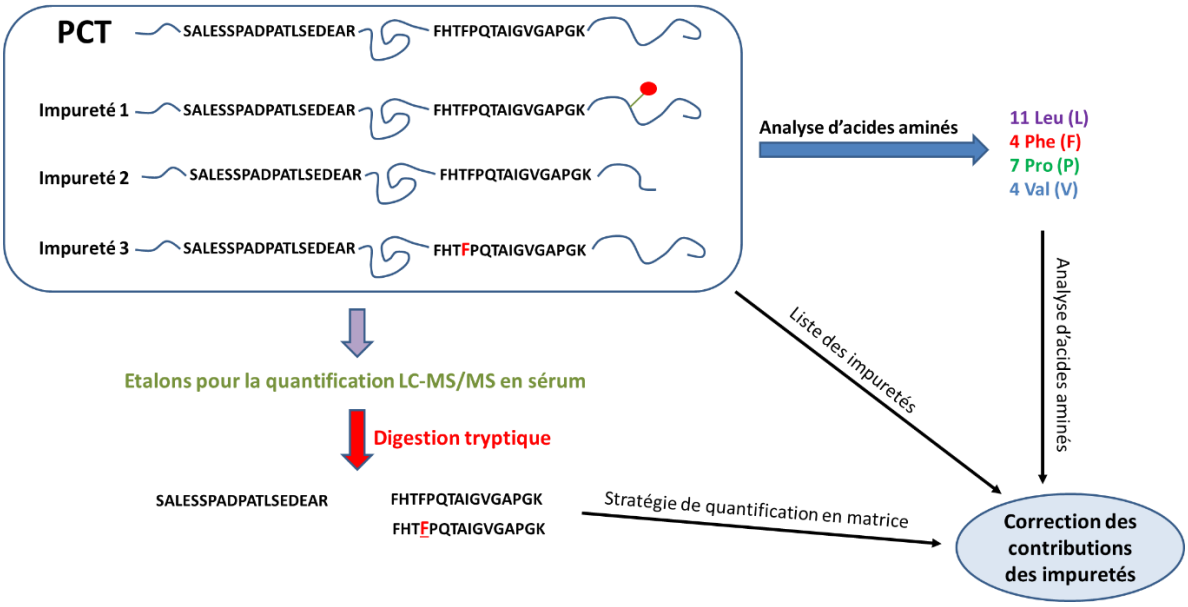


Figure 54. Stratégie de correction des contributions des impuretés dans l'approche PICAA pour un étalon primaire de type protéique

Dans le cadre de ce travail de thèse, le profil d'impureté de la protéine PCT recombinante a été déterminé par spectrométrie de masse à haute résolution sur le spectromètre de masse Q Exactive™ Focus hybride Quadripôle-Orbitrap (ThermoFisher

Scientific). Les impuretés ont été identifiées d'abord par analyse LC-MS de masse intacte, puis leur identité a été confirmée par des analyses en LC-MS/MS en mode top-down avec le spectromètre de masse Orbitrap Eclipse Tribrid (ThermoFisher Scientific).

L'identification des impuretés a été réalisée en analysant une solution diluée de la protéine recombinante à une concentration d'environ 80 µg/g dans 5 % (v/v) acétonitrile dans l'eau MilliQ. Différentes conditions de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse ont été testées afin d'obtenir la meilleure séparation possible entre les impuretés et la protéine recombinante et d'exclure la génération d'artéfact dans la source du spectromètre de masse. Les conditions finales de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse sont détaillées dans l'Annexe C. Le chromatogramme et le spectre MS de la protéine PCT obtenus, ainsi que le spectre MS de la distribution des états de charge sont présentés dans la *Figure 55*.

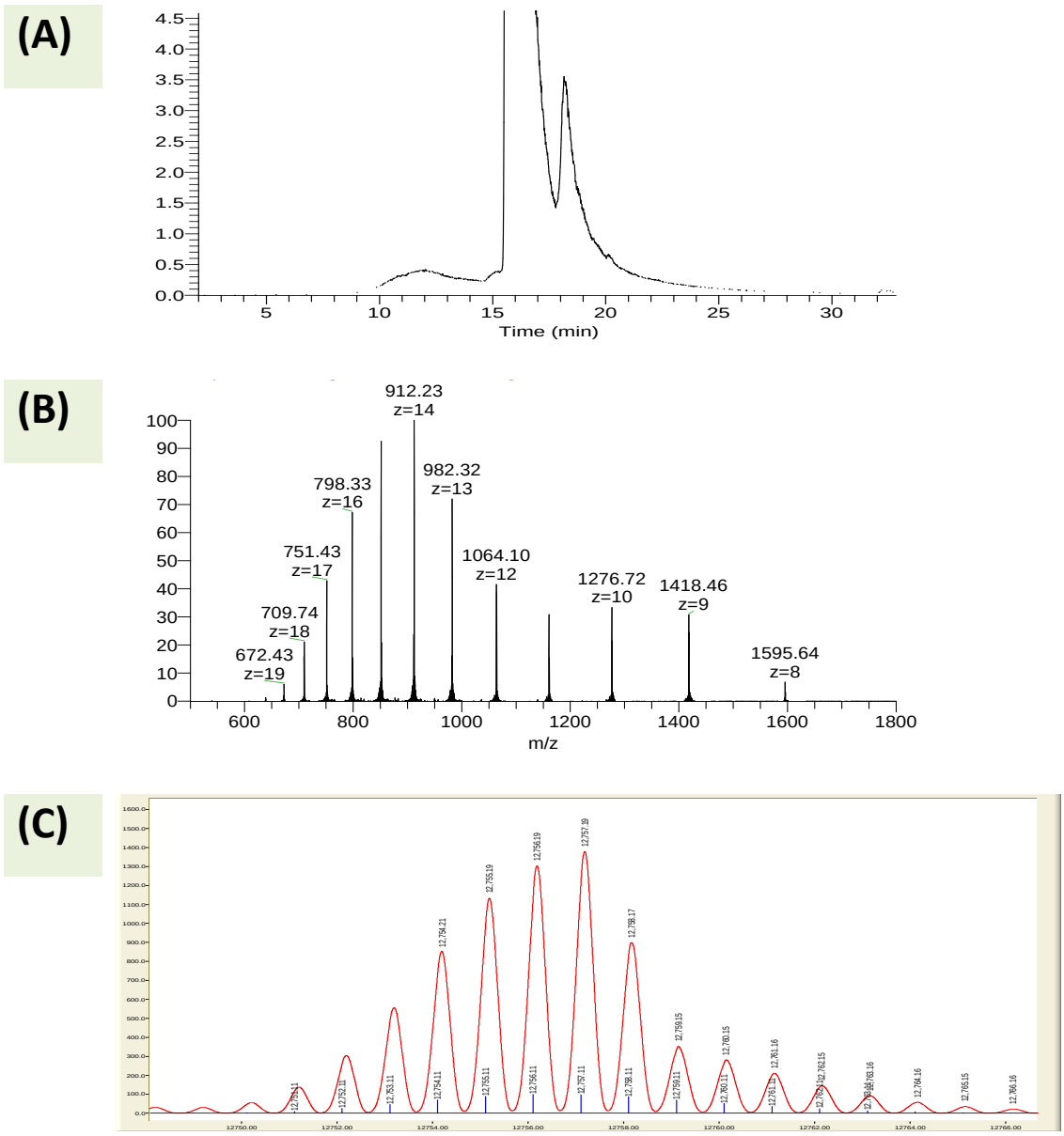


Figure 55. Chromatogramme et spectre de masse obtenus lors de l'analyse LC-HRMS de la protéine recombinante PCT.

Le panel (A) présente un chromatogramme de la solution diluée de la solution mère à une concentration 80 µg/g dans 5 % (v/v) ACN. Le panel (B) présente le spectre de masse correspondant au pic chromatographique majoritaire (15,85 min) (300m/z-1000m/z). Le panel (C) représente une superposition de la distribution isotopique théorique (barre bleu) et celle observée (rouge) après la déconvolution.

En raison des nombreux états de charge de chaque impureté protéique, la distribution de charges peut varier d'une impureté à l'autre. Afin d'estimer la quantité de chaque impureté par l'approche relative des aires de pics chromatographiques, l'aire sous le pic correspondant à la masse monoisotopique a été extraite dans le chromatogramme obtenu après déconvolution, pour chaque impureté avec une erreur de masse de 20 ppm. Les principales impuretés présentes dans la solution mère de la PCT recombinante sont résumées dans le *Tableau 16*. Seules les impuretés dont l'aire sous le pic représentait plus de 0,1 % de l'aire du pic principal ont été retenues. Les deux impuretés majeures détectées en LC-HRMS sont les formes avec une différence de masse de +15,9446 Da et de +42,0110 Da qui présentent un rapport des aires chromatographiques de 5,07 % et 2,14 % par rapport à la protéine PCT recombinante.

Tableau 16. Résultat d'analyse en masse intacte HRMS de la solution mère de la protéine PCT

Masse mono-isotopique	Temps de rétention (min)*	Intensité du pic	Aire du pic	Différence de masse par rapport à la PCT (Da)	Rapport des aires (%)
12749,1456 (PCT)	15,83	6,8E+07	1,4E+09	-	100,00
12765,1029	15,65	5,6E+06	7,1E+07	15,9573	**5,07**
12791,1566	18,19	1,3E+06	3,0E+07	42,0110	**2,14**
11380,4462	16,97	7,8E+05	7,4E+06	-1368,6994	0,53
12778,0834	15,61	8,6E+05	7,3E+06	28,9378	0,52
12732,0461	15,78	7,9E+05	6,4E+06	-17,0995	0,46
11458,5201	16,18	3,6E+04	1,4E+06	-1290,6255	0,10

(*) déterminé à partir du chromatogramme après la déconvolution

II.2.2.2.1 **Confirmation de l'identité de la PCT recombinante par l'approche *top-down***

L'identification de la PCT recombinante a été confirmée par une analyse MS/MS de la protéine entière par la spectrométrie de masse sur un instrument Orbitrap Eclipse™ Tribrid (ThermoFisher Scientific). L'analyse a été réalisée par infusion directe de la solution diluée à une concentration de 80 µg/g dans 50 % (v/v) de méthanol et 0,1 % (v/v) d'acide acétique dans l'eau MilliQ. La combinaison de différents modes de fragmentation (HCD, CID, EThCD, UVPD) a

été étudiée afin d'obtenir une couverture maximale de la séquence de la protéine PCT recombinante. Les spectres de fragmentation obtenus ont été ensuite déconvolués, puis analysés avec le logiciel ProSight Lite (Université Northwestern, Etats-unis). Les ions produits déconvolués sont comparés à la liste des ions produits théoriques neutres et monoisotopiques avec une masse d'erreur de 10 ppm.

Pour la forme à m/z de 912,3033 (z=14), le mode UVPD a permis d'obtenir le plus de fragments (80 fragments). Cependant, l'information obtenue par chaque mode de fragmentation est différente. La combinaison des résultats des quatre modes de fragmentation a permis d'augmenter le taux de recouvrement de la séquence de 34 % pour le mode CID à 60 % pour les quatre modes. Le nombre de fragments ainsi que le taux de recouvrement de chaque mode de fragmentation de l'ion m/z de 912,3033 (z=14) sont présentés dans la *Figure 56*.

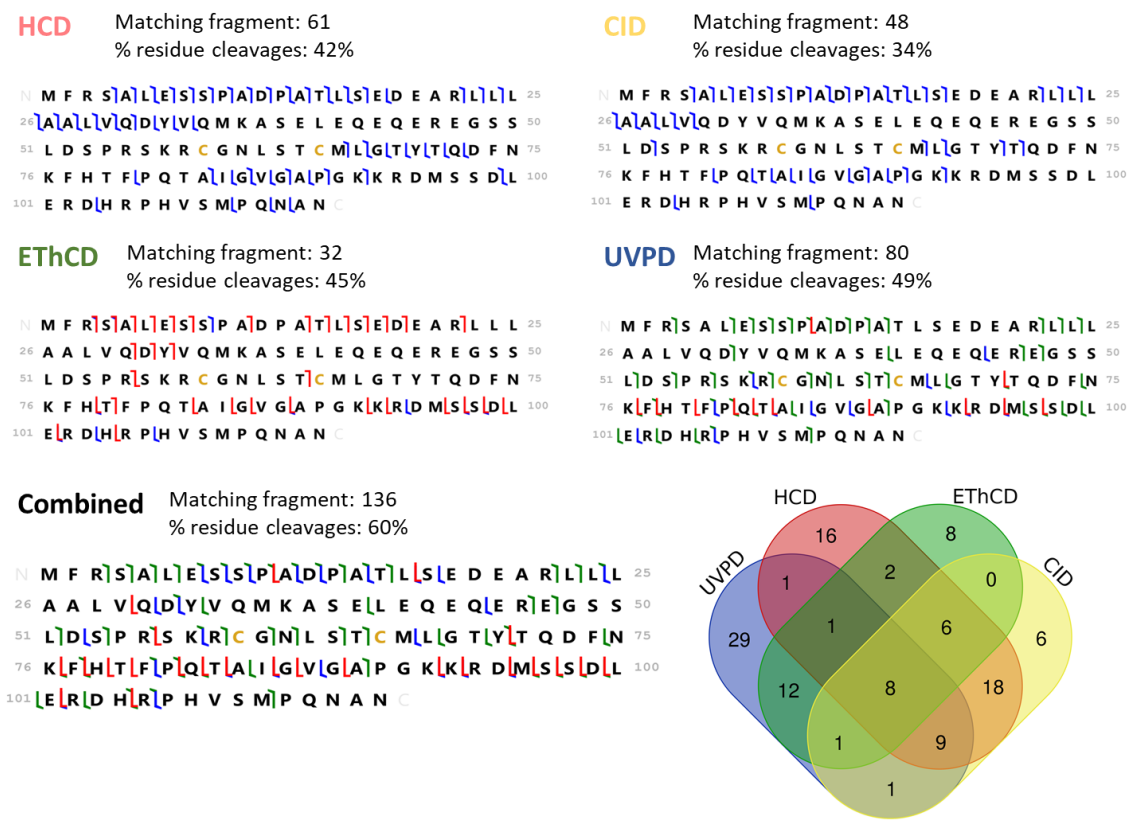


Figure 56. Confirmation de la séquence d'acides aminés de la protéine PCT recombinante par l'approche top-down

L'expérience a été réalisée avec une solution de la PCT à 80 µg/g en mode infusion directe. Le précurseur 912,3033 (m/z = 14) a été fragmenté par les 4 modes de fragmentations HCD (35 NCE, CID 20, EThCD 20 – 15 et UVPD 100). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel ProSight Lite.

II.2.2.2.2 **Identification des impuretés par MS/MS**

Dans le cadre de ce manuscrit, l'identification des deux impuretés majeures par l'approche *top-down* avec deux modes de fragmentation (HCD et CID) est présentée. Ceci a été effectué par une analyse en nano-LC couplée au spectromètre de masse Orbitrap Eclipse Tribrid. L'expérience a été réalisée avec une solution de la PCT à environ 80 µg/mL dans 5 % (v/v) ACN. Le protocole d'analyse est détaillé dans l'annexe D. L'identification des autres impuretés devra être poursuivie afin de corriger leur contribution en AAA et évaluer l'impact sur la détection des deux peptides protéotypiques.

a. Impureté PCT forme acétylée

Les spectres de fragmentation MS/MS en mode HCD de la protéine PCT ainsi que la forme PCT acétylée sont présentés dans la *Figure 57*. Le spectre de fragmentation montre un incrément de masse de 42,01 pour certains ions produits tels que b_6+, b_7+, b_9+ et b_{12}+ confirmant le résultat obtenu lors de l'analyse de masse intacte. La modification est donc située sur les six premiers acides aminés N-terminaux. Ces spectres de fragmentation ont été ensuite déconvolués, puis analysés avec le logiciel ProSight Lite.

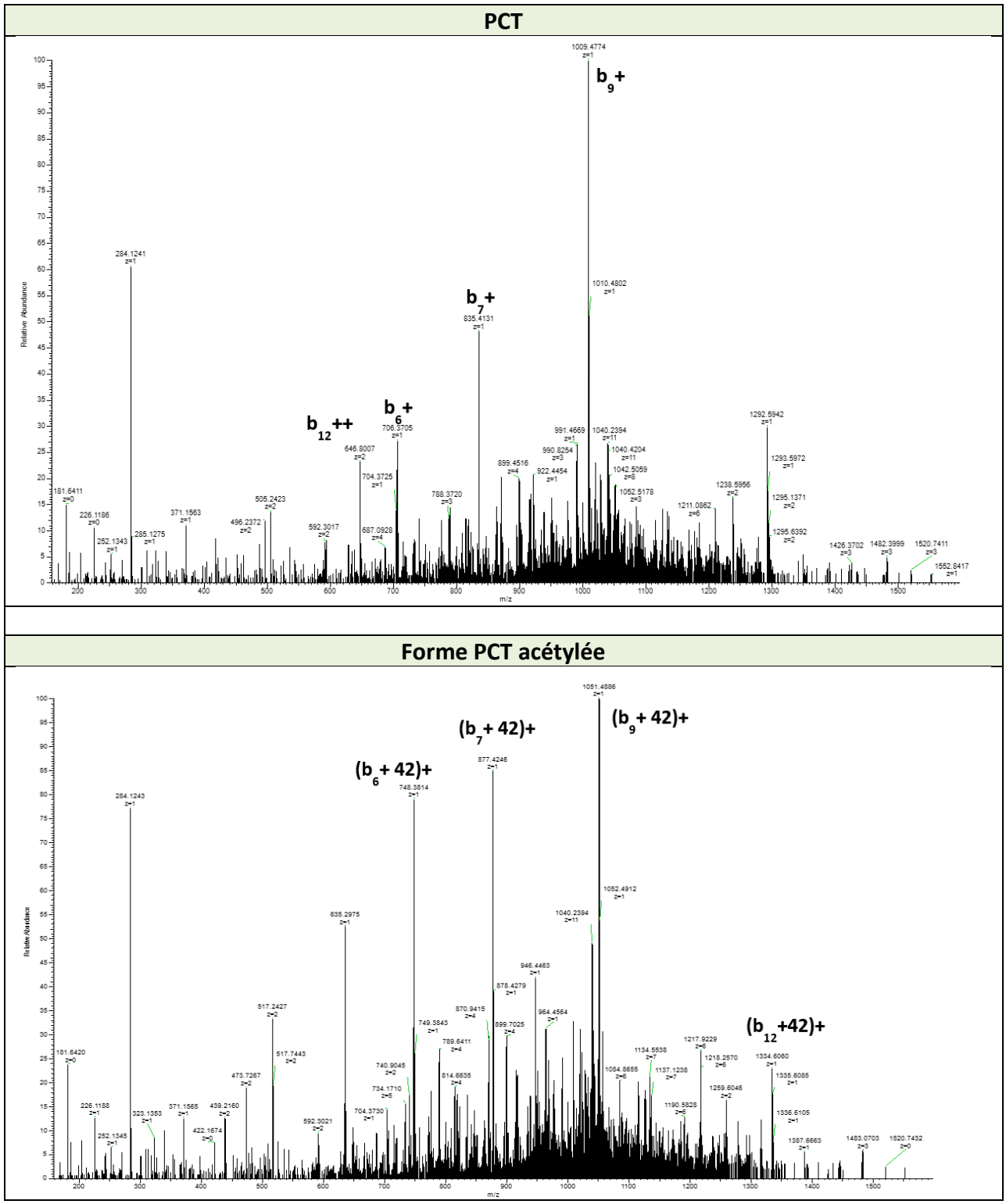


Figure 57. Spectre de fragmentation MS/MS de la protéine PCT et sa forme acétylée en mode HCD

L'expérience a été réalisée avec une solution de la PCT à 80 µg/g en mode nanoLC-MS/MS. Le précurseur 912,3033 (m/z = 14) pour la PCT et le précurseur 915,2327 (m/z = 14) ont été fragmentés en mode HCD (35 NCE).

Afin de vérifier que la modification acétylée n'appartient pas à la séquence du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, une évaluation des scores PCS et P-score obtenus par le logiciel ProSight Lite en fonction des différents acides aminés de la séquence du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK a été effectuée. Plus le score PCS (score de caractérisation des protéoformes) est grand, meilleur il est, et inversement pour le score P-score, qui est meilleur quand sa valeur est faible. Comme le montre la *Figure 58*, les meilleurs scores PCS et P-score sont obtenus lorsque la modification acétylée est située sur les trois premiers acides aminés de la protéine PCT recombinante (M, F, R) qui n'appartiennent pas à la séquence de deux peptides sélectionnés. Parmi ces trois positions, la modification acétylée sur la méthionine N-terminale et sur l'arginine est plus probable en raison de la présence du groupement amine.

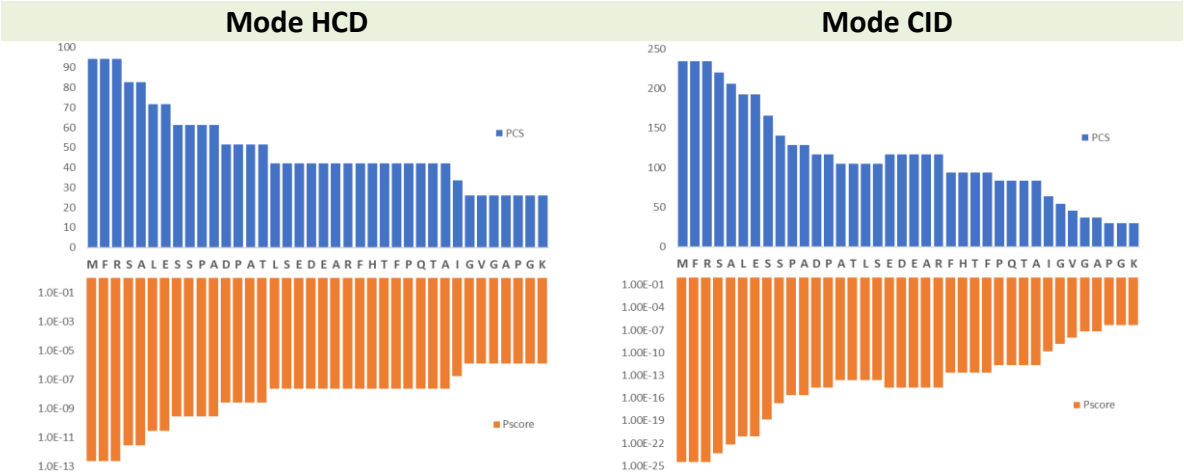


Figure 58. Présentation du score PCS et P-score en fonction de la position de la modification « acétylé » en mode HCD et CID de l'ion précurseur 915,2327 (m/z)

Par conséquent, la forme acétylée n'impacte pas les deux peptides protéotypiques sélectionnés : la quantité produite de ces deux peptides par protéolyse reste inchangée, la correction de la contribution de cette impureté sur le résultat de l'AAA n'est pas nécessaire.

b. Impureté PCT forme oxydée

Quant à la forme oxydée de la protéine PCT, les données spectrales obtenues n'ont pas permis de déterminer la position exacte de la modification sur la séquence d'acides aminés et de discriminer s'il y a un impact sur les deux peptides sélectionnés. L'investigation pour une caractérisation plus approfondie est nécessaire et sera poursuivie. A ce stade, l'hypothèse a été

posée que la forme oxydée n'impacte pas la quantité produite de ces deux peptides, la correction n'est donc pas nécessaire.

II.2.2.3 Détermination de la concentration corrigée

La PCT a été purifiée avec l'utilisation de trois techniques orthogonales ; chromatographie en phase inverse, échangeuse de cation et chromatographie d'exclusion sérique afin d'éliminer au maximum les interférences. En outre, la solution mère de la PCT ne contient que deux impuretés majeures (forme acétylée et forme oxydée). Or ces deux modifications ne sont pas situées sur la séquence des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK qui sont utilisés pour la quantification de la PCT en sérum. Par conséquent, il n'y a pas de correction des contributions des impuretés. La concentration finale de la solution mère est celle obtenue par l'AAA.

II.2.2.4 Estimation des incertitudes

L'incertitude finale associée à l'AAA est estimée comme décrit dans la section B.II.2.1.4. La *Figure 59* représente le budget d'incertitude de chaque composante dans le calcul de l'incertitude associée à la fraction massique moyenne de la protéine standard. La contribution majeure de l'incertitude finale est associée à la fidélité inter acides aminés avec plus de 81 %. Cette large contribution est due à la différence de fraction massique entre l'acide aminé valine par rapport aux trois autres acides aminés (leucine, proline et phénylalanine). L'analyse des impuretés n'a pas permis de mettre en évidence la surestimation de la fraction massique de la valine. Quant à l'incertitude du résultat obtenu par chaque acide aminé, la contribution majeure est la fidélité entre hydrolyses, qui peut être réduite en augmentant le nombre d'hydrolyses indépendantes (N).

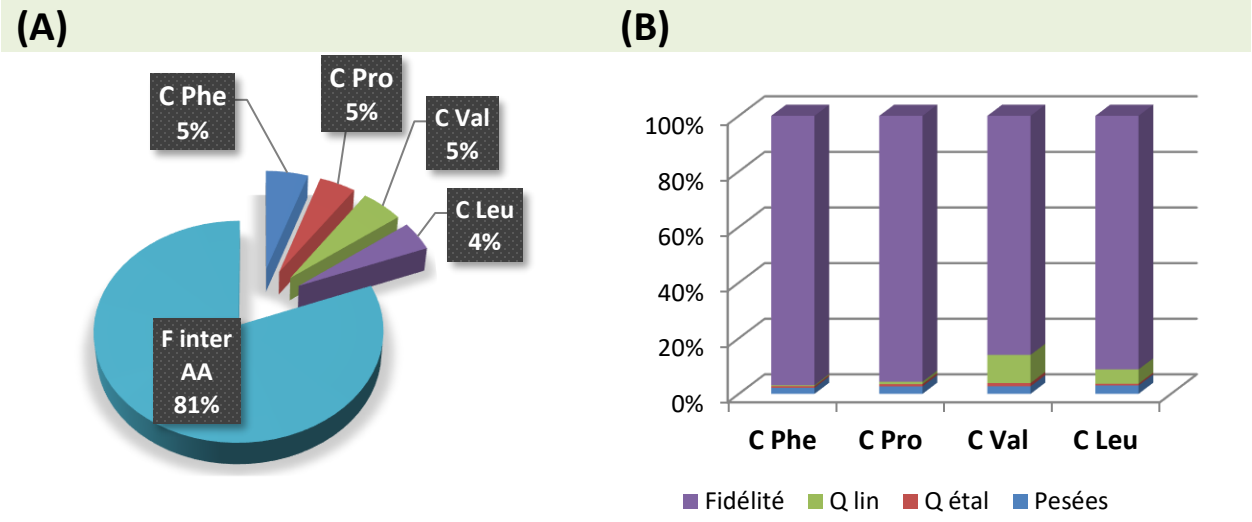


Figure 59. Représentation graphique de la contribution relative de chaque composante du budget d'incertitude dans l'incertitude associée à la fraction massique moyenne de la protéine standard PCT (A), ainsi que les contributions relatives des composantes du budget d'incertitude de la fraction massique obtenue par chaque acide aminé (B)

F inter AA : incertitude liée à la variabilité entre les acides aminés ; Fidélité : incertitude liée à la reproductibilité de j'hydrolyse ; C Phe, C Pro, C Val, C Leu : incertitude liée à la détermination de la concentration d'acide aminé Phe, Pro, Val et Leu dans la solution mère du peptide ; Q lin : incertitude liée à la régression linéaire ; Q étal : incertitude liée à l'étalon, Pesées : incertitude liée à la préparation des solutions

La solution mère de la protéine PCT recombinante a été analysée par l'approche PICAA, la fraction massique finale est de 807 ± 72 µg/g (k=2) avec une incertitude relative élargie de l'ordre de 8,9 %. La solution mère de la protéine recombinante a par la suite été utilisée dans la préparation des solutions d'étalons pour la quantification de la PCT dans le sérum humain avec l'approche d'étalonnage protéique (voir B.II.3.5).

II.3 Méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain

Un des objectifs principaux de cette thèse a consisté à développer une méthode d'analyse pour le dosage de la PCT par ID-LC-MS/MS dans le sérum humain. Avant de déterminer la stratégie de la méthode de quantification, il est nécessaire de définir la grandeur que l'on veut mesurer, appelée le mesurande. Selon le premier objectif du groupe de travail IFCC sur la « standardisation » des méthodes de dosage de la PCT, le mesurande de la méthode est la PCT

totale, c'est-à-dire les trois isoformes de la PCT : PCT(1-116), PCT(2-116) et PCT(3-116). En effet, la forme mesurée par les méthodes de routine n'est pas précisée par les fabricants. La plupart des méthodes utilisent deux anticorps monoclonaux pour la capture et la détection de la PCT, d'autres méthodes utilisent seulement un seul anticorps monoclonal ou dans certains cas, c'est un anticorps polyclonal (voir section A.III.2.1). Par conséquent, il est préférable de quantifier la PCT totale pour la méthode de référence candidate. Dans le but de quantifier les trois isoformes de la PCT et d'éviter de quantifier les produits de clivage de taille plus petite (NProCT, calcitonine-KKR-katacalcine, calcitonine et katacalcine), la stratégie de purification de la PCT repose donc sur les propriétés physicochimiques et n'a pas recours à l'utilisation d'anticorps spécifique à PCT. Cette stratégie permet de s'affranchir des difficultés de production de lots d'anticorps avec une spécificité constante et représente comme une méthode indépendante des méthodes de dosage en routine. Cependant, cette stratégie représente des enjeux importants dans le développement de la méthode. En effet, comme décrit dans la section A.IV.4, une quantification de protéine à une concentration inférieure au nanogramme par millilitre dans le sérum humain est difficilement atteignable sans utilisation d'anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt ou des systèmes analytiques plus performants en termes de sensibilité tels que le système capillaire LC ou nanoLC. Ce travail de thèse s'est focalisé en majeure partie sur l'optimisation rigoureuse du protocole d'analyse allant de la préparation d'échantillons jusqu'à l'analyse LC-MS. Ce chapitre présente donc l'étape de sélection des peptides protéotypiques à la PCT pour répondre à la définition du mesurande ainsi que les différentes étapes d'optimisation des paramètres LC-MS et du protocole de préparation d'échantillon.

II.3.1 Optimisation des conditions chromatographiques

L'optimisation a été réalisée sur les différents points critiques d'une méthode chromatographique : la nature des phases mobiles, les agents d'appariement d'ions, le gradient, le débit et la température de la colonne chromatographique. Après avoir sélectionné les peptides appropriés pour le développement de la méthode, il est donc important d'optimiser les conditions de séparation qui peuvent avoir une influence sur la détection afin d'augmenter la sensibilité de la méthode. La séparation chromatographique des peptides a été réalisée sur une colonne analytique Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (1 x 150 mm, 3 µm) (ThermoFisher Scientific) avec un volume d'injection de 20 µL sur un système de chromatographie en phase liquide Dionex™ Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific).

II.3.1.1 Nature des phases mobiles

Lors du développement d'une méthode d'analyse de protéines par LC-MS, l'optimisation des conditions chromatographique est tout aussi importante que l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse pour gagner en sensibilité. L'acétonitrile est le solvant organique le plus utilisé pour l'analyse de peptides. Cependant, suite à la pénurie mondiale de ce solvant entre 2008 et 2009, des études ont évalué l'utilisation d'autres solvants pour la séparation des peptides (276). Parmi les solvants de substitution, le méthanol a montré un gain en sensibilité dans de nombreux cas. Ainsi l'acétonitrile et le méthanol ont été évalués pour la séparation des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK issus de la digestion de la PCT en sérum à une concentration de 50 ng/mL. Comme observé dans la littérature, le méthanol a montré une augmentation de l'intensité des signaux d'un facteur allant de 1,35 à 1,5 par rapport à l'acétonitrile pour les deux peptides d'intérêt (*Figure 60*). Cette observation peut être expliquée par la volatilité élevée du méthanol, qui favorise la désolvatation des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes formées à la sortie de la sonde capillaire de la source MS (277,278).

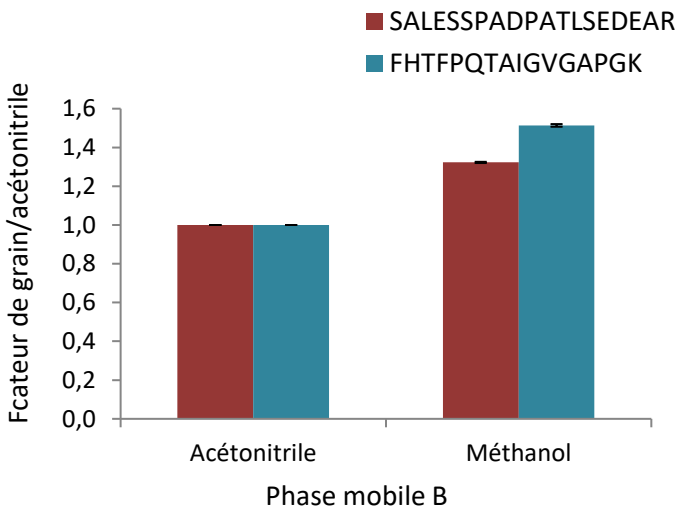


Figure 60. Influence du solvant organique de la phase mobile sur l'intensité de signal MS des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK.

Les résultats sont présentés en termes de gain de signal (aire sous le pic chromatographique) obtenu par rapport à l'utilisation de l'acétonitrile comme solvant organique. Les mesures ont été réalisées sur trois réplicas de préparation d'échantillon (N=3). Le coefficient de variation entre réplicas est inférieur à 1.0 %.

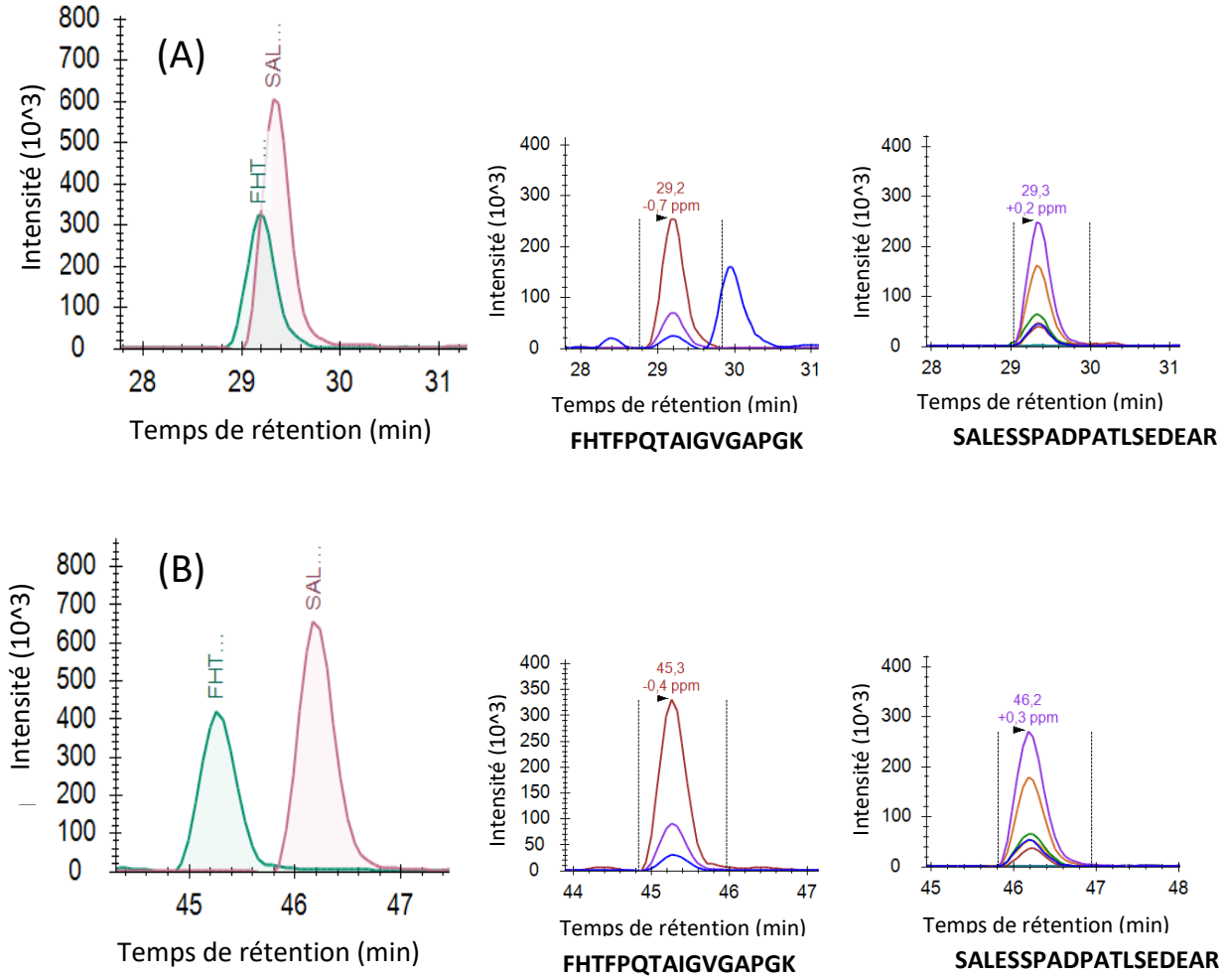


Figure 61. Chromatogramme des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus dans différentes conditions de phase mobile organique

(A) Séparation des deux peptides avec l'acétonitrile comme phase mobile ; (B) Séparation des deux peptides avec le méthanol comme phase mobile.

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 50 ng/mL. Phases mobiles H_20 + 0,1 % FA / ACN + 0,1 % FA pour l'étude d'ACN et H_20 + 0,1 % FA / MeOH + 0,1 % FA pour l'étude de MeOH. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Gradient : gradient de 2 % à 35 % en 46 min. Détection : MS/MS en mode PRM

Par ailleurs, il est important de noter la différence du pouvoir d'élution des deux solvants étudiés, le méthanol étant moins éluant que l'acétonitrile, et la différence de sélectivité entre ces deux solvants. Ainsi, dans le cas présent, l'utilisation du méthanol a permis de mieux séparer les deux peptides d'intérêt et ainsi éviter un phénomène de compétition lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse. L'utilisation du méthanol a également permis de s'affranchir d'une interférence pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. En effet, comme le montre la *Figure 61*, une interférence correspondant à l'une des transitions du

peptide FHTFPQTAIGVGAPGK est quasi co-éluée avec le peptide d'intérêt lorsque l'acétonitrile est utilisé. Ceci peut avoir un fort impact sur la quantification du peptide et donc de la protéine si la présence de cette interférence perturbe l'intégration des pics. Cette interférence n'a pas été observée lorsque le méthanol est utilisé.

Malgré une rétention plus grande et donc un temps d'analyse plus important, le méthanol a été choisi comme solvant organique pour la quantification de la PCT en sérum, car il a montré un gain en sensibilité et en robustesse de séparation important. Cependant, suite au choix du méthanol, d'autres optimisations sur les agents d'appariement d'ion et le gradient de phase organique ont été nécessaires afin de mieux séparer les deux peptides et réduire le temps d'analyse si possible.

II.3.1.2 Influence du gradient

Le gradient chromatographique est également un facteur important à prendre en compte dans le développement d'une méthode de quantification de protéine, en particulier en matrice complexe. En effet, avec un échantillon complexe riche en peptides un gradient plus long permet non seulement de mieux séparer les analytes d'intérêt entre eux et les interférences mais également de minimiser les phénomènes de compétition lors de l'ionisation en source par la réduction de la quantité des peptides élués dans une même fraction de temps à l'entrée de la source MS. Différentes pentes de gradient de la phase mobile organique (1,7 %/min, 7,5 %/min, 9,4 %/min et 15 %/min de 0,05 % d'acide acétique dans le méthanol) ont été investiguées afin d'établir une condition optimale entre le temps d'analyse et l'intensité du signal détecté (*Figure 62*). Cette évaluation a été réalisée par injection d'un extrait du sérum digéré contenant PCT à une concentration de 20 ng/mL.

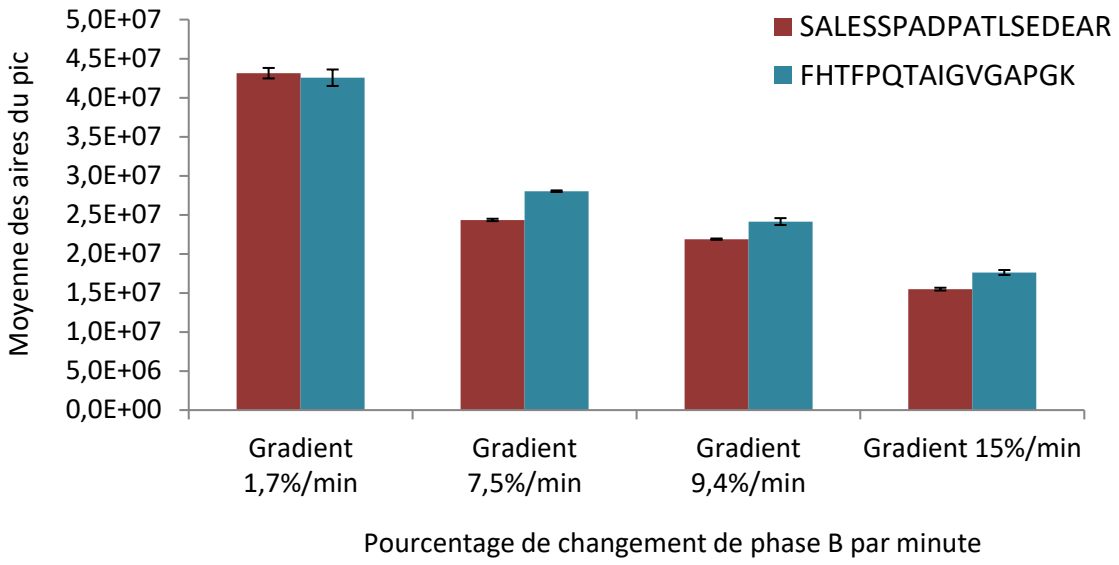


Figure 62. Comparaison des aires sous le pic pour les deux peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré avec différents gradients de phase mobile organique B

Les résultats sont présentés en termes de moyenne des aires de pic chromatographique. L'expérience a été menée sur deux réplicas d'injection. Phases mobiles H_20 + 0,1 % FA / MeOH + 0,1 % FA.

Parmi les quatre gradients étudiés, le gradient avec la plus faible pente de phase organique (1,7 %/min) a permis d'obtenir les meilleures intensités de signal pour les deux peptides d'intérêt. Cette observation est en accord avec la littérature. En effet, un gradient de 5 h a permis d'améliorer la limite de quantification d'un facteur de 8 à 100 par rapport à un gradient de 45 min pour les peptides des protéines *bovine carbonic anhydrase* et *prostate specific antigen* (279). De plus, un gain d'un facteur 5 en aire sous le pic pour la détection d'un peptide de l'anticorps rendomab-B1 en passant d'un gradient de 15 min à un gradient de 120 min a également été rapporté (280). Les résultats observés confirment une amélioration du signal pour les deux peptides d'intérêt. Les chromatogrammes PRM des deux peptides sont présentés dans la *Figure 63*.

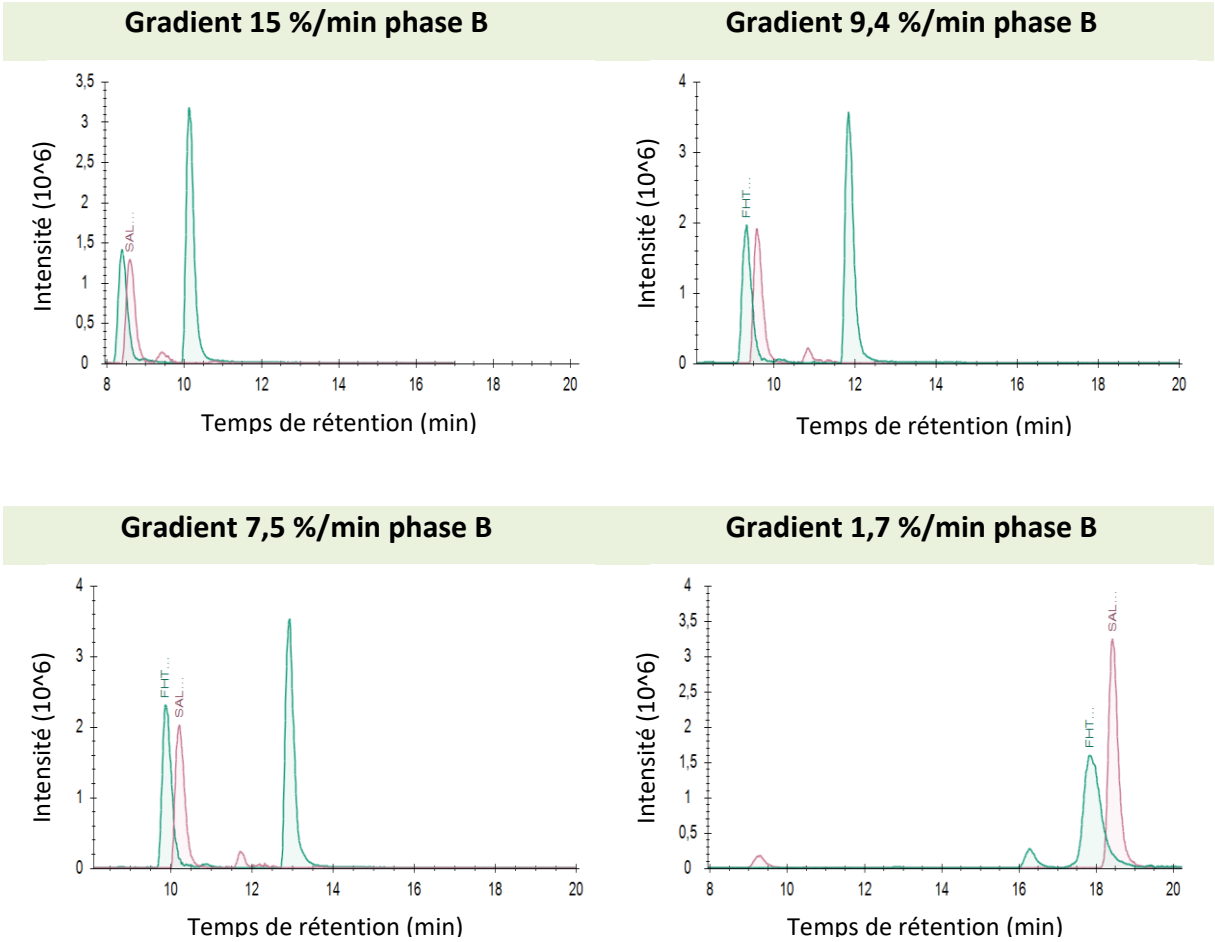


Figure 63. Chromatogrammes des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus en fonction du gradient de la phase mobile B

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 20 ng/mL. Phases mobiles H_2O + 0,1 % FA / MeOH + 0,1 % FA pour l'étude de MeOH. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Température de la colonne :60 °C. Détection : MS/MS en mode PRM

Une diminution de la pente du gradient de phase organique entraine un temps d'analyse LC-MS plus long. Dans l'optique du développement d'une méthode de référence d'ordre supérieur, la méthode développée n'est pas destinée à une application en routine où le délai du résultat doit être court pour un diagnostic rapide. Cependant, la désignation d'une valeur aux matériaux de référence par la méthode de référence nécessite des analyses répétées afin d'assurer une valeur juste avec la plus faible incertitude possible. Une analyse avec un long gradient représente donc un temps de machine important. Par conséquent, une optimisation plus approfondie est donc nécessaire pour d'une part pour améliorer le signal des peptides et d'autre part pour mieux séparer les peptides d'intérêt et les interférences venant des matrices (sérum blanc ou sérum des patients atteints du sepsis). Le gradient final retenu pour la

validation de la méthode de quantification consiste en une augmentation de la phase mobile organique de 2 à 22 % en 10 min, de 22 % à 38 % en 1 min, puis de 38 % à 42 % en 14 min.

II.3.1.3 Influence des agents d'appariement d'ions dans les phases mobiles

L'ajout d'agents d'appariement d'ions dans les phases mobiles joue un rôle important dans l'analyse LC-MS. Ces agents permettent non seulement d'améliorer la séparation chromatographique, mais également d'améliorer l'ionisation dans la source MS et donc la sensibilité de la méthode (281). Les acides faibles tel que l'acide formique (pK_a=3,75) et l'acide acétique (pK_a=4.76) sont couramment utilisés dans les analyses de spectrométrie de masse en mode ESI positif car le faible pH des phases mobiles favorise la protonation des analytes. En particulier, une proportion de 0,1 % (v/v) d'acide formique est généralement ajoutée dans les phases mobiles pour les analyses en protéomique. Les performances chromatographiques de la méthode de quantification de la PCT ont été étudiées avec ces deux acides (acide formique et acide acétique) en différentes proportions (0,01 % à 0,3 % (v/v) en acide formique, et 0,01 % à 0,1 % (v/v) en acide acétique) dans les deux phases mobiles (aqueuse et méthanol). Cette évaluation a été réalisée par injection d'un extrait de sérum digéré contenant la protéine PCT à une concentration de 25 ng/mL. Les résultats ont montré une augmentation importante de l'intensité de signal avec l'acide acétique. En effet, l'acide acétique est un acide plus faible que l'acide formique en tant qu'agent d'appariement et permet d'augmenter la sensibilité (282). En particulier, parmi les conditions investiguées, l'ajout de 0,05 % d'acide acétique a permis d'améliorer le signal d'un facteur 2,25 pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et d'un facteur 1,55 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK par rapport à l'utilisation de 0,1 % (v/v) d'acide formique (*Figure 64*). Cette amélioration a été confirmée par une deuxième analyse. Un pourcentage d'acide acétique de 0,01 % a montré une meilleure intensité de signal pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Mais dans cette condition, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR n'a pas été détecté. Ceci est expliqué par la faible ionisation de ce peptide dont le point isoélectrique (pI) est de 3,3 (contre 10 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK) : le pH est de 3,8 (dans eau) contre 3,6 (dans eau) pour 0,05 % d'acide acétique).

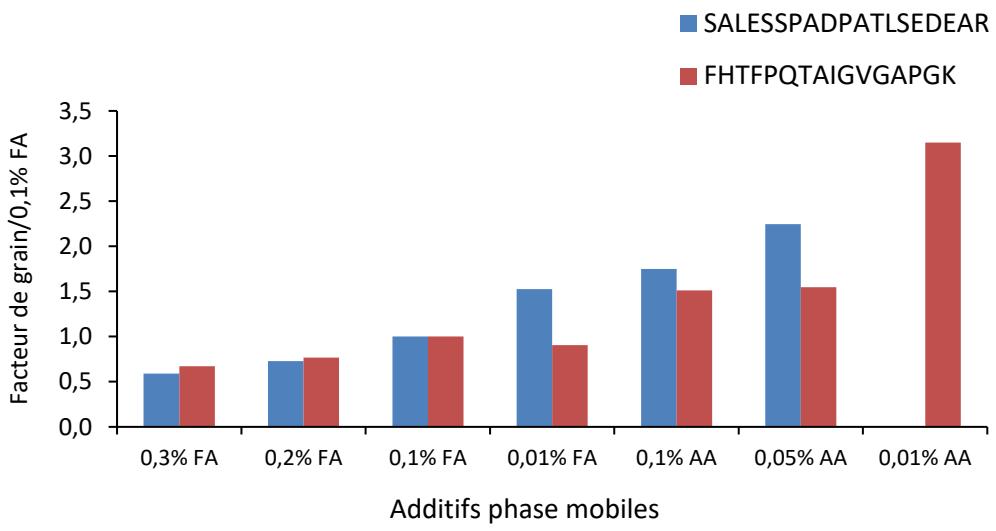
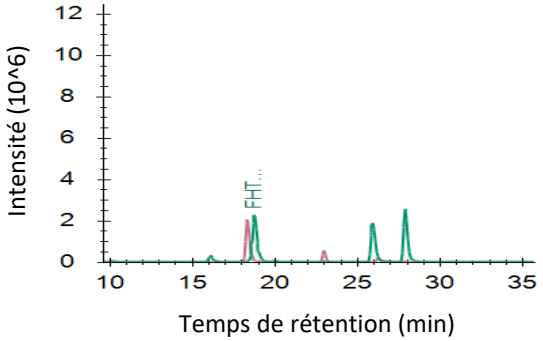


Figure 64. Influence de la présence d'acide formique et d'acide acétique dans les deux phases mobiles (eau et méthanol)

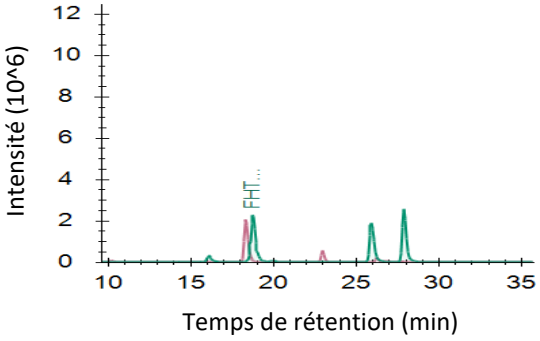
Les résultats sont présentés en termes de gain de signal (aire de pic chromatographique) obtenu par rapport à l'utilisation de l'acide formique à 0,1 % (v/v). L'expérience a été menée sur un simple réplica d'injection.

De plus, le pH et l'appariement d'ions des phases mobiles influencent également la capacité de séparation des peptides. Les chromatogrammes extraits pour les deux peptides dans les différentes conditions étudiées sont présentés dans la *Figure 65*. Les chromatogrammes ont montré une meilleure séparation des deux peptides quand le pourcentage d'acide diminue, en particulier dans le cas de l'utilisation de l'acide acétique. Cette observation est en accord avec la littérature. En effet, Gangnus *et al.* ont rapporté qu'un faible pourcentage d'acide formique est plus favorable lorsque le méthanol est utilisé comme phase mobile (278). Le temps de rétention du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est plus élevé variant de 19 min à 28 min quand le pourcentage d'acide formique et acide acétique diminue alors que le temps de rétention du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK a très peu varié. Ceci est également expliqué par un pH des phases mobiles proche du pI du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Si le pH des phases mobiles est supérieur au pI du peptide, le nombre de formes protonées du peptide SALESSPADPATLSEDEAR diminue, et les interactions entre ce peptide et la phase C18 de la colonne chromatographique augmentent. De plus, l'acide acétique présente un groupement méthyl de plus par rapport à l'acide formique, l'appariement entre les peptides ionisés et l'ion acétate permet d'augmenter l'hydrophobicité des peptides qui sont mieux retenus sur la phase stationnaire de la colonne.

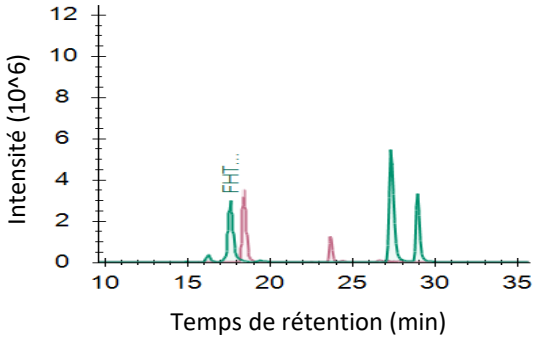
0,3 % acide formique



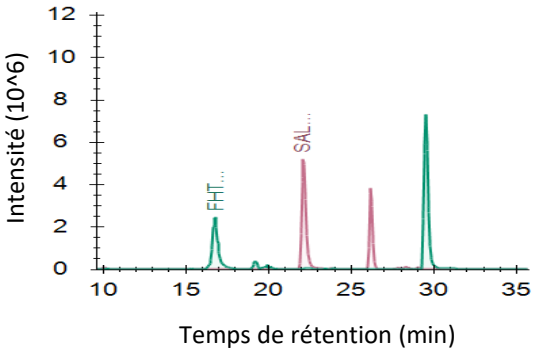
0,2 % acide formique



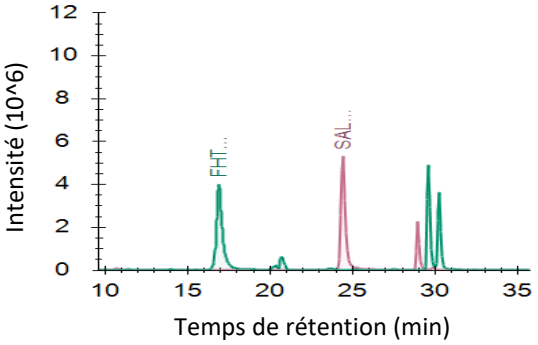
0,1 % acide formique



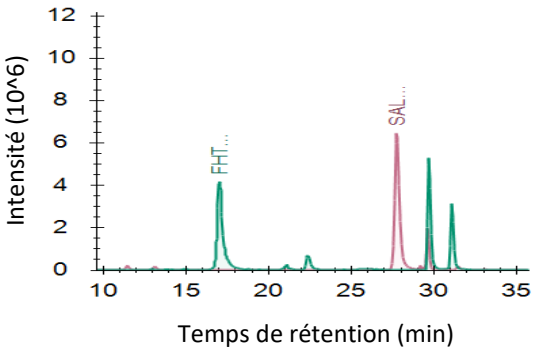
0,01 % acide formique



0,1 % acide acétique



0,05 % acide acétique



0,01 % acide acétique

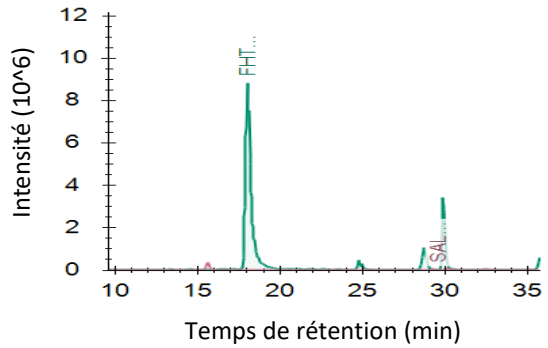


Figure 65. Chromatogrammes des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré obtenus avec différents agents d'appariement d'ion dans les deux phases mobiles (eau et méthanol)

Injection de 20 µL de l'extrait de sérum digéré à une concentration de la PCT de 25 ng/mL. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Gradient : gradient de 5 % à 45 % en 23 min. Détection : MS/MS en mode PRM.

L'ajout de 0,05 % (v/v) d'acide acétique dans les deux phases mobiles, permettant une meilleure séparation de deux peptides et une amélioration importante de la sensibilité, a été retenu pour le développement de la méthode.

II.3.1.4 Optimisation du débit

Le débit des phases mobiles peut influencer la résolution chromatographique via le nombre de plateaux théoriques (efficacité). En effet, selon l'équation de Van Deemter, un débit de phases mobiles trop élevé diminue le transfert de masse entre les deux phases, stationnaire et mobile, et provoque un élargissement des pics chromatographiques. Cependant, un débit élevé réduit la diffusion longitudinale des analytes dans la colonne diminuant ainsi la largeur des pics. Au contraire, un débit faible augmente le transfert de masse mais augmente également la diffusion longitudinale des analytes car le temps de séjour dans la colonne est plus long. Il existe donc un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximale. De plus, il faut prendre en compte qu'un débit trop important risque d'avoir des effets de dilution des analytes à l'entrée de la source MS, donc une diminution de la sensibilité de la méthode (283). Ainsi, le débit de phases mobiles a donc été optimisé en injectant un extrait de sérum digéré contenant la protéine PCT à une concentration de 10 ng/mL à un débit de 60, 80 et 120 µL/min sur la colonne Acclaim Pepmap 100 C18 (1 mm x 150 mm, 3 µm). Le signal du peptide SALESSPADPATLSEDEAR est le plus intense avec un débit de 80µL/min tandis

que le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK répond mieux avec un débit de 60µL/min (*Figure 66*). Les signaux des deux peptides sont plus faibles à un débit de 120 µL/min.

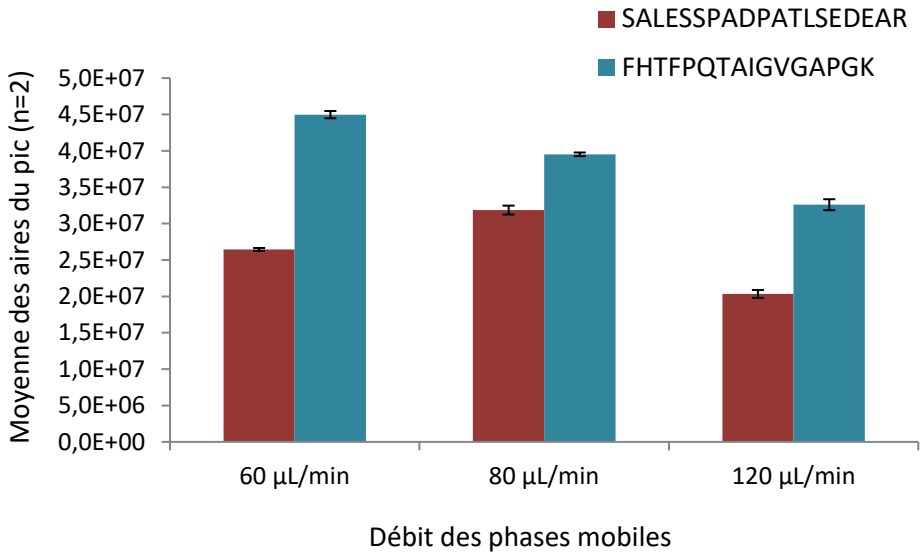


Figure 66. Comparaison des aires du pic des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré dans les différents débits des phases mobiles

Les résultats sont présentés en termes de moyenne des aires de pic chromatographique. L'expérience a été mené sur deux réplicas d'injection. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA.

Par ailleurs, en accord avec la théorie, les peptides sont moins retenus en augmentant le débit des phases mobiles comme cela entraine une augmentation de la résistance au transfert de masse. Nous avons également observé un effet bénéfique, l'augmentation du débit a permis de mieux séparer le peptide SALESSPADPATLSEDEAR des interférences comme le montre la *Figure 67*.

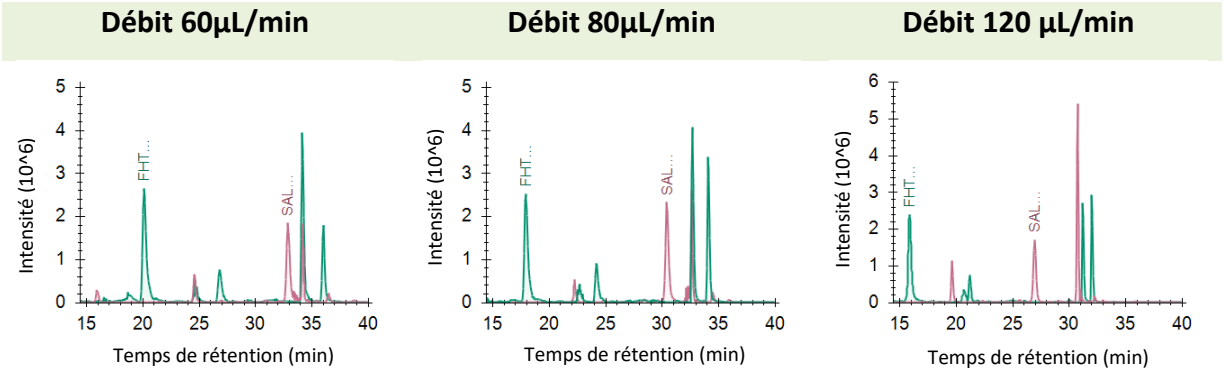


Figure 67. Influence du débit sur la séparation chromatographique

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 10 ng/mL. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Température : 60 °C. Gradient : gradient de 5 % à 45 % en 26 min. Détection : MS/MS en mode PRM

Le débit de 80 µL/min, permettant d'améliorer le signal du peptide SALESSPADPATLSEDEAR de 20 % a donc été choisi pour cette étude.

II.3.1.5 Optimisation de la température de la colonne chromatographique

La température de la colonne chromatographique influence la résolution des pics. Une température importante permet de diminuer la pression en raison de la diminution de la viscosité des phases mobiles et de réduire les interactions secondaires (adsorption, liaison ionique et liaison hydrogène). Cependant, une température trop élevée risque d'endommager les peptides et de dégrader la phase stationnaire de la colonne. En tenant en compte de la température maximale de 60°C préconisée par le fabricant de la colonne chromatographique, différentes températures du four à colonnes ont été étudiées (25°C, 40°C et 60°C) en injectant un extrait de sérum digéré contenant la protéine PCT à une concentration de 10 ng/mL. Les extraits de chromatogramme des deux peptides en fonction de la température de la colonne chromatographique sont présentés dans la *Figure 68*. Les temps de rétention des deux peptides sont en accord avec la théorie : plus la température de la colonne chromatographique augmente, moins les analytes sont retenus par les interactions secondaires. L'augmentation de la température a permis également de réduire la largeur du pic. De plus, une température de 60°C a permis de séparer le peptide SALESSPADPATLSEDEAR des interférences.

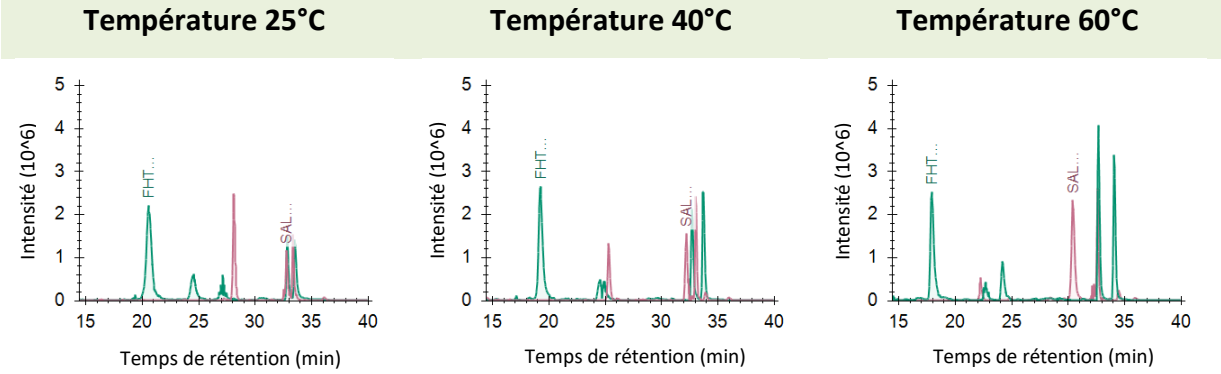


Figure 68. Influence de la température de la colonne sur la séparation chromatographique

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 10 ng/mL. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Gradient : gradient de 5 % à 45 % en 26 min. Détection : MS/MS en mode PRM

Quant au signal détecté de chaque peptide, contrairement au peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, dont le signal est maximal quand la colonne chromatographique est thermostatée à 25°C, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR répond mieux à une température de 60°C (*Figure 69*).

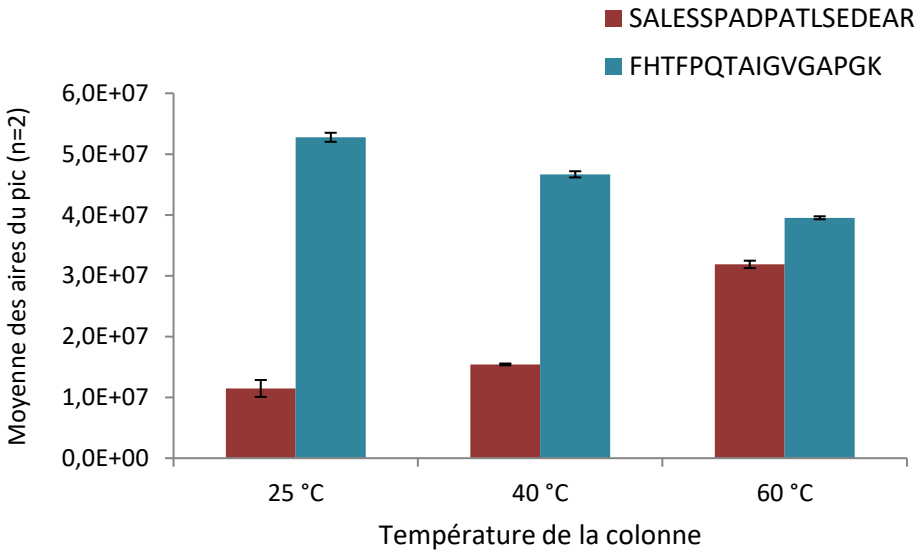


Figure 69. Comparaison des aires du pic des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK d'un extrait de sérum digéré dans les différentes températures de la colonne chromatographique

Les résultats sont présentés en termes de moyenne des aires de pic chromatographique. L'expérience a été menée sur deux réplicas d'injection. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA.

Malgré une diminution de 25 % du signal du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK par rapport à une température de 25°C, une température de 60°C a été choisie pour la quantification de la PCT en sérum car elle a montré un gain important d'un facteur 2,8 en sensibilité du peptide SALESSPADPATLSEDEAR.

Malgré les optimisations de l'ensemble des paramètres de chromatographie liquide, il s'est avéré que les paramètres sélectionnés ne permettent pas d'avoir une réponse optimale pour les deux peptides simultanément en raison de leur différence de propriétés physicochimiques. Cependant, ces différentes étapes d'optimisation a permis une amélioration d'au moins d'un facteur 10 pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et d'un facteur 2 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. L'ensemble des paramètres retenus pour la séparation par chromatographie en phase liquide est résumé dans le *Tableau 17*.

Tableau 17. Récapitulatif des conditions chromatographiques de la méthode LC- MS optimisées pour la quantification de la PCT dans le sérum humain

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	Acclaim™ PepMap™ 100 C18 analytical column (1 x 150 mm, 3 µm)
Phases mobiles	Phase A : Eau MilliQ, 0,05 % acide acétique Phase B : MeOH 0,05 % acide acétique
Température de colonne	60 °C
Volume d'injection	20 µL
Débit	80 µL/min
Gradient	0 min : 2 % B 2 – 10 min : 20 % B 10-11 min : 16 % B 11 – 25 min : 4 % B

II.3.2 Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse

Après avoir optimisé les conditions chromatographiques, les paramètres de spectrométrie de masse ont également été optimisés afin de favoriser la désolvatation des ions en phase gazeuse à la sortie de la sonde capillaire de la source MS, la transmission des ions en phase gazeuse vers le capillaire de transfert (entrée du spectromètre de masse) et la fragmentation. L'évaluation a été effectuée en étudiant les différents paramètres de la source MS et l'énergie de la collision des peptides.

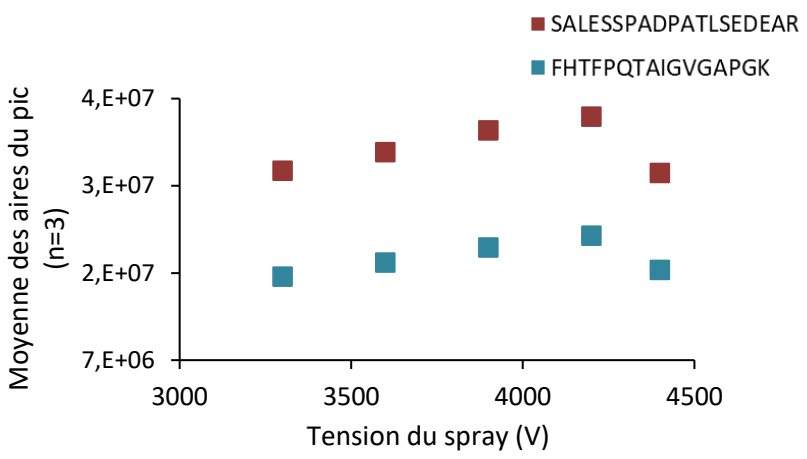
II.3.2.1 Paramètres de source

L'interface de couplage entre la chaine de chromatographie en phase liquide et le spectromètre de masse ESI-MS est une sonde à l'ionisation par électrospray à chaud (HESI pour Heated-ElectroSpray Ionisation). Cette interface permet de transformer les ions présents dans la solution en ions en phase gazeuse grâce à l'utilisation combinée d'un gaz auxiliaire chauffé et d'un gaz de nébulisation. En principe, la solution d'échantillon passe à travers l'aiguille métallique ESI sous une tension élevée, l'aiguille HESI vaporise l'échantillon en fines gouttelettes chargées électriquement grâce au gaz de nébulisation qui entoure directement l'aiguille. Avec la source HESI, le gaz auxiliaire chauffé va aider à l'évaporation du solvant pour former des minuscules gouttelettes. Sous la densité de la charge électrique à la surface des gouttelettes et la répulsion électrostatique, les minuscules gouttelettes vont éjecter des ions en phase gazeuse, qui pénètrent ensuite dans le capillaire de transfert grâce à la différence de potentiel entre l'aiguille métallique et le capillaire de transfert pour arriver au niveau de S-lens (série de lentilles). Par conséquent, le débit et la température des gaz (auxiliaire et nébulisation) et la tension de spray vont impacter la formation des ions en phase gazeuse à partir de la solution d'échantillon.

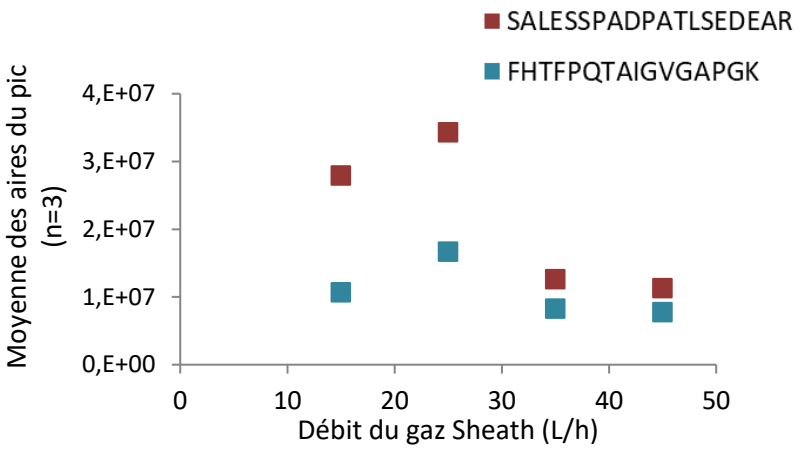
Les lentilles S-lens, situées à la sortie du capillaire de transfert sont désaxées dans le but de piéger les molécules neutres et les molécules de solvant qui encrassent le système et risquent de diminuer la sensibilité. Les S-lens sont composées d'un bloc de lentilles espacées permettant de mieux focaliser les ions chargés jusqu'à la sortie. L'ouverture des S-lens va donc impacter le transfert des ions. En effet, une valeur de S-lens importante peut entrainer une fragmentation des ions précurseurs fragiles à l'intérieur de S-lens et diminuer la transmission des ions de faible rapport m/z. Inversement, une valeur S-lens faible diminuera la transmission des ions de rapport m/z élevé.

Afin de gagner en sensibilité, l'ensemble des paramètres de la source du spectromètre de masse (la tension du spray, la température de capillaire de transfert, l'ouverture de S-lens, la température et le débit du gaz auxiliaire, le débit du gaz de nébulisation et le débit du gaz de balayage) a été optimisé. L'ensemble des paramètres dépend du débit des phases mobiles. Pour un débit optimal de 80 µl/min, les paramètres par défaut sont détaillés dans le *Tableau* 18. Ce travail d'optimisation a été effectué avec une solution contenant les deux peptides sélectionnés, à une concentration de 15 ng/mL en 10 % (v/v) ACN dans l'eau en mode LC-MS/MS mode PRM (*Figure 70*).

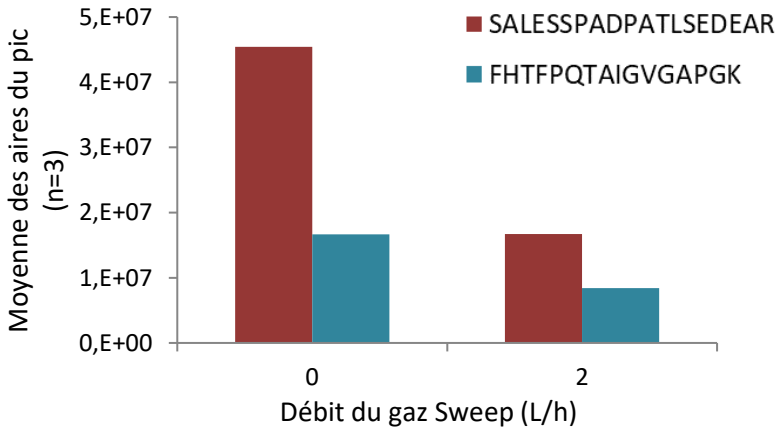
Tension du spray



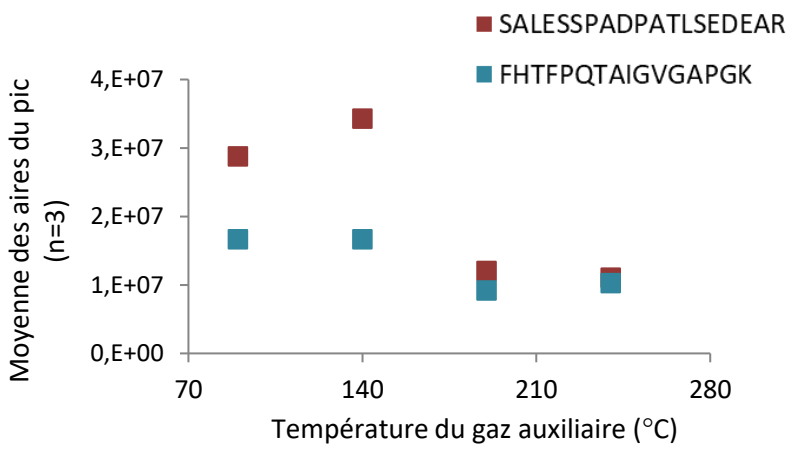
Débit du gaz de nébulisation



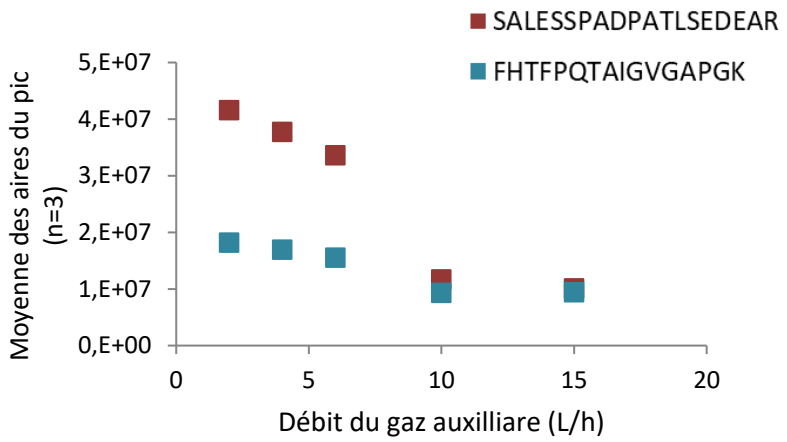
Débit du gaz de balayage



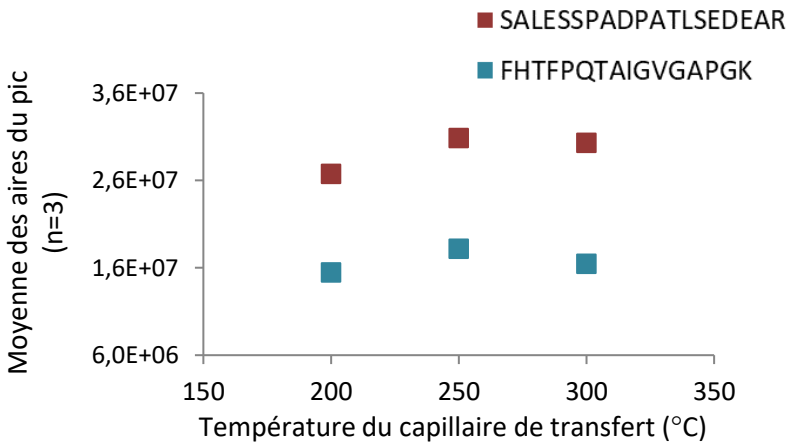
Température du gaz auxiliaire



Débit du gaz auxiliaire



Température du capillaire de transfert



Ouverture S-lens

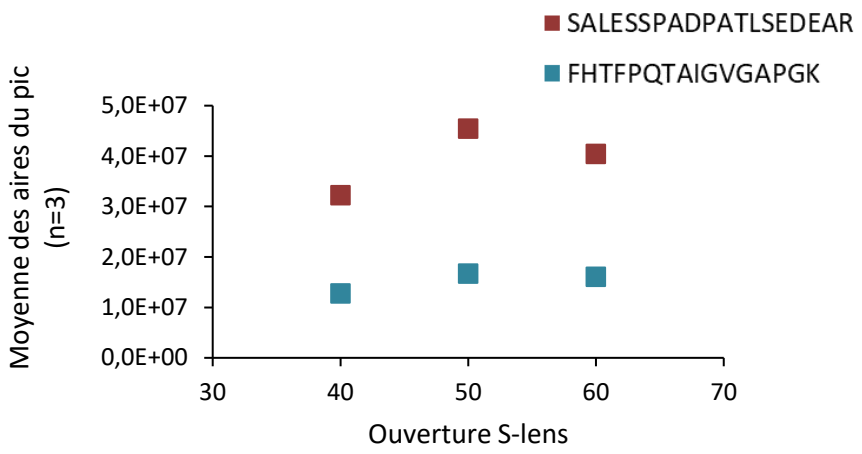


Figure 70. Optimisation des différents paramètres de la source MS

Les résultats sont présentés en termes de moyenne des aires de pic chromatographique. L'expérience a été réalisée en mode PRM et chaque paramètre est évalué en trois injections, le coefficient de variation est inférieur à 4,4 %.

L'optimisation de ces paramètres de la source a permis une augmentation du signal comprise entre 1,07 et 3,55, selon les paramètres étudiés par rapport aux valeurs par défaut déterminées par la génération automatique des conditions optimales à un débit donné. Les valeurs optimales pour chaque paramètre du spectromètre de masse sont résumées dans le *Tableau 18*.

Tableau 18. Paramètre de source MS final pour la quantification de la PCT en sérum pour un débit de phases mobiles de 80 µl/min

Paramètre	Valeur par défaut	Valeur	Facteur de gain
Tension du spray (V)	3500	4200	1,07-1,13
Débit du gaz de nébulisation*	35	25	2,02-2,72
Débit du gaz de balayage*	1	0	-
Température du gaz auxiliaire (°C)	180	140	1,82-2,85
Débit du gaz auxiliaire*	10	2	1,56-3,55
Température du capillaire de transfert (°C)	250	250	-
Ouverture S-lens*	50	50	-

(*) unité arbitraire

II.3.2.2 Paramètres de la méthode PRM

La détection des peptides protéotypiques a été réalisée en mode PRM. Il a donc été nécessaire d'optimiser la fragmentation de l'ion précurseur sélectionné au niveau du quadripôle par l'optimisation de l'énergie de collision afin d'améliorer la quantité des ions

fragments produits. L'énergie de collision est un paramètre pouvant être optimisé pour chaque peptide individuellement. L'énergie de collision dépend souvent de la charge et de la longueur du peptide. L'énergie de collision optimale est déterminée non seulement par une meilleure intensité de signal des ions produits mais également par les critères de sélection des ions produits. En effet, la confirmation de la présence du peptide et la sensibilité de la méthode sont déterminées par le signal de chaque ion produit retenu. Il faut donc assurer que dans la sélection de l'énergie de collision, le signal des ions produits retenus parmi les ions produits détectés est le plus important possibles. Les profils des tous les ions de type y et b produits en fonction des énergies de collision de deux peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK sont présentés dans la *Figure 71*.

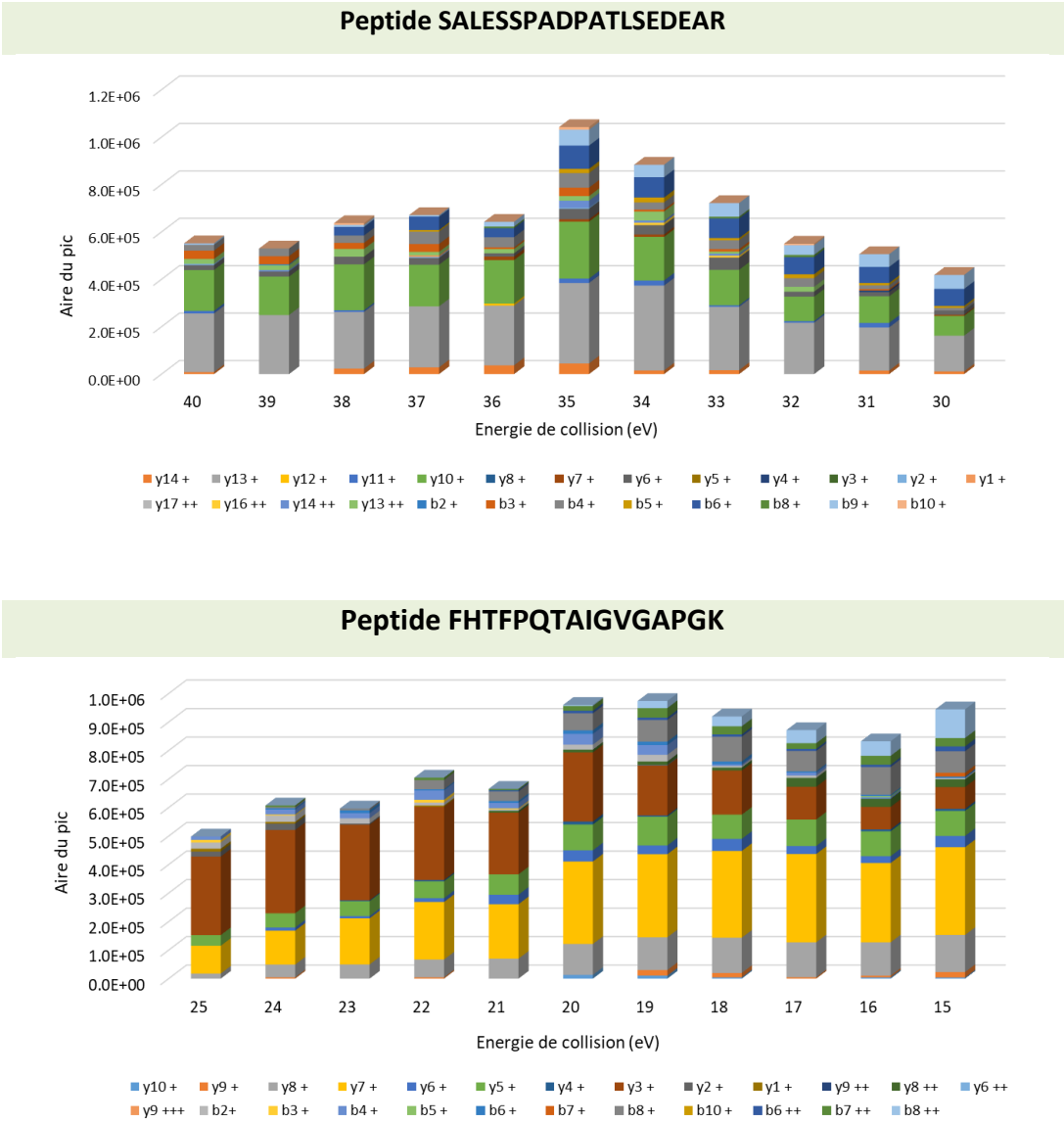


Figure 71. Profils des différents ions produits détectés en mode PRM en fonction de l'énergie de collision.

Les différentes couleurs représentent les différents ions produits y et b lors de la fragmentation en mode HCD de l'ion précurseur 973,4529 (m/z = 2) du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et de l'ion précurseur 543,2912 (m/z = 3) du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK *Les deux ions produits les plus intenses pour le peptide S*ALESSPADPATLSEDEAR *sont y13+ et y10+ et ceux pour le peptide* FHTFPQTAIGVGAPGK sont y7+ et y3+.

Pour la sélection des ions produits parmi les ions détectés en PRM, les ions avec des rapports m/z supérieurs à celui de l'ion précurseur sont privilégiés pour augmenter la spécificité de la méthode. De plus, les ions de type y sont également privilégiés par rapport à l'ion b, car les ions y permettent d'avoir un incrément de masse dans le cas d'utilisation des peptides tryptiques marqués avec les isotopes stables au dernier acide aminé K et R. Pour chacun des

deux peptides d'intérêt, la détection de deux ions fils produits prédomine. Les ions fils produits retenus pour la quantification des deux peptides sont les ions y13+ et y10+ pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et les ions y7+ et y3+ pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Les profils des aires du pic détecté des deux ions les plus intenses par peptide en fonction de l'énergie de collision sont présentés dans la *Figure 72*.

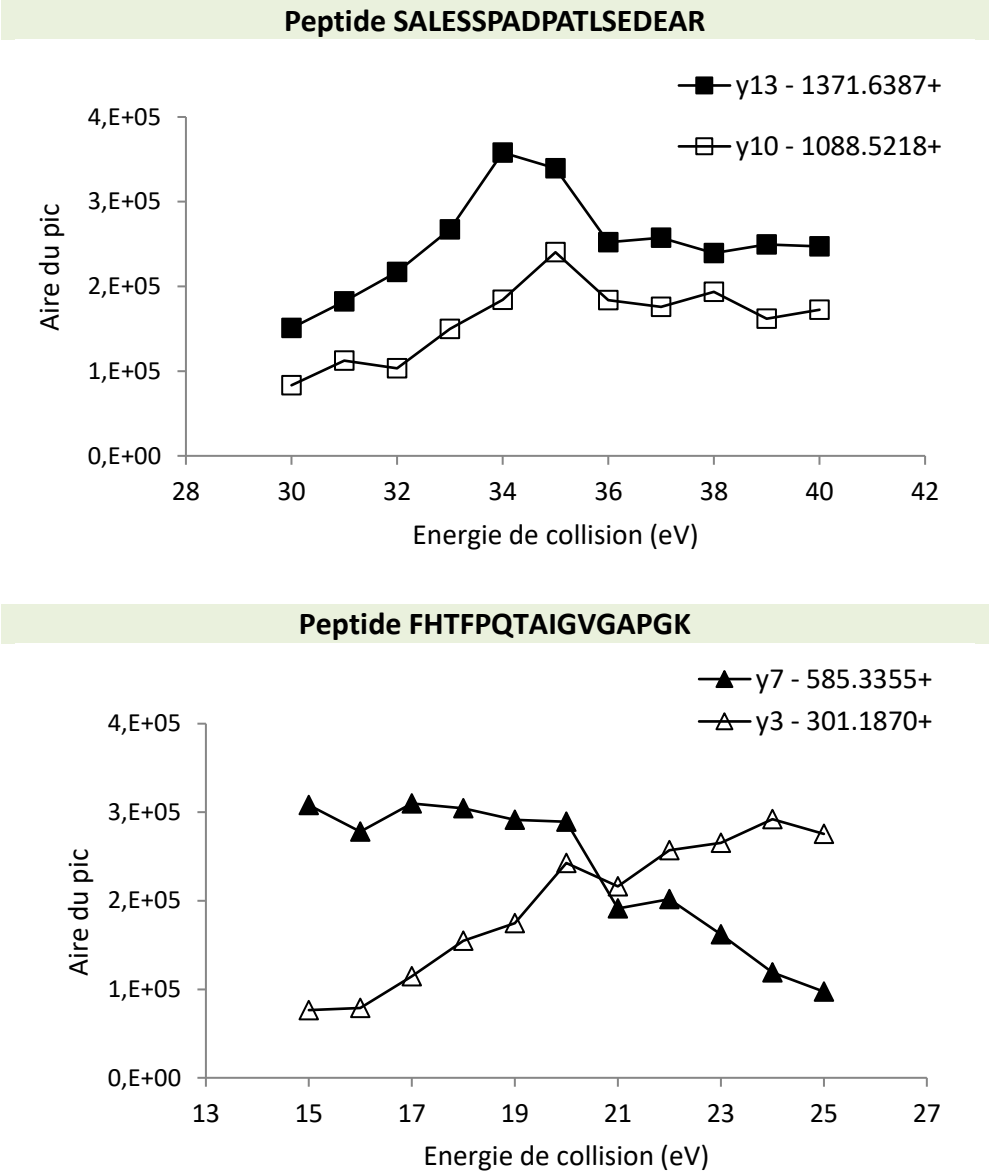


Figure 72. Optimisation des énergies de collisions des deux peptides

Les résultats sont présentés en termes de moyenne des aires de pic chromatographique. L'expérience a été réalisée en analyse LC-MS/MS en mode PRM. Seuls les deux fragments les plus intenses par peptide sont présentés.

Pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR (z=2), une énergie de collision de 35 eV a été sélectionnée car elle permet d'avoir simultanément le signal optimal pour les deux ions produits y13+ et y10+. Quant au peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, une énergie de collision de 20 eV a été sélectionnée, représentant le meilleur compromis entre les deux ions produits. Parmi les deux ions produits du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, l'ion y3+ a un ratio m/z, plus faible que l'ion précurseur peut impacter la spécificité de la méthode. Cependant cette perte de spécificité est compensée par l'utilisation de l'analogue du peptide marqué avec les isotopes stables. Les paramètres MS pour la détection en PRM des peptides PCT et peptides analogues marqués sont détaillés dans le *Tableau 19*.

Tableau 19. Paramètres MS pour la détection en PRM des peptides d'intérêt de la PCT et de leurs analogues marqués

Séquence du peptide	Ion précurseur		Energie de collision (eV)	Ion produit	
	ion	m/z		ion	m/z
SALESSPADPATLSEDEAR	$[M+2]^{2+}$	973.4529	35	y13+	1371.6387
				y10+	1088.5218
SALESSPADPATLSEDEA**R**[$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]	$[M+2]^{2+}$	978.4570	35	y13+	1381.6469
				y10+	1098.5301
SALESSPADPATLSEDE**A**[$^{13}C_3$,^{15}N]R	$[M+2]^{2+}$	975.4565	35	y13+	1375.6387
				y10+	1092.5218
FHTFPQTAIGVGAPGK	$[M+3]^{3+}$	543.2912	20	y7+	585.3355
				y3+	301.187
FHTFPQTAIGVGAPG**K**[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]	$[M+3]^{3+}$	545.9626	20	y7+	593.3497
				y3+	309.2012
FHTFPQTAIGVGA**P**[$^{13}C_5$,^{15}N]GK	$[M+3]^{3+}$	545.2958	20	y7+	591.3493
				y3+	307.2008

II.3.3 Optimisation de la méthode de préparation d'échantillon

L'étude de l'ensemble des paramètres LC-MS/MS a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode. Cependant, l'analyse par LC-MS/MS ne représente pas la totalité du processus analytique mis en œuvre pour la quantification de la PCT en sérum. L'optimisation de la méthode de préparation d'échantillon représente également une étape cruciale pour atteindre la limite de quantification désirée.

II.3.3.1 Dénaturation des protéines

Comme décrit dans la section A.IV.4.1, l'étape de dénaturation des protéines joue un rôle important dans l'analyse des protéines, pour réduire non seulement les interactions au sein des protéines lors de la digestion enzymatique, mais également les interactions entre les

protéines. Le choix de l'agent dénaturant s'est porté sur le SDC en raison de son efficacité rapportée dans de nombreuses études. Le SDC est un détergent ionique, composé d'un groupement hydrophobe et un groupement chargé négativement. Le SDC est souvent utilisé pour l'extraction des protéines membranaires en perturbant la membrane cellulaire (284). Différentes concentrations de SDC ont été étudiées au cours de ce projet. Dans un premier temps, des proportions de SDC allant de 0,5 % à 3 % (m/m) avec un pas de 0,5 % entre conditions ont été évaluées. Une concentration de 0,5 % (m/m) a montré une meilleure intensité de signal pour les deux peptides d'intérêt. Lors d'une seconde évaluation des proportions de SDC de 0,25 % à 1,25 % (m/m) ont été testées sur des duplicatas de préparation d'échantillon par condition (*Figure 73*). L'utilisation du SDC a permis d'améliorer d'un facteur d'au moins 1,7 l'intensité des signaux des deux peptides d'intérêt. Plus particulièrement, une concentration finale de 0,5 % (m/m) de SDC a permis d'obtenir un gain d'un facteur 2,5 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK et 2,85 pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR. Cette amélioration des signaux détectés est en accord avec la littérature. Dans une optique d'identification de protéines, l'utilisation du SDC pour la dénaturation des protéines a permis d'augmenter le nombre des peptides identifiés (254,255,284). De plus, la présence de SDC à faible concentration favorise également la digestion tryptique (285). Bien que la variabilité observée entre les réplicas de préparation d'échantillon ne permette pas de discriminer entre les conditions de SDC de 0,25 %, 0,5 % et 0,75 % (m/m), la condition de SDC de 0,5 % (m/m) donnant le gain de signal le plus important a été retenue pour la suite du projet.

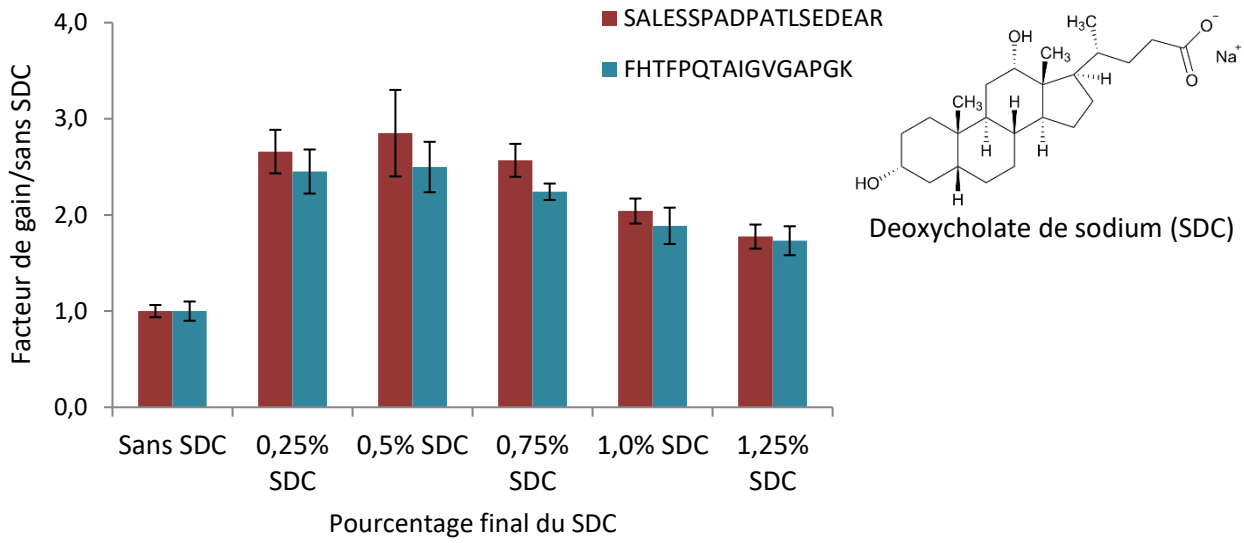


Figure 73. Influence de l'ajout de SDC sur les signaux des peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK

Les résultats sont présentés en termes de gain de signal (aire sous le pic chromatographique) obtenu par rapport à la condition de préparation d'échantillon sans utilisation de SDC. L'expérience a été menée sur deux réplicas de préparation d'échantillon (N=2).

II.3.3.2 Précipitation des protéines

Dans le but de réduire la complexité de la matrice et donc réduire le phénomène de suppression de signal, une étape de précipitation des protéines en présence de solvant organique a été implémentée dans le protocole de préparation d'échantillons. En effet, une précipitation protéique maitrisée permettrait d'éliminer efficacement une partie des protéines de la matrice. La précipitation des protéines en conditions acide, entre autres conditions, a permis à Zhang *et al.* d'atteindre une limite de quantification de 0,27 ng/mL pour la protéine IP-10 (8,6 kDa) dans le sérum (248). Il a donc été décidé de tester cette condition de précipitation. Différentes conditions de précipitation protéique ont été donc étudiés dans ce travail sur des duplicatas de préparation d'échantillon par condition : 50 % (v/v) ACN sans SDC, 50 % (v/v) ACN avec 2 % FA, 50 % (v/v) ACN avec SDC et 70 % (v/v) ACN avec SDC (*Figure 74*). Une précipitation avec une solution eau/acétonitrile (30 :70, (v/v)) a entrainé une perte totale de la PCT. En effet, avec une proportion importante d'acétonitrile, la PCT a été précipitée avec les autres protéines. Les résultats ont également confirmé le bénéfice de l'étape de dénaturation des protéines avec l'ajout de SDC dans le sérum avant l'étape supplémentaire de précipitation des protéines. Cette observation peut être expliquée par le fait que le SDC aide à réduire les interactions entre la PCT et des protéines sériques de poids moléculaires élevés qui sont précipité par 50 % (v/v)

ACN. En outre, la précipitation protéique à 50 % (v/v) ACN en présence de 2 % FA a entrainé une perte importante des signaux détectés. Nous n'avons donc pas observé l'effet bénéfique d'une précipitation en milieu acide rapporté dans la littérature pour la protéine PCT. Finalement, l'ensemble des résultats ne montrent pas de gain en intensité de signal par rapport au protocole sans précipitation des protéines. En effet, une intensité de signal équivalente a été obtenue pour les deux peptides entre les protocoles avec et sans précipitation des protéines avec une solution eau/acétonitrile (50 :50, (v/v)).

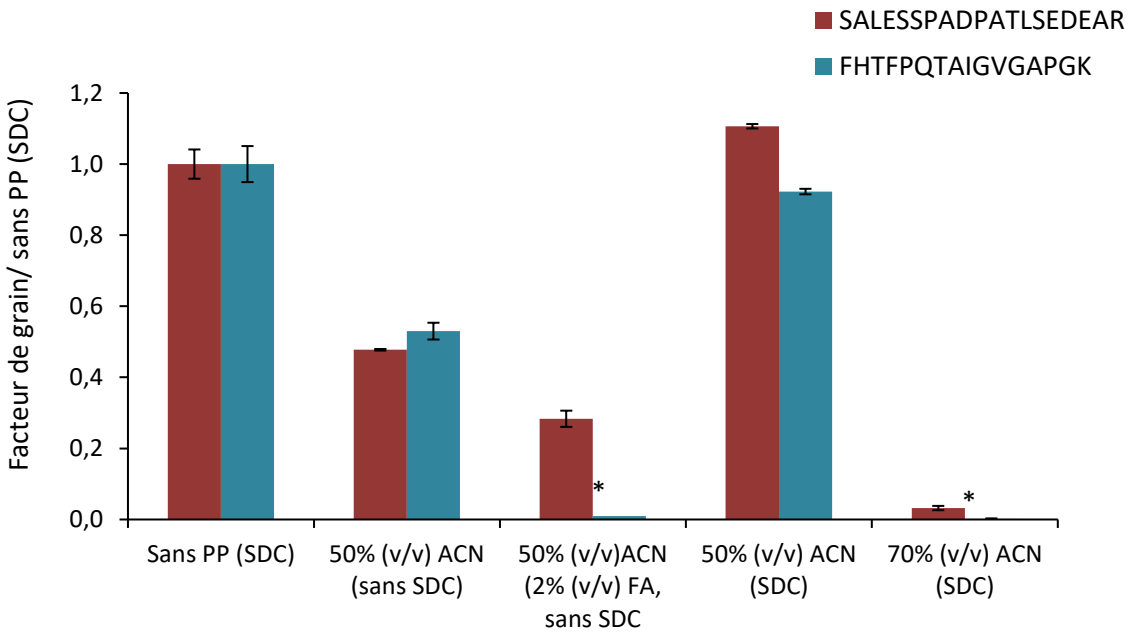


Figure 74. Influence de la précipitation protéique (PP)

Les résultats sont présentés en termes de gain de signal (aire de pic chromatographique) obtenu par rapport à sans précipitation protéique en présence de SDC. L'expérience a été menée sur deux réplicas de préparation d'échantillon (N=2). (*) pas de signal observé pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK.

Cependant, un réel bénéfice a été observé au niveau chromatographique (*Figure 75*). En effet, les interférences provenant d'autres protéines sériques ont été fortement réduites avec l'étape de précipitation, en particulier pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Une précipitation protéique avec 50 % (v/v) acétonitrile a donc été choisie. En effet, bien que les signaux détectés ne soient pas améliorés, la complexité de l'échantillon injecté dans le système LC-MS a fortement été réduite.

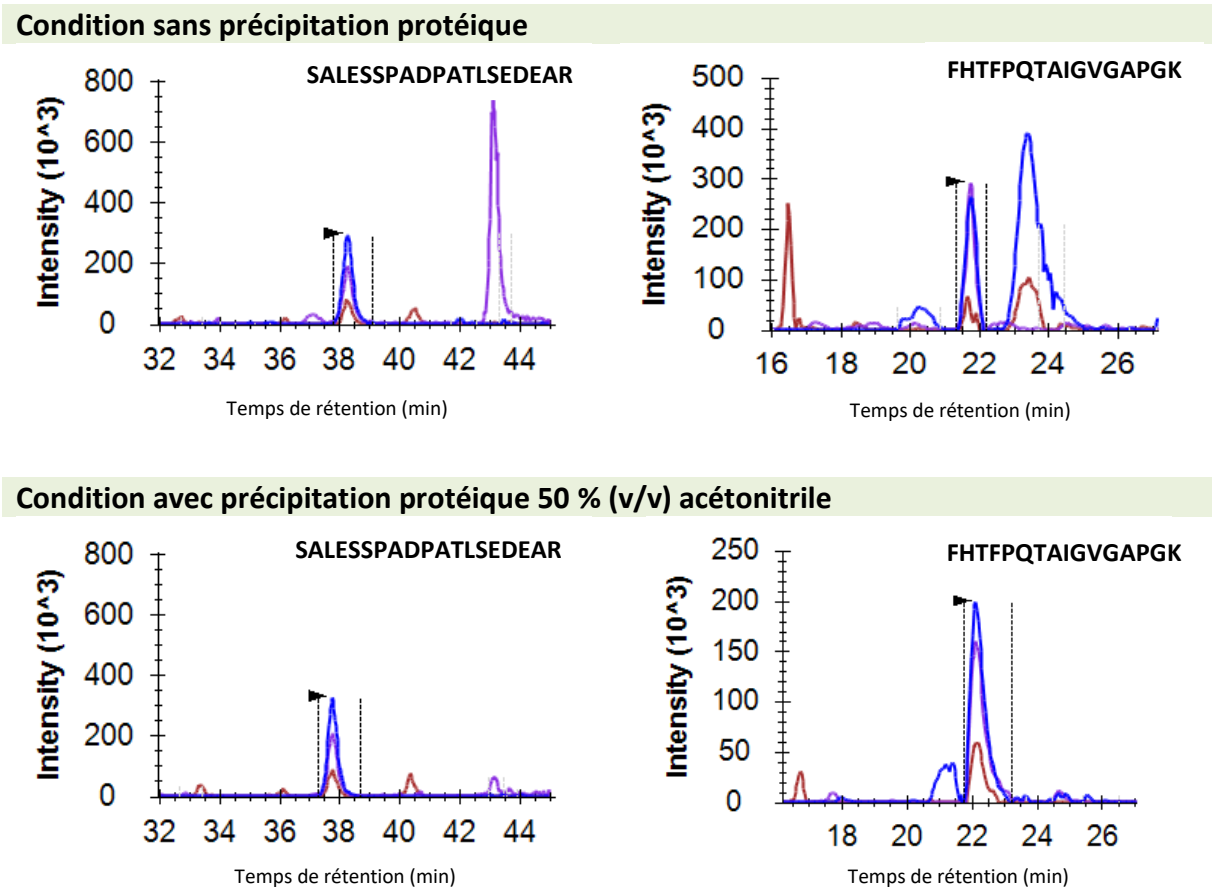


Figure 75. Influence de la précipitation protéique par l'acétonitrile

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 6,5 ng/mL. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Température de la colonne :60 °C. Gradient : gradient de 5 % à 45 % en 37 min. Détection : MS/MS en mode PRM

Le volume d'acétonitrile utilisé lors de la précipitation a également été optimisé. En effet, dans le processus analytique, une étape d'extraction SPE est envisagée après la précipitation protéique de 50 % (v/v) ACN. Pour cela, il est donc nécessaire de réduire le pourcentage organique avant le dépôt sur la cartouche SPE soit en diluant le surnageant d'un facteur 6 avec l'eau MilliQ, soit en évaporant le solvant organique du surnageant. Par conséquent, plus le volume total du surnageant est important, plus le temps nécessaire pour le dépôt du surnagent dilué sur le support SPE ou pour l'évaporation du surnagent est long. Différents volumes de précipitation (2, 3, 4 et 5 mL) pour une précipitation à 50 % (v/v) acétonitrile ont été évalués dans le cadre d'une dilution pour un volume final 16, 21, 32 et 40

mL, respectivement. L'expérience a été menée sur deux réplicas de préparation d'échantillon. Un volume total de 2mL (coefficient de variation de 14,5 %) a rapporté les signaux les plus intenses par rapport aux autres conditions (2,5 fois plus importants par rapport au volume total de 5 mL). Cette observation peut s'expliquer par une surface de contact plus importante avec la paroi des tubes utilisés pour le volume plus élevé et donc un risque de perte des protéines par adsorption passive. Cependant, la variabilité de signal observée lors de cette étude ne permet pas de discriminer l'ensemble des conditions testées. Le critère de sélection s'est alors porté sur le volume de solution le plus faible. En effet, un volume total de 2 mL permet un gain de temps lors de la préparation d'échantillon. La précipitation protéique à 50 % (v/v) ACN pour un volume total de 2ml a été donc retenue pour la méthode finale.

II.3.3.3 Purification des protéines par SPE

Une autre technique utilisée pour la simplification de la matrice et extraire les protéines d'intérêt est l'extraction en phase solide. Cette technique a été implémentée à la suite de la précipitation des protéines lors de cette étude. Le principe de purification de cette technique est basé sur les différentes propriétés physicochimiques des protéines. Les différentes étapes de l'extraction SPE ont été détaillées dans la section A.IV.4.4. Suite à l'analyse bibliographique, le choix de phase SPE s'est porté sur la phase HLB qui a permis d'extraire efficacement les protéines dans de nombreuses études.(218,286–289). Le choix de solvant organique pour l'élution des protéines est également important. Le méthanol et l'acétonitrile sont couramment utilisés pour éluer les analytes d'intérêt. Les conditions initiales de l'extraction SPE sur la phase HLB ont été inspirées de l'étude de Bronsema *et al.* portant sur la quantification de la calcitonine dans le sérum humain avec une limite de quantification de 0,05 ng/mL (218). En effet, la calcitonine a été purifiée à partir de 500 µL de sérum sur la phase HLB (30mg) avec la phase d'élution composée de 90 % (v/v) MeOH 0,2 % (v/v) acide heptafluorobutyrique. En tenant compte de l'utilisation du SDC pour la dénaturation des protéines, l'utilisation de l'acide dans la solution d'élution a été supprimé afin d'éviter la précipitation du SDC. En plus de la solution d'élution de 90 % (v/v) méthanol rapportée dans cette étude, d'autres proportions en méthanol ont été évaluées : 50 %, 60 %, 70 % et 80 % (v/v) (*Figure 76*).

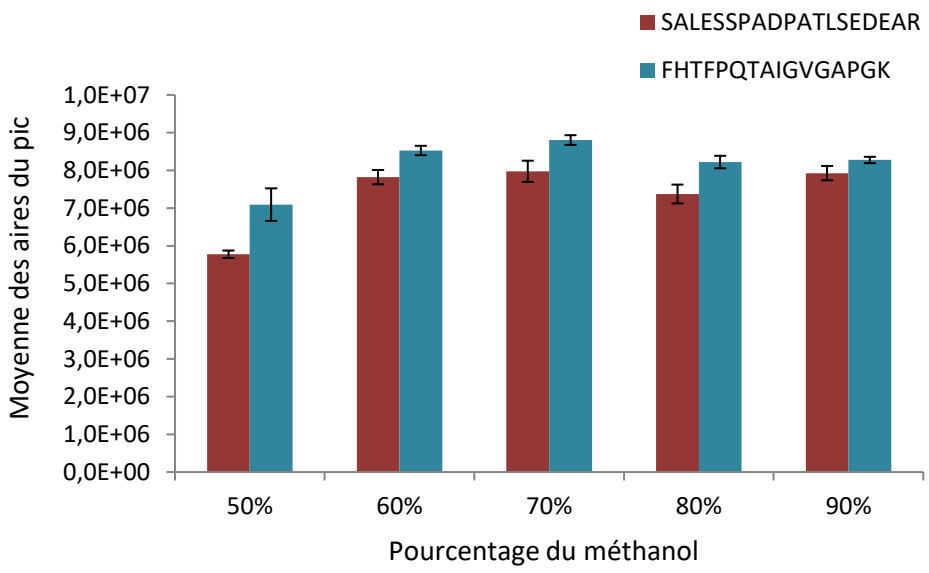


Figure 76. Evaluation du pourcentage du méthanol dans la solution d'élution de SPE HLB

Les résultats sont présentés en aire moyenne de pic chromatographique obtenu lors de trois injections. L'expérience a été menée sur simple réplica de préparation d'échantillon sur la cartouche HLB 500 mg.

Les résultats montrent une stabilisation de l'intensité de signal pour les deux peptides à partir de 60 % (v/v) méthanol. Cette proportion en méthanol permet d'obtenir une intensité de signal maximum et de réduire grandement les interférences protéiques du sérum qui sont éventuellement éluées aux concentrations plus élevées en méthanol. Par la suite, la comparaison du pouvoir d'élution entre le méthanol et l'acétonitrile a été également réalisée. La solution d'élution à 60 % (v/v) acétonitrile (optimisée de la même façon que pour le méthanol) a montré une augmentation des signaux d'un facteur allant de 1,14 à 1,3 par rapport à 60 % (v/v) méthanol pour les deux peptides d'intérêt, et a donc été retenue pour la suite du projet.

II.3.3.4 Digestion des protéines

Dans l'approche *bottom-up*, la digestion est une étape clé pour la quantification d'une protéine par le biais des peptides protéotypiques générés. Il est donc important d'optimiser les conditions de digestion afin d'assurer une digestion totale et d'améliorer la sensibilité de la méthode. Les différents paramètres de la digestion tels que la quantité d'enzyme, le temps de digestion et l'influence des détergents ont été investigués.

a. Rapport de quantité enzyme/substrat

Le rapport de quantité enzyme/substrat de 1/75 est habituellement utilisé pour la digestion tryptique (290). Cependant ce rapport dépend principalement de la qualité et de la pureté de l'enzyme. Ainsi, différentes quantités d'enzyme (de 1,5 µg, à 9,0 µg) correspondant à un ratio enzyme/substrat d'environ 1/200 à 1/30 ont été évaluées sur des duplicatas de préparation d'échantillon (*Figure 77*). Bien qu'il n'y ait pas de différence significative observée entre les différentes quantités d'enzyme, la variabilité est plus faible avec 9,2 µg. Cependant, une telle quantité représente un certain coût pour les analyses. Une quantité intermédiaire de 4,6 µg de trypsine, montrant des aires de pics plus importante, a été retenue pour ce projet.

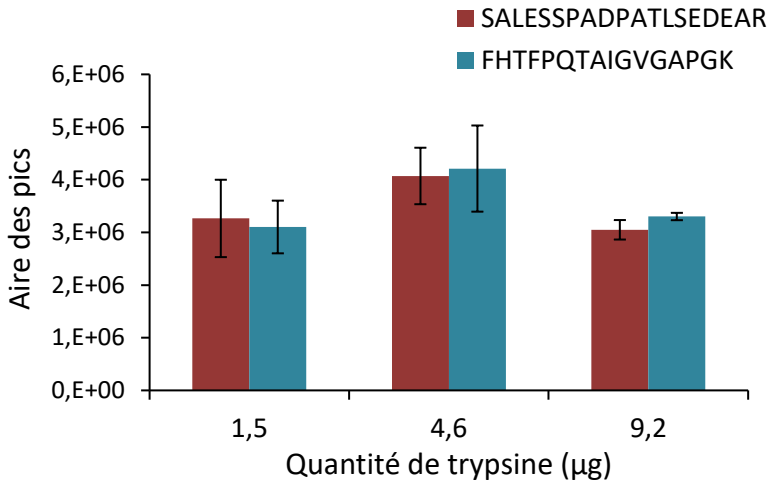


Figure 77. Etude de la quantité d'enzyme trypsine

Les résultats sont présentés en aire moyenne de pic chromatographique. L'expérience a été menée sur deux réplicas de préparation d'échantillon.

b. Cinétique de digestion

Après avoir déterminé la quantité de trypsine optimale pour la digestion, il est important d'étudier le cinétique de digestion afin de choisir le temps de digestion pour lequel la quantité des peptides générés est maximale. L'étude de cinétique de digestion a été réalisée avec un pool de sérum contenant de la PCT recombinante et son étalon interne marqué à une concentration de 10 ng/mL. Après les étapes de dénaturation, précipitation protéique et extraction SPE, les extraits ont été digérés par la trypsine pendant différentes durées : 0,5h, 2h, 4h, 6h, 20h, 24h et 48h (*Figure 78*).

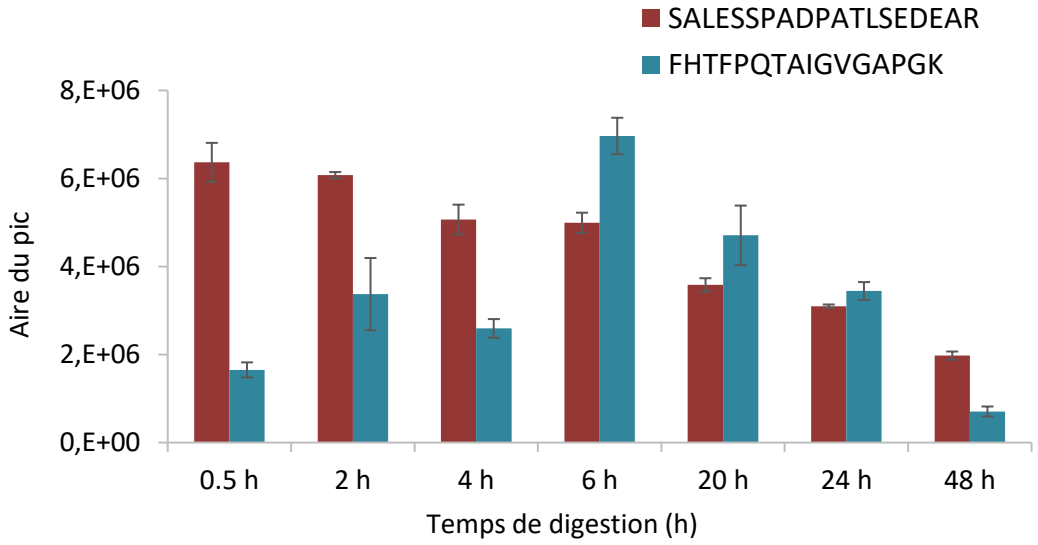


Figure 78. Cinétique de digestion de la PCT

Les résultats sont présentés en aire moyenne de pic chromatographique obtenu lors de trois injections. L'expérience a été menée sur simple réplica de préparation d'échantillon.

L'étude cinétique de la digestion a montré que l'intensité de signal est maximale pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK après 30 min et 6h de digestion, respectivement. L'évolution de la formation des deux peptides d'intérêt n'est pas identique. Il est donc nécessaire de déterminer un temps de digestion qui permet à la fois une sensibilité suffisante et une spécificité de la méthode de quantification. En analysant les aires absolues obtenues pour les deux peptides, un temps de digestion de 6h a semblé être le meilleur compromis. En effet, à 6h de digestion, un gain d'un facteur 4,2 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK a été observé par rapport à une digestion de 30 min. Au contraire, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a présenté une perte de 22 % de signal entre 30 min et 6h de digestion. Pour les conditions de digestion, le critère de sélection s'est porté sur le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK car il est susceptible d'être fortement impacté par les conditions de digestion du fait de la présence du dipeptide KR en position N-terminale de ce peptide, comme discuté précédemment. La détection robuste de ce peptide est essentielle pour ce projet afin de quantifier spécifiquement la PCT en sérum. En outre, la cinétique de digestion permet également de vérifier le comportement de l'étalon interne marqué de la PCT. En effet, afin de pouvoir corriger les variations produites durant les étapes de préparation d'échantillon et la digestion, l'étalon interne marqué doit présenter des propriétés physicochimiques similaires à la protéine PCT, lui permettant de présenter un comportement identique tout au long du processus analytique. La *Figure 79* confirme que le profil de cinétique de digestion de l'étalon

interne marqué est similaire à celui de la PCT. Le rapport des aires entre les peptides non marqués issus de la digestion de la PCT et les peptides marqués produits par la PCT recombinante marquée est proche de 1 sur toute la courbe de cinétique de digestion. Cela signifie que quel que soit le temps de digestion, l'étalon interne protéique marqué corrige les variations produites et permet d'améliorer la justesse de quantification. Par conséquent, la perte observée pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR après 6h de digestion sera corrigée par l'étalon interne protéique marqué.

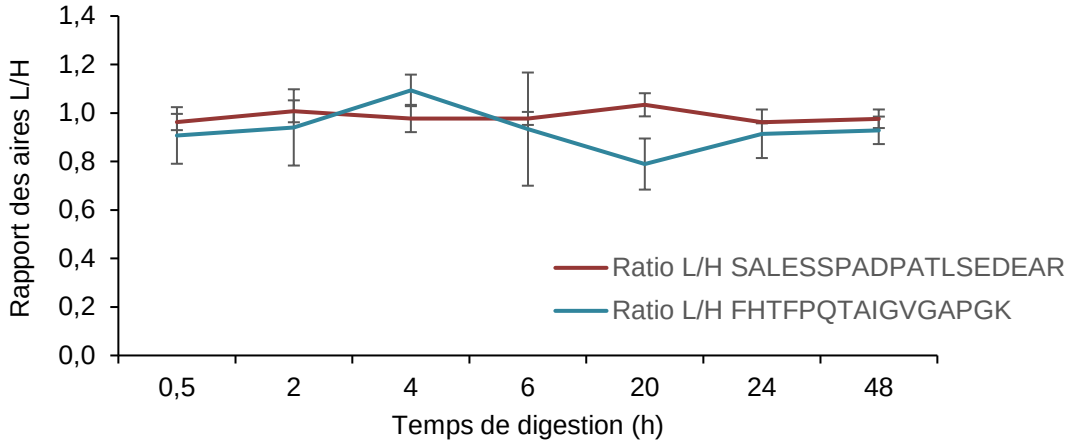


Figure 79. Rapport des aires entre les peptides non-marqués (L) et les peptides marqués (H) issues de la digestion de la PCT et PCT marquée en fonction de la durée de la digestion enzymatique

Par ailleurs, l'approche utilisant des peptides synthétiques marqués comme étalons internes a été également évaluée. Les peptides synthétiques marqués ont été ajoutés en quantité constante après chaque temps de digestion. Les rapports des aires entre les peptides issus de la digestion de la PCT et les peptides synthétiques marqués sont présentés dans la *Figure 80*. Le rapport des aires représente exactement la courbe de digestion de la PCT présentée précédemment, confirmant que l'ajout des peptides synthétiques marqués après la digestion ne permet pas de compenser les variations produites durant la digestion tryptique. Par conséquent, en travaillant avec la protéine marquée comme étalon interne, la variation observée pour la sélection du temps de digestion sera corrigée, tandis qu'il nécessite un facteur de correction pour couvrir la perte du peptide SALESSPADPATLSEDEAR si les peptides marqués sont implémentés.

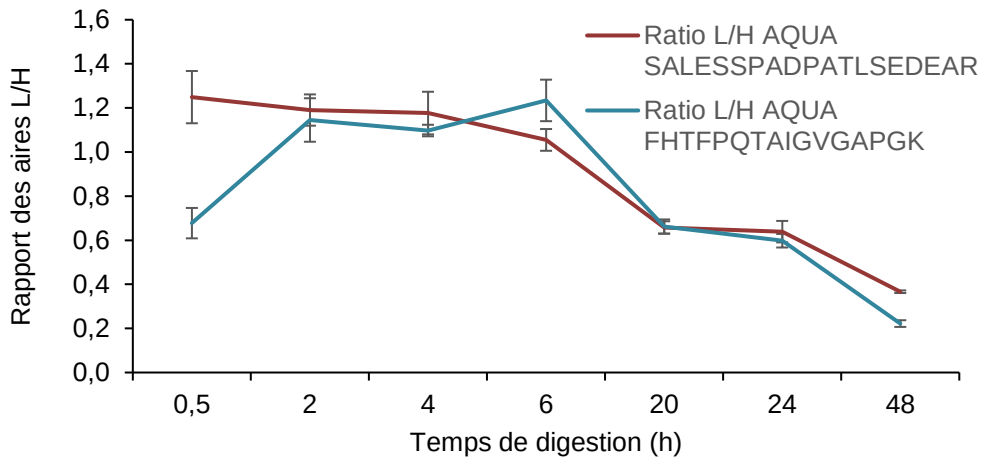


Figure 80. Rapport des aires détectés entre les peptides (L) issus de la digestion de la PCT et les peptides marqués synthétiques (H) au cours du temps

c. Influence de la présence Tween-20

Durant la digestion de l'extrait du sérum, un ajout de Tween-20 avant la digestion a été évalué dans le but de réduire l'adsorption passive de peptides générés au cours de digestion sur les surfaces du tube. Le tween-20 est un surfactant non ionique et un détergent doux permettant de favoriser la solubilisation sans impacter les activités de l'enzyme (291). Le bénéfice de l'utilisation du Tween-20 a été démontré dans plusieurs études (218,240,292–294). Les résultats ont montré un gain des aires détectés d'un facteur 1,3 pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et 1,6 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK (*Figure 81*). Un facteur de gain plus important pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK par rapport au peptide SALESSPADPATLSEDEAR s'explique par le fait que le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK est plus hydrophobe en raison d'un taux important de résidus hydrophobes (53 %) dans la séquence d'acides aminés. Ainsi, la présence du Tween-20 favorise la solubilisation de ce peptide.

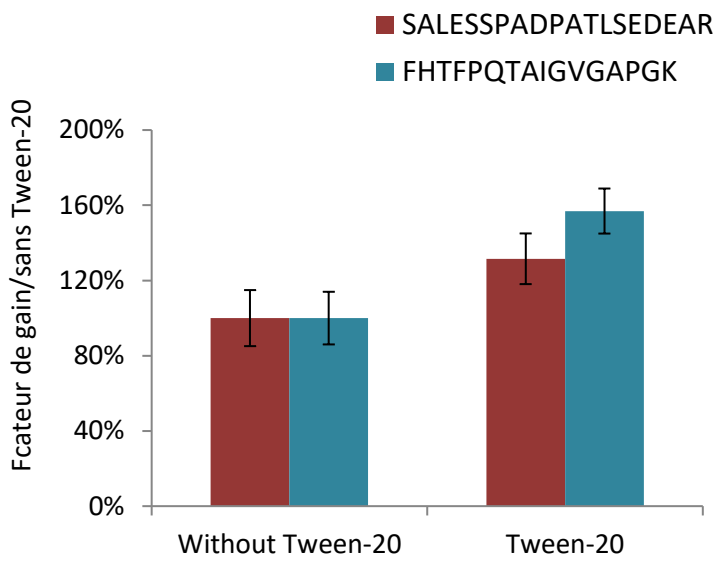


Figure 81. Influence d'ajout du Tween 20 à 0,0001 % dans la solution avant la digestion

Les résultats sont présentés en aire moyenne de pic chromatographique obtenu lors de trois injections. L'expérience a été menée sur trois réplicas de préparation d'échantillon.

La présence de Tween-20 en différentes proportions a été évaluée (de 0,00005 % à 0,00035 %). Une proportion finale de 0,0001 % a montré une meilleure intensité de signal pour les deux peptides. En effet, une trop faible proportion de Tween-20 peut ne pas être suffisante pour solubiliser les peptides alors qu'une proportion trop élevée de Tween-20 peut impacter l'ionisation au niveau de la source de spectrométrie de masse (295). Une concentration finale de 0,0001 % de Tween-20 a été retenue pour la digestion tryptique au cours de ce projet.

II.3.3.5 Purification des peptides

L'étape de digestion représente un impact important sur la sensibilité et la sélectivité des analyses LC-MS pour la quantification de la protéine dans une matrice riche en protéines. En effet, chaque protéine dans l'extrait du sérum est digérée pour générer un mélange de peptides. La complexité du mélange augmente encore en termes de nombre de molécules en présence. Il est donc nécessaire d'implémenter une étape de purification au niveau peptidique. Cette étape permet non seulement de réduire la complexité du mélange de peptides généré, mais également d'éliminer les protéines non digérées se retrouvant dans les digestats. Pour cela, différents types de phases d'extraction en phase solide (SPE) ont été évalués : HLB, MCX et SCX. La phase HLB permet l'extraction des analytes par une rétention sur une phase inverse, modifiée avec des groupements polaires. Elle est adaptée pour une large gamme d'analytes

(polaires, apolaires, neutres ou chargés). La phase échangeuse de cation SCX retient les analytes par interaction ionique. Cette phase possède des groupements sulfoniques négativement chargés permettant de retenir des groupements positivement chargés tels que les amines. Ayant une fonctionnalité sulfonique et un groupement hydrophobe, la phase MCX permet la rétention d'analytes chargé positivement et de bases faibles portant des groupements positivement chargés.

Quel que soit le type de phase SPE étudié, l'étape de purification a permis de réduire considérablement la complexité des digestats. La *Figure 82* présente un exemple de chromatogramme d'ion total obtenu par l'extraction SPE de type HLB par rapport à celle obtenue sans l'extraction SPE.

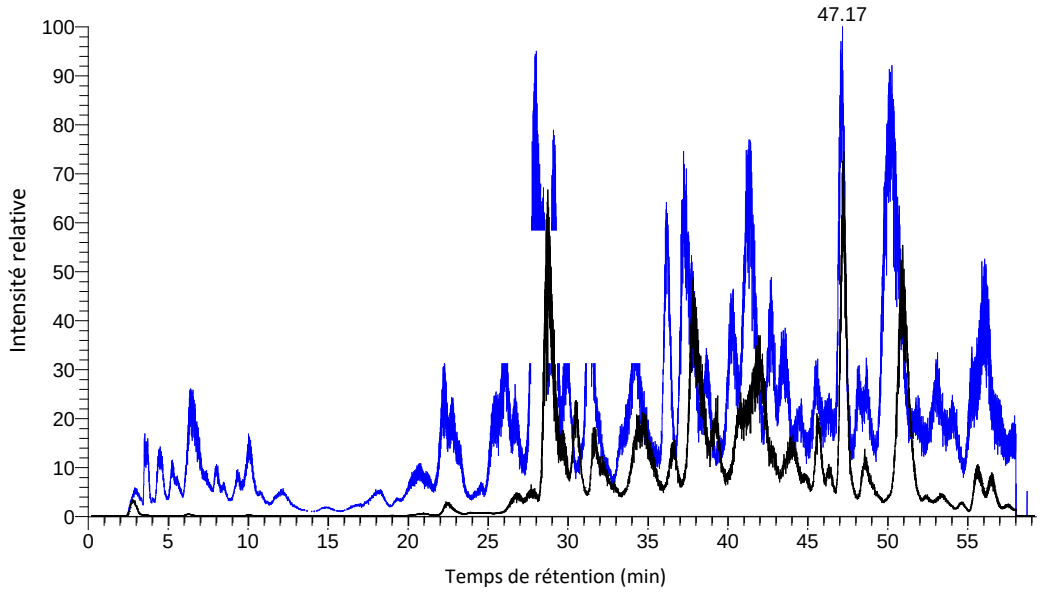


Figure 82. Superposition de deux chromatogrammes du courant d'ion total obtenues d'un digestat sans extraction SPE HLB (profil en bleu) et d'un extrait par SPE HLB du digestat (profil en noir)

Injection de 20 µL de l'extrait du sérum digéré à une concentration de la PCT de 6,5 ng/mL. Phases mobiles H_20 + 0,05 % AA / MeOH + 0,05 % AA. Colonne : Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm. Débit : 80 µL/min. Température de la colonne :60 °C. Gradient : gradient de 5 % à 45 % en 55 min. Détection : Full MS

Parmi les trois phases SPE étudiées, la phase MCX induit une perte d'intensité de signal d'environ 60 % pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et d'environ 70 % pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Cela peut être dû à une interaction forte entre les peptides et la phase stationnaire car la rétention met en œuvre à la fois par des interactions ioniques et hydrophobes. Les deux autres phases HLB et SCX ont montré des résultats similaires en termes

d'aires sous le pic pour les deux peptides d'intérêt. Cependant l'extraction SPE de type SCX n'a pas été retenue car elle requiert un temps de manipulation plus long, en effet deux étapes d'élutions pour les deux peptides d'intérêt en raison de la différence des propriétés physicochimiques, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR est élué avec une faible force ionique tandis que le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK est élué avec une forte force ionique. De plus, l'extraction SCX a montré un manque de fidélité au cours des développements. L'extraction SPE de type HLB a donc été retenue pour sa fidélité et sa facilité de mise en œuvre. Les conditions finales de l'extraction SPE de type HLB sont présentées dans le *Tableau 20*.

Tableau 20. Conditions d'extraction SPE de type HLB au niveau peptidique

SPE HLB 30mg Oasis	Solutions
Conditionnement	1mL ACN, 0,1 % (v/v) TFA 1mL 0,1 % (v/v) TFA
Dépôt	Echantillon à extraire
Lavage	1mL 0,1 % (v/v) TFA 1mL 10 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA
Elution	1mL 20 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v)TFA

Conclusions

En tenant compte des différents enjeux dans le développement de la méthode de quantification d'une protéine de faible abondance dans une matrice complexe comme le sérum humain, les différentes étapes, allant du protocole de préparation des échantillons à l'analyse LC-MS, ont été optimisées afin d'améliorer la sensibilité de la méthode pour atteindre une quantification de la PCT au seuil d'intérêt. Au cours de l'optimisation de l'ensemble des paramètres, des compromis ont été faits en raison des propriétés physicochimiques différentes des deux peptides protéotypiques sélectionnés. L'utilisation de la dilution isotopique pour la quantification de la PCT permet cependant, pour la plupart des paramètres, de corriger les biais de quantification que ces compromis peuvent engendrer. En effet ces compromis seront compensés par l'utilisation de peptides synthétiques marqués ou par l'utilisation de la protéine recombinante marquée. Pour l'étape de digestion, l'impact des compromis réalisés va fortement dépendre de la stratégie d'étalonnage qui sera sélectionnée pour la quantification de la PCT car dans le cas d'un étalonnage peptidique, les peptides synthétiques marqués ne

permettront de corriger que les pertes de matériel suivant la digestion enzymatique. L'ensemble de ces points sera discuté dans les deux chapitres suivants.

II.3.4 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage peptidique

Dans cette étude, une méthode de dosage de la PCT par ID-LC-MS/MS dans le sérum humain avec un étalonnage peptidique a été développée, à partir des développements méthodologiques présentés précédemment. Le protocole de quantification est illustré dans la *Figure 83*.

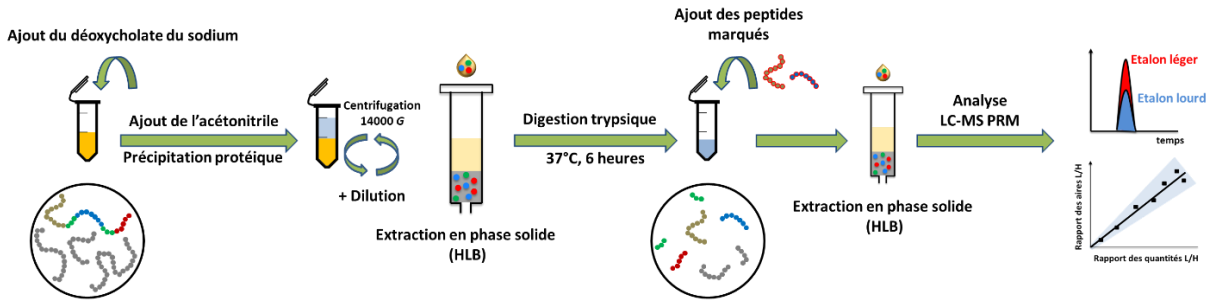


Figure 83. Protocole de quantification de la PCT dans le sérum humain par LC-MS/MS

Comme cela a été décrit, la méthode de quantification de la PCT repose sur une préparation d'échantillons rigoureusement optimisée pour la détection des deux peptides protéotypiques de la PCT. L'extraction de la PCT du sérum humain a été effectuée par une précipitation combinée à une extraction en phase solide (SPE). Dans le but d'augmenter l'efficacité de la précipitation et réduire l'interaction entre les protéines, une étape de dénaturation des protéines sous l'action du désoxycholate de sodium a été mise en œuvre. Après élimination du culot précipité, le surnageant a été dilué avec de l'eau afin de réduire la fraction organique avant l'étape de SPE sur une phase de type HLB. Après élimination du solvant de l'éluat, l'extrait est réduit, alkylé puis digéré par la trypsine en présence de Tween-20. Le digestat est finalement purifié par extraction SPE avant l'analyse LC-MS/MS. C'est la première fois, à notre connaissance, que l'extraction de la PCT dans le sérum a été mise au point sans recourir à l'utilisation d'une étape d'immuno-affinité basée sur l'utilisation d'anticorps pour réaliser la purification de la PCT lors de la préparation d'échantillon (183).

L'ensemble des paramètres de chromatographie liquide et du spectromètre de masse ont également été optimisés afin d'augmenter la sensibilité de la méthode de quantification et d'assurer la spécificité de la méthode. La détection par spectrométrie de masse est réalisée en mode ciblé PRM. Deux peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK, ainsi que leurs étalons internes marqués (peptides synthétiques) ont été suivis. Le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été sélectionné pour la quantification de la PCT alors que le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK a été sélectionné en tant que peptide de confirmation. Les deux transitions les plus intenses et spécifiques 973,4529 m/z ➔ 1371,6387 m/z et 973,4529 m/Z ➔

1088,5218 m/z du peptide SALESSPADPATLSEDEAR et 543,2912 m/z ➔ 585,3355 m/z et 543,2912 m/z ➔ 301,1870 du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK ont été sélectionnées.

Pour cette étude, la quantification de la PCT dans le sérum humain a été effectuée par une approche peptidique basée sur l'utilisation de peptides synthétiques en tant qu'étalons primaires et de peptides synthétiques marqués en tant qu'étalons internes. Les étalons internes synthétiques correspondent aux peptides protéotypiques de la PCT marqués isotopiquement sur l'alanine en position 18 pour le peptide SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R et sur la proline en position 14 pour le peptide FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK. Ces étalons internes marqués ont été ajoutés après l'étape de digestion tryptique afin de réduire les variabilités et pertes de matériel pouvant survenir après la digestion jusqu'à l'analyse LC-MS/MS. La quantification de la PCT étant réalisée en utilisant une courbe d'étalonnage peptidique, chaque étalon est donc préparé à partir des étalons primaires peptidiques SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK, à différentes concentrations, et de leurs homologues marqués à concentration constante. Dans le but d'améliorer la justesse de la méthode et d'établir la traçabilité des résultats aux unités SI, la concentration du peptide SALESSPADPATLSEDEAR, utilisé comme peptide de quantification, a été caractérisée par l'approche PICAA. Comme présenté précédemment (voir section B.II.2.1), la concentration du peptide dans la solution d'étalon primaire a été déterminée par AAA. Le profil d'impuretés de la solution d'étalon primaire a été caractérisé par des analyses de spectrométrie de masse de haute résolution. La quantité réelle du peptide a été obtenue par une soustraction des contributions des douze impuretés peptidiques dans le résultat d'AAA.

La méthode développée pour la quantification de la PCT a été évaluée en termes de linéarité, de justesse de quantification des peptides protéotypiques, de fidélité de mesures des peptides protéotypiques et d'exactitude. Les droites d'étalonnage peptidiques (N=3) ont montré une linéarité entre 0,09 ng/mL et 5,12 ng/mL de la PCT avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,9993. De plus, la méthode développée a présenté un biais (différence entre la concentration mesurée et la concentration théorique) et une fidélité intermédiaire (coefficient de variation) inférieurs à 5 %, déterminés à partir d'échantillons de contrôle de qualité peptidiques préparés en triplicatas par jour et par niveau de concentration sur trois jours et deux niveaux de concentration.

En tenant compte de la stratégie d'étalonnage peptidique et des possibles pertes de la PCT tout au long du processus d'analyse avant l'ajout des étalons internes, un facteur de correction a été implémenté dans cette méthode. En effet, un rendement de quantification, déterminé à partir d'échantillons de contrôle de qualité protéiques préparés en triplicatas par jour et par niveau de concentration sur deux jours et quatre niveaux de concentration, inférieur à 40 % a été déterminé. Un facteur de correction de 2,61 avec un coefficient de variation de

10,2 % a été défini. Ce facteur de correction a permis de corriger le rendement d'extraction et le rendement de digestion, qui sont souvent incomplets pour des analyses réalisées en matrice complexe.

La méthode ainsi développée a été appliquée à des échantillons de sérum humain supplémentés en PCT à une concentration représentative des seuils de décisions cliniques et à des échantillons réels constitués de pools de sérum de patients atteints du sepsis. L'application du facteur de correction établi précédemment, a permis la quantification de la PCT dans des échantillons de sérum humain surchargés en PCT recombinante à une concentration de l'ordre 0,24 ng/mL (N=8) avec un biais et une répétabilité de -1,9 % et 9,1 %, respectivement. La PCT a également été quantifiée en triplicata dans trois pools de sérum de patient souffrant du sepsis. Les résultats obtenus ont montré une répétabilité inférieure à 10 %. Ces trois pools de patients ont également été quantifiés par une méthode immunoessai de routine (Brahms Kryptor). Bien que les deux méthodes présentent une corrélation élevée (R2=0,996), les concentrations mesurées par l'immunoessai sont deux fois plus grandes que celles obtenues par la méthode ID-LC-MS/MS. Cette observation peut s'expliquer par les caractéristiques de ces deux techniques. La spectrométrie de masse détecte la PCT par le rapport masse sur charge du peptide protéotypique SALESSPADPATLSEDEAR de la PCT alors que l'immunoessai détecte la PCT par la reconnaissance entre un anticorps et les épitopes qui ne sont pas connus. En particulier, les anticorps sont susceptibles d'avoir des réactions croisées avec des interférences présentes dans la matrice. Ainsi, la spectrométrie de masse mesure de façon plus spécifique que l'immunoessai. La différence observée peut également être expliquée par la différence d'étalonnage entre les deux méthodes. Un biais proportionnel peut potentiellement être induit par l'utilisation d'étalons dont la concentration n'a pas été déterminée de la même façon.

La méthode développée lors de cette étude représente une alternative à la quantification par immunoessai à des niveaux de concentrations pertinents cliniquement (0,24 ng/mL). Cependant, l'utilisation d'une stratégie d'étalonnage peptidique impose l'utilisation d'un facteur de correction pour la quantification de la PCT et n'a pas permis d'utiliser le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, potentiellement sujet à des oublis de coupure lors de la digestion, comme peptide de quantification. Ainsi, les développements ont été poursuivis afin d'améliorer la méthode développée et de disposer d'une méthode de référence candidate.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication, intitulée « Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin at sub-nanogram per milliliter level in human serum using a peptide-based calibration » et soumise au journal Analytical and Bioanalytical chemistry.

Article 3 : Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin at micro-nanogram per liter level in human serum using a peptide-based calibration

Huu-Hien Huynh, Amandine Boeuf, Maxence Derbez-Morin, Anne-Marie Dupuy, Vincent Delatour, Joëlle Vinh

Article accepté pour publication dans Analytical and Bioanalytical Chemistry

Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin in human serum at sub-microgram per liter level using a peptide-based calibration

Huu-Hien Huynh[1, 2], Amandine Bœuf[1], Maxence Derbez-Morin[1, 3], Anne-Marie Dupuy[4], Béatrice Lalere[1], Vincent Delatour[1], Joëlle Vinh[2]

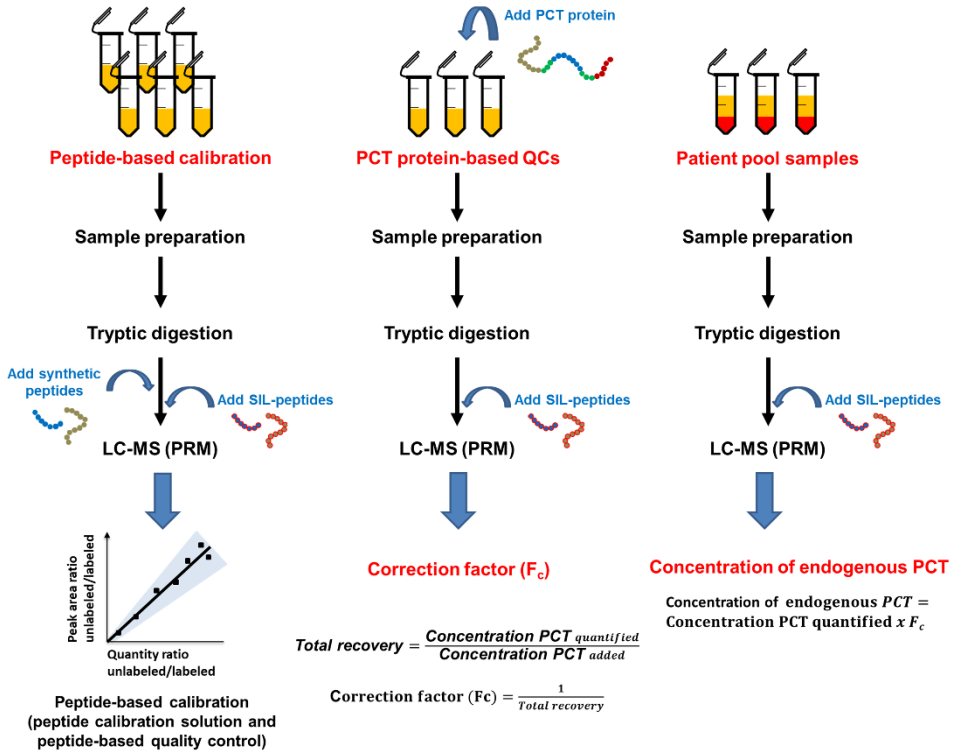
1 Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Biomedical and Organic Chemistry Department, Paris, France
2 Biological Mass Spectrometry and Proteomics, SMBP, ESPCI Paris, Université PSL, CNRS FRE2032, Paris, France
3 Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette, France
4 Laboratoire de Biochimie et Hormonologie, CHU Montpellier, Université Montpellier 1, Montpellier, France

Corresponding author: Amandine Boeuf at Laboratoire National de Métrologie et d'Essai (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France; Telephone: (33) 1 40 43 39 21; email: amandine.boeuf@lne.fr

Abstract

The quantification of low abundant proteins in complex matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) remains challenging. A measurement procedure based on optimized antibody-free sample preparation and isotope dilution coupled to LC-MS/MS was developed to quantify procalcitonin (PCT) in human serum at sub-microgram per liter level. A combination of sodium deoxycholate-assisted protein precipitation with acetonitrile, solid-phase extraction, and trypsin digestion assisted with Tween-20 enhanced the method sensitivity. Linearity was established through peptide-based calibration curves in the serum matrix (0.092-5.222 µg/L of PCT) with a good linear fit ($R2 \geq 0.999$). Quality control materials spiked with known amounts of protein-based standards were used to evaluate the method's accuracy. The bias ranged from -2,6% to +4,3%, and the intra-day and inter-day coefficient of variations (CVs) were below 2.2% for peptide-based quality controls. A well-characterized correction factor was determined and applied to compensate for digestion incompleteness and material loss before the internal standards spike. Results with metrological traceability to the SI units were established using standard peptide of well-characterized purity determined by peptide impurities corrected amino acid analysis. The validated method enables accurate quantification of PCT in human serum at a limit of quantification down to 0.245 µg/L (bias -1.9%, precision 9.1%). The method was successfully applied to serum samples obtained from patients with sepsis. Interestingly, the PCT concentration reported implementing the isotope dilution LC-MS/MS method was two-fold lower than the concentration provided by an immunoassay.

Graphical abstract



Keywords: procalcitonin, sepsis, isotope dilution mass spectrometry, peptide-based calibration

Abbreviation: AAA amino acid analysis; ACN acetonitrile; CRM certified reference material; CV coefficient of variation; DMSO dimethyl sulfoxide; ID-LC-MS/MS isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry; HLB hydrophilic-lipophilic balance; HRMS high-resolution mass spectrometry; LOQ limit of quantification; PCT procalcitonin; PICAA peptide impurity corrected amino acid strategy; PRM parallel reaction monitoring; QC quality control; SDC sodium deoxycholate; SIL stable isotope labeled; SPE solid-phase extraction;

Introduction

Human serum and plasma represent a rich source of information on physiological and pathological conditions, making quantification of biomarkers in these matrices a powerful tool to assist clinicians in diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring of patients [1]. Most biomarkers are routinely quantified by immunological methods thanks to automation and easy integration into the clinical laboratory [2]. However, immunoassays do not exist for all clinically relevant biomarkers. These assays often reported a lack of reproducibility across different platforms and sometimes a lack of specificity due to the antibodies' cross-reactivity [3]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry is a powerful alternative analytical technique in bioanalysis because of its good reproducibility and high specificity by eliminating interferences that may impact immunoassays (e.g., cross-reactivity of antibodies) [3]. However, LC-MS requires a high initial investment for instrument acquisition, highly experienced operators, and, for intended use in clinical practice, presents a limited sample throughput compared to immunoassays [4–6]. However, this last point tends to be addressed by developing high throughput LC-MS methods, particularly on sample preparation steps, to improve LC-MS adoption into routine practice.

For quantifying low abundant proteins present at sub-microgram per liter concentrations in a complex matrix such as serum, LC-MS-based protocols often require significant efforts to reach the required analytical sensitivity. Indeed, an extended dynamic range of serum protein concentration (>10 orders of magnitude) and a high amount of total protein from 22 to 102 mg/mL constitute a major limiting factor of proteomic analysis of serum/plasma [7]. Selective immunoaffinity capture enrichment is frequently implemented to overcome this challenge and extract the biomarker of interest before quantifying at sub-microgram per liter [8]. However, specific antibodies against a target biomarker are not always available, and the development and production of these antibodies take time and can be costly. Moreover, the use of an antibody during the LC-MS sample preparation may not enable quantifying the total form of the biomarker of interest. Indeed, the antibody may not allow capturing the analyte bound to other proteins (e.g., protein-protein interaction) and thus lead to a bias in quantification. Many proteins exist under different isoforms and proteoforms, and very little is known regarding the antibody's selectivity for each proteoform. In the end, what is captured and measured remains very often unknown. On the contrary, the development of an accurate LC-MS quantification method without using immunoaffinity capture enrichment offers the possibility to perform a targeted analysis with the highest selectivity. However, due to the ion suppression phenomenon, more efforts are needed regarding sample preparation with orthogonal protein purification approaches. These approaches are based on proteins of interest's physicochemical characteristics and often consist of protein precipitation or solid-phase extraction. Several studies reported the quantification by LC-MS of low abundant protein biomarkers in serum/plasma without immunoaffinity capture enrichment [9–16].

Procalcitonin (PCT), a 12 kDa protein, is an excellent example of a clinically relevant protein biomarker found at a very low blood concentration. PCT is a biomarker of sepsis present in the blood at a concentration below 0.05 µg/L in healthy conditions, which may rise to 1000 folds in case of bacterial infection [17–19]. A cut-off of 0.5 µg/L for sepsis diagnosis, and a cut-off of 0.25 µg/L for antibiotic therapy implementation, are used in clinical practice [20,21]. These cut-off points, traceable to LIA immunoassay, are widely applied for others PCT immunoassays [22]. Thus PCT testing requires high accuracy of measurements because patient management can be tailored based on these thresholds. PCT was chosen as a case study to illustrate the analytical challenge of developing an antibody-free quantification method for a low abundant biomarker based on the LC-MS technique and highlight the need to optimize the sample preparation step. To our knowledge, there are only two studies reported to determine the PCT concentration in human serum using the LC-MS strategy, with a limit of quantification (LOQ) of 1.0 µg/L [23] and 0.1 µg/L [24]. However, these studies employed selective immunoaffinity capture enrichment against either PCT protein [23] or PCT related-peptides [24]. Therefore, this work aimed to develop an antibody-free ID-LC-MS/MS method that enables sensitive, selective quantification of a low abundant protein in serum matrix with a peptide-based calibration strategy. The performance of this method was evaluated using both peptide- and protein-based

quality control samples. Finally, this method was compared to a commercially available immunoassay method, and the potential of the developed LC-MS method to become a candidate reference measurement procedure is discussed.

Materials and methods

1. Chemicals and reagents

The peptide standards SALESSPADPATLSEDEAR, FHTFPQTAIGVGAPGK and the stable isotope-labeled (SIL) standards SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R (> 99.9 % purity ^{13}C,^{15}N), FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK (> 99.9 % purity ^{13}C,^{15}N) were purchased from Pepscan Presto (Lelystad, The Netherlands) as powder. Recombinant PCT protein solution was obtained from Promise Advanced Proteomics (Grenoble, France). Recombinant PCT protein solution was obtained from Promise Advanced Proteomics (Grenoble, France). PCT concentration (807 mg/g) in 20 mM Tris pH7.6, 100mM NaCl buffer was determined in-house with metrological traceability to the SI units by amino acid analysis. HRMS established an impurity profile. Thanks to the hyphenated purification to which the recombinant PCT was subject, no impurity requiring correcting the raw amino-acid results was identified.

Dimethyl sulfoxide (DMSO, cat# 1029502500) was purchased from Merck Millipore (Massachusetts, USA). Sodium deoxycholate (SDC, cat# D6750-100G), ammonium bicarbonate (cat# 09830-500G), dithiothreitol (cat# 43819-1G), iodoacetamide (cat# I1149-5G), and Tween-20 (cat# P1379-100ML) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (ACN, cat# 0001204102BS), methanol absolute (cat# 0013684102BS), formic acid (cat# 00069141A8BS), and trifluoroacetic acid (cat# 00202341A8BS) (all LC-MS grade) were purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France). Acetic acid (cat# A113-50, LC-MS grade) was purchased from FisherChemical (Illkirch, France). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, MA, USA). Trypsin Gold (cat# V5280, MS grade) was obtained from Promega (Madison, USA).

The certified reference materials (CRM) of amino acid L-alanine (CRM 6011-a, 99.9±0.2 %), L-leucine (CRM 6012-a, 99.9±0.2 %), and L-proline (CRM 6016-a, 99.9±0.2 %) were obtained from the National Metrology Institute of Japan (NIMJ, Tsukuba, Japan). The $^{13}C^{15}N$-labeled or 13C-labeled amino acids were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA).

Human serum (pool from different male donors, cat# H4522) was purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

2. Proteotypic peptides selection

The proteotypic peptides used for the quantification of PCT with a bottom-up approach were selected after *in silico* tryptic digestion of PCT, LC-MS/MS analysis of a PCT tryptic digest in a buffer, and in serum matrix. The peptide's uniqueness to the PCT protein was determined by performing a blast of the two peptide sequences against a human protein database and bacterial protein database. Fully tryptic peptides, without misscleavage, with a length between 7 to 20 amino acids, devoid of residues prone to artifactual or post-translational modifications, have been selected.

3. Purity assessment of SALESSPADPATLSEDEAR standard peptide

The purity assessment of the peptide standards used as calibrators was performed with peptide impurity corrected amino acid strategy (PICAA) [25].

The peptidic content of the SALESSPADPATLSEDEAR primary stock solutions was quantified by amino acid analysis using a 5-point calibration curve. The experiment was performed with three processed replicates per day over three days. The peptide's primary stock solutions were gravimetrically diluted in water before adding the labeled amino acids in a 0.1N HCl solution. The gas-phase hydrolysis was performed at 130°C ± 5 for 40 h under vacuum in the presence of 6 N HCl. The final solution was then evaporated to dryness at room temperature in a

centrifugal vacuum concentrator, and the resulting samples were reconstituted with 100 µL of water. The amino acids produced were separated using a Waters BEH column (C18, 150 x 2.1 mm, 1.7 µm) on isocratic mode combining 2% of phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) and 98% of phase A (0.1% formic acid in water). Amino acids were then detected on a QExactive Focus high-resolution mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using selected ion monitoring mode. Three amino acids (Ala, Leu, and Pro) were used for quantification.

The SALESSPADPATLSEDEAR primary stock solution was analyzed by LC-HRMS and LC-HRMS/MS to identify and quantify peptidic impurities that could compromise the amino acid analysis trueness. Analyses were acquired on a Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer coupled with a Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 ultra-performance liquid chromatography system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in electrospray ionization mode. The SALESSPADPATLSEDEAR peptide and its impurities were separated on a Pepmap column (C18, 250 x 1 mm, 5 µm) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The mobile solvents consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). The separation was achieved using a linear gradient (from 2% to 35% of solvent B over 15min, and from 35% to 60% of solvent B over 15min) at a 100 uL/min flow rate.

Each amino acid's concentration obtained by amino acid analysis was then corrected by each impurity's contribution containing the concerned amino acid (see ESM). The final concentration of SALESSPADPATLSEDEAR peptide in the primary stock solution was obtained by averaging the corrected concentrations of the three quantified amino acids alanine, leucine, and proline.

4. Preparation of calibrators and internal quality materials

All steps of preparation of solution were performed gravimetrically using calibrated precision balances. Therefore, the concentration of peptide solutions was expressed in molar per mass of solution to avoid implication of solution density and each peptide's molecular weight. PCT concentration was provided in µg/L as expressed in clinical use.

i. Stock solutions and working solutions

Individual primary stock solutions were prepared in DMSO for SALESSPADPATLSEDEAR and SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R peptides and in 50 % (v/v) DMSO in water for FHTFPQTAIGVGAPGK and FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK peptides. Solutions were aliquoted and stored at -80°C ± 10°C.

The individual primary stock solutions of peptides and SIL peptides were diluted with 10% (v/v) ACN, 0.001% (v/v) Tween 20 in water to obtain individual secondary stock solutions of unlabeled and labeled peptides at 6,660 pmol/g (corresponding to a PCT concentration of 85,100 µg/L).

A mixed solution of the two unlabeled peptides at 10.8 pmol/g (corresponding to a PCT concentration of 138 µg/L) was further prepared by mixing their individual secondary solutions in 10% (v/v) ACN, 0.001% (v/v) Tween 20. A mixed solution of the two SIL peptides at 4.1 nmol/g was further prepared by mixing the individual secondary solutions of SIL peptides in 10% (v/v) ACN, 0.001% (v/v) Tween 20.

A working solution of recombinant PCT at 6.8 µg/L was prepared by diluting in series the recombinant PCT stock solution at 807 mg/L in human serum to preserve its stability and prevent any loss from adsorption.

ii. Peptide calibrators and peptide quality control materials

Peptide calibrators and peptide quality control (QC) material consisted of processed and digested serum samples obtained from healthy subjects (see sample preparation procedure) spiked with calibration/QC solutions prepared as followed. Calibration solutions were prepared by mixing an increasing amount of unlabeled peptides mixed solution

with a constant amount of SIL peptides mixed solution with a mass ratio of peptides ranging from 0.06 to 2.65 (peptide concentration from 0.007 pmol/g to 0.4 pmol/g, corresponding to a PCT concentration from 0.092 µg/L to 5.222 µg/L). Peptide calibrators were used to establish the linear regression. Two QC solutions were prepared by mixing different amounts of unlabeled peptide mixed solution with a constant amount of SIL peptides mixed solutions to reach a quantity ratio of 0.52 and 1.92 (peptide concentration of 0.08 pmol/g and 0.3 pmol/g, corresponding to a PCT concentration of 1.020 and 3.876 µg/L, respectively). The unlabeled peptide solutions used to prepare calibration solutions and QC solutions were prepared from two different aliquots of the individual primary stock solutions. Peptide QC materials were used to determine the measurement accuracy of the peptide-based calibration model and to detect any calibration issues.

iii. Protein-based quality control materials

Protein QC material consisted of human serum obtained from healthy subjects spiked with recombinant PCT solution prepared as followed. Four recombinant PCT solutions were prepared by diluting the working solution of recombinant PCT in human serum at four different concentration of 0.484 µg/L, 0.912 µg/L, 3.792 µg/L, and 9.213 µg/L. Protein QC materials were used to determine the recovery of the whole sample workflow and the correction factor to apply for the quantification of PCT with the peptide-based calibration model (see section 8). It thus informs on the trueness and precision of the entire protocol.

Furthermore, eight PCT serum samples were prepared by adding another working solution of recombinant PCT in human serum at 0.245 µg/L. These samples were used in an independent experience to evaluate the method trueness and precision for PCT quantification at a concentration near the clinical cut-off of 0.25 µg/L.

5. Analytical workflow

i. Sample preparation procedure

The sample preparation procedure for PCT quantification is described in Fig. 1. Five hundred microliters of human serum obtained from healthy subjects (for calibration calibrators and peptide QC materials) or serum samples (protein-based QC materials and serum-based pooled patient samples) were weighted before adding 500 µL of 1% (w/w) SDC detergent in water. The samples were sonicated for 5 min and then mixed for 10 min at room temperature. The proteins were precipitated by adding 1 mL of acetonitrile. Samples were mixed for 10 min at room temperature and centrifuged at 14,000 x g for 5 min at room temperature. The supernatant was diluted with 14 mL of water to reduce the organic fraction and then loaded on an HLB (hydrophilic-lipophilic balance) Oasis 500 mg cartridge (Waters, Massachusetts, USA), previously conditioned with 3 mL of methanol, 3 mL of 60% (v/v) acetonitrile in water and equilibrated with 3 mL of water. Loaded samples were washed with 3 mL of water and 1 mL of 10% (v/v) methanol in water. Samples were eluted with 1 mL of 60% (v/v) acetonitrile in water and evaporated to dryness in a centrifugal vacuum at room temperature.

The dried extracts were dissolved in 10 µL of methanol. The proteins were reduced at 37 °C for 1 h by adding 82 µL of 15.3 mM ammonium bicarbonate buffer and 20.8 mM dithiothreitol in water and alkylated at 20 °C for 1 h in the dark under shaking by adding 18 µL of 500 mM iodoacetamide in water. Before digestion, samples were diluted with 92 µL of 94 mM ammonium bicarbonate buffer, 2.4% of acetonitrile and 0.00024% of Tween-20 in water (v/v/v) to prevent peptides adsorption. Samples were then digested with 6 µL of 770 µg/mL trypsin gold in 50 mM acetic acid solution, at 37 °C for 6 h under shaking before stopping the digestion by adding 2 µL of formic acid.

Twenty microliters of SIL-peptides were then gravimetrically added to the tryptic digest of serum samples. Twenty microliters of each calibration solution or peptide QC solution were added to the processed and digested human serum samples to prepare peptide-based calibrators and peptide-based QC materials. All samples were diluted by adding 1 mL of 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid in water before SPE extraction on an HLB Oasis 30 mg cartridge (Waters). The cartridge was previously conditioned and equilibrated with 1 mL of acetonitrile 0.1% (v/v)

trifluoroacetic and 1 ml of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water. Loaded samples were washed with 1 mL of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and 1 mL of 10% acetonitrile 0.1% trifluoroacetic. Peptides were finally eluted with 1 mL of 20% (v/v) acetonitrile 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Extracts were then evaporated to dryness in a centrifugal vacuum at room temperature and stored at -20 °C until analysis. Prior to LC-MS/MS analysis, the extracts were reconstituted in 100 µL of 2% (v/v) methanol, 0.1% (v/v) formic acid in water.

Each extract was analyzed three times, and the mean of three injections was used to calculate the final concentration. Each serum sample was measured in three processed replicates to evaluate the analytical performance of the developed method, and the comparability of the results between the routine immunoassay Brahms Kryptor Gold and the ID-LC-MS/MS method.

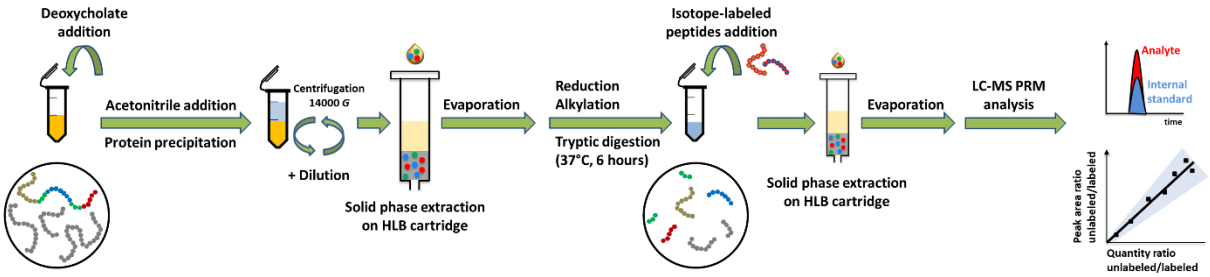


Fig. 1 *Sample preparation procedure for the quantification of PCT in human serum at sub-nanogram per milliliter level*
Proteins in human serum sample were first denatured using the ionic detergent sodium deoxycholate and precipitated using acetonitrile as precipitating agent. The supernatant was purified on an HLB solid-phase extraction (SPE) cartridge. After evaporation under vacuum, extracted proteins were digested with trypsin. Finally, tryptic peptides were purified on an HLB SPE cartridge, then evaporated to dryness before LC-MS analysis.

ii. LC-MS/MS conditions

Analyses were acquired on a Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer coupled with a Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 ultra-performance liquid chromatography system (Thermo Scientific). The mass spectrometer was equipped with an electrospray ion source. After optimization (see Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. S8), the following conditions were applied: capillary temperature at 250 °C, sheath gas flow rate at 25, aux gas flow rate at 2, spray voltage at 4.2 kV, S-lens RF level at 50 and aux gas heater temperature at 140°C. After optimization, 20 µL of the peptide extracts were injected on an Acclaim™ PepMap™ 100 C18 analytical column (1 x 150 mm, 3 µm) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at a flow rate of 80 µL/min and a temperature of 60°C. The solvent system consisted of 0.05 % (v/v) acetic acid in water (mobile phase A) and 0.05% (v/v) acetic acid in methanol (mobile phase B). Peptides were eluted with the following gradient of mobile phase B: 2% for 2 min, linear from 2% to 22% in 8 min, linear from 22% to 38% in 1 min, linear from 38% to 42% in 14 min, and from 42% to 98% in 1 min.

The selected signature peptides were detected and quantified using parallel reaction monitoring (PRM). Precursor ions (Table 1) were isolated within an isolation window of 1.5 m/z. The collision energy applied is detailed in Table 1. MS2 scans were collected at a resolution of 35,000 with an automatic gain control target of 2e5, and 1 microscan.

Table 1. *Amino acid sequence, retention time and PRM parameters for the detection of two selected peptides and the SIL-peptides homologues*

Proteotypic peptides	Retention time (min)	Precursor ions		Collision energy (eV)	Product ions	
		ion	m/z		ion	m/z
SALESSPADPATLSEDEAR	19.1	$[M+2H]^{2+}$	973.4529	35	$y13^{+}$	1371.6387
					$y10^{+}$	1088.5218
SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R	19.1	$[M+2H]^{2+}$	975.4565	35	$y13^{+}$	1375.6387
					$y10^{+}$	1092.5218
FHTFPQTAIGVGAPGK	14.9	$[M+3H]^{3+}$	543.2912	20	$y7^{+}$	585.3355
					$y3^{+}$	301.187
FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK	14.9	$[M+3H]^{3+}$	545.2958	20	$y7^{+}$	591.3493
					$y3^{+}$	307.2008

iii. Data analysis

PRM data treatment was achieved with Quanbrowser algorithm of XCalibur 4.1 version software (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Two transitions per peptide (SALESSPADPATLSEDEAR: 973.4529 → 1371.6387, 973.4529 → 1088.5218; SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R: 975.4565 → 1375.6387, 975.4565 → 1092.5218; FHTFPQTAIGVGAPGK: 543.2912 → 585.3355, 543.2912 → 301.1870; FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK: 545.2958 → 591.3493, 545.2958 → 307.2008) were retrieved from PRM data (Table 1). The final peak areas were obtained by computing the sum of these two transitions. All data were manually checked to ensure correct peak detection and accurate peak integration. Peak detection and area integration were based on the following criteria: the same retention time between unlabeled peptide and SIL-peptide (below 0.5% of variation) and the same relative PRM peak area ratios of two transitions between unlabeled peptide and SIL-peptide (below 15% of variation).

6. Evaluation of the method performance for the quantification of PCT in human serum using a peptide-based calibration approach

After defining the calibration curve (linearity), the developed method for quantifying PCT in human serum was evaluated regarding measurement trueness and precision (QC samples) over three independent assays.

1. The calibration model was evaluated according to the correlation coefficient (R2, Pearson) and the residuals response distribution of the calibration curves. The calibration curves were obtained by plotting the peak area ratio of the unlabeled peptide over its SIL-peptide against the corresponding mass ratio of the unlabeled peptide over its SIL-peptide in the freshly prepared calibration solutions as described in Equation E1.

$$\frac{Peak\ area\ of\ peptide}{Peak\ area\ of\ SIL-peptide} = f\left(\frac{Quantity\ peptide\ added}{Quantity\ SIL-peptide\ added}\right) \quad \textbf{Equation E1}$$

   The linear regression was plotted over six calibrator points (corresponding to PCT concentration ranging from 0.09 µg/L to 5.12 µg/L) on three different days. Residuals should be randomly distributed around zero. In addition, the peptides quantification of each point of the calibration curve was evaluated by considering the calibration samples as unknown samples. The bias was assessed by calculating a difference between the amount of peptide measured and the gravimetric SI-traceable amount added.

2. Trueness and precision of the peptide quantification were investigated in intermediate precision conditions of measurement by quantifying each peptide in peptide-based QC samples at two different concentrations. Trueness was evaluated by the bias between the measured concentration and the theoretical concentration

determined gravimetrically (Equation E2). Precision was calculated as the coefficient of variation (CV %) of the concentration of the measured peptides within a single run (repeatability, intra-day) and between three assays realized at different days (intermediate precision, inter-day). Bias and precision in repeatability conditions were evaluated by analyzing three peptide-based QC replicates per concentration per day (N=3). Bias and precision in intermediate precision conditions were evaluated by analyzing three peptide-based QC replicates per concentration per day on three different days (N=9). The peptide concentration of each sample was determined using a calibration curve prepared on the same day. The bias and precision of each level of the peptide-based QC sample should be within ± 15%, according to the guideline of bioanalytical method validation from FDA and EMA [26,27].

$$Bias\ (\%) = \frac{Cmeasured - Ctheorical}{Ctheorical}\ x\ 100 \quad \textbf{Equation E2}$$

To assess the trueness and precision of PCT quantification at the protein level, the total recovery and the need to implement a correction factor were evaluated. The total recovery was evaluated by analyzing protein-based QC materials spiked with recombinant PCT over two independent experiments (four different concentrations in three processed replicates). The amount of PCT added was compared with the amount of PCT quantified in these samples using a peptide-based calibration curve (Equation E3). The correction factor was then calculated by converting the sample preparation total recovery (Equation E4) and applied to correct the potential quantitative bias occurring during the quantification process (see ESM Fig. S3).

$$Total\ recovery = \frac{Concentration\ \text{PCT}\ quantified}{Concentration\ \text{PCT}\ added} \quad \textbf{Equation E3}$$

$$Correction\ factor\ (Fc) = \frac{1}{Total\ recovery} \quad \textbf{Equation E4}$$

7. Method application: quantification of endogenous PCT in serum samples

Three pools of patient serum samples with different PCT concentrations were provided by University Hospital Montpellier (Montpellier, France). Patient blood samples were collected in dry tubes. Each pool was produced by pooling twelve single frozen donations (leftovers) from patients suffering from sepsis or septic shock. After pooling and aliquoting, the three pools were analyzed at the clinical chemistry laboratory of Montpellier Hospital to determine PCT concentration with Kryptor Gold immunoassay and immediately stored at -80 C ± 10°C until analysis. These pools of samples were used to apply the developed method for the quantification of endogenous PCT.

Results

1. Proteotypic peptides selection

In the bottom-up approach, the identification of a protein of interest is achieved at the peptide level. Therefore, the selected peptides have to be proteotypic peptides (specific to the protein and easily identified in LC-MS). After *in silico* tryptic digestion of PCT, LC-MS/MS analysis of a PCT tryptic digest in a buffer and LC-MS/MS analysis of a PCT tryptic digest in serum matrix, two peptides SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK could be detected at low concentration and were selected for the detection of PCT. These peptides are located in two different PCT protein regions, which ensures the high specificity of the developed method for full-length PCT (Fig. 2). However, according to PCT's amino acid sequence, the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide is followed by a KR dipeptide. The chain containing KKR could potentially affect tryptic proteolysis reproducibility [28–30]. In our peptide-based calibration approach, the SIL-peptide could neither correct variations of tryptic digestion completion

nor material loss occurring before the digestion. Consequently, FHTFPQTAIGVGAPGK peptide was finally used as a qualitative control to confirm the identification of PCT, while SALESSPADPATLSEDEAR peptide was selected to quantify the PCT protein. For both peptides, the charge state with the highest signal-to-noise ratio was associated with the most sensitive measurements and was selected.

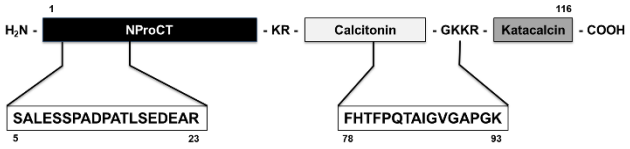


Fig. 2 *Schematic presentation of amino acid sequence of PCT. PCT is released in the bloodstream into three forms: NProCT, calcitonin, and katacalcin. SALESSPADPATLSEDEAR peptide was selected to quantify the PCT protein, while FHTFPQTAIGVGAPGK peptide was used as a qualitative control to confirm the identification of the PCT.*

2. Purity assessment of SALESSPADPATLSEDEAR standard peptide

The SALESSPADPATLSEDEAR peptide was selected to quantify the PCT protein. Therefore, the characterization of the commercial synthetic SALESSPADPATLSEDEAR peptide standard was performed to ensure the accuracy of the PCT quantification method and its ability to provide results that are traceable to the SI units.

i. Impurities profiling

The LC-HRMS analyses of the SALESSPADPATLSEDEAR primary stock solution showed a major chromatographic peak corresponding to the monoisotopic mass 1944.8933 Da (CV = 0.0001%, 8 injections), in agreement with the theoretical mass 1944.8912 Da (mass error 1.08 ppm) (Fig. 3a). Furthermore, the identification of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide was confirmed by LC-MS/MS analysis (see ESM Fig. S2).

Impurity profiling was performed to identify possible peptide impurities that could affect the amino acid quantification of the primary stock solution and thus compromise the accuracy of PCT quantification results. The identification of each impurity was performed by LC-MS/MS. The identity and extracted ion chromatogram of the main impurities of the SALESSPADPATLSEDEAR reference are presented in Fig. 3b and detailed in supplementary Table S2 (see ESM). Twelve impurities were identified, including three isomers of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide. The main peptide impurities consisted of forms missing one aspartate or one glutamate residue compared to the full peptide sequence or truncated forms of the correct peptide sequence. Punctual isobaric exchange of leucine to isoleucine at the 3rd and 13th position in the peptide sequence is the most probable explanation for the presence of isomers, considering that pure leucine standards may contain isobaric isoleucine as a major impurity. The isomers' identity cannot be discriminated between the LC peaks as standards were not available for isomers. The mass fraction value for each impurity detected by LC-MS/MS was approximated by assuming the same response factor as the main peptide SALESSPADPATLSEDEAR by LC-HRMS with an uncertainty of 80% for the response factor.

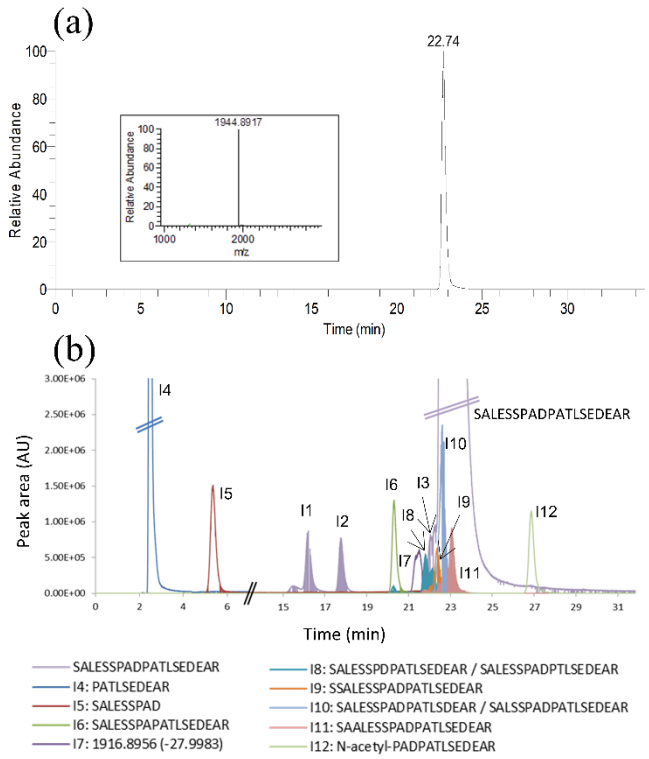


Fig.3 *Purity assessment of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide***.**
(a) Representative LC-HRMS chromatogram of SALESSPADPATLSEDEAR peptide obtained by injecting 128 ng of the standard peptide. Inset represents deconvoluted spectrum showing a major component with a monoisotopic mass of 1944.8917 Da corresponding to the main SALESSPADPATLSEDEAR peptide.
(b) Representative overlap of extracted MS chromatogram of SALESSPADPATLSEDEAR peptide and its main impurities in a peptide solution obtained by injecting 128 ng of the standard peptide with the occurrence of isobaric impurities of SALESSPADPATLSEDEAR peptide (Impurities I1, I2, and I3). Several artifacts, such as sodium and potassium adducts generated during the ionization process, were excluded from data analysis. AU: Arbitrary Unit.

ii. Amino acid analysis

The total amino acid analysis allowed quantifying the peptide content in the primary stock solution using three separate gas-phase hydrolysis experiments, as detailed in Table S1 (see ESM). Without impurity characterization, the amino acid analysis would overestimate the mass fraction values of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide, as impurities also contain the amino acids used for the amino acid analysis. Therefore, each impurity's contributions were subtracted from the amino acid analysis results (see ESM). The mass fraction value of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and its corresponding expanded uncertainty in the primary stock solution was 1206 ± 39 µg/g (coverage factor k = 2). The mass fraction value and the corresponding combined uncertainty of each impurity are summarized in Table S2 (see ESM).

3. Method optimization

Quantifying a protein at sub-microgram per liter level in a complex matrix is an analytical challenge, particularly without antibody-based enrichment. Therefore, the method optimization should be carried out rigorously for each step of the protocol from sample preparation to LC-MS/MS analysis to reduce any material loss that may occur during the sample preparation, to increase the protein extraction and proteolysis yield, to increase the extraction efficiency of the subsequent tryptic peptides of interest and to decrease the interferences.

i. Sample preparation and tryptic digestion optimization

The first step to be optimized to increase the method's sensitivity is protein extraction from the complex matrix. Protein precipitation or solid-phase extraction are some of the most common techniques to deplete the serum matrix before protein digestion. The extraction and isolation of the protein of interest are improved after protein denaturation. Chemical agents such as urea, thiourea, or guanidine and detergents such as CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate) or SDC are common additives for protein denaturation. However, one of the major limitations of detergent is its negative impact on LC-MS analytical performances. A high concentration of urea/thiourea/guanidine could reduce trypsin activity or introduce chemical modifications during proteolysis (e.g., carbamylation) [31]. Among the detergents, SDC was reported to improve protein denaturation and solubilization, enhancing the number of detected proteins [31–35]. The SDC detergent could be easily eliminated from the sample solution with acidic precipitation.

Moreover, it has been shown that SDC at a concentration below 1% does not compromise the tryptic digestion efficiency compared to other detergents or chaotropic agents such as guanidine [32,36]. Adding SDC before the sample preparation to improve PCT detection was further investigated to determine the optimal amount of SDC useful for protein denaturation. Fig. 4a shows that the addition of SDC ranging from 0.25% to 1.25% in serum samples increases the LC-MS/MS signal of the two targeted PCT peptides by at least 1.7-fold compared to sample preparation conditions without using SDC, with a maximum of 2.8-fold reached with 0.5% SDC (v/v). This condition was finally selected for protein denaturation.

The broad dynamic range of proteins in serum and the sample matrix complexity were first decreased with a solid phase extraction (SPE). By differencing proteins according to their physicochemical characteristics, SPE successfully separated the protein of interest and reduced sample complexity to quantify low abundant proteins in a complex matrix [10,13,37–39]. Bronsema and colleagues efficiently employed HLB SPE cartridge to achieve high sensitivity to quantify calcitonin, a proteolyzed PCT product, at pg/mL concentration starting from 500 µL of plasma [10]. Accordingly, after evaluating different SPE phases (see ESM Fig. S5), we integrated the HLB SPE approach in the sample preparation procedure and optimized PCT elution conditions. An additional step of purification was implemented to reduce the complexity of the final solution injected on the LC column. The protein acetonitrile precipitation is a technique to deplete serum proteins, especially high-molecular-weight proteins [40,41]. The partial acetonitrile precipitation allowed achieving a very low LOQ of interferon-gamma-inducible protein-10 at the picomolar level [12]. We compared different acetonitrile contents (30%, 50%, and 70% in water (v/v)) to improve PCT peptides detection and to reduce the complexity of the sample (Fig. 4b and see ESM Fig. S6). Protein precipitation with 50% acetonitrile and 0.5% SDC in water (v/v/v) showed the two PCT peptides' best signals. This result also confirmed the benefit of adding SDC to improve protein denaturation. When precipitation of proteins was performed with 70% (v/v) acetonitrile, most of the proteins precipitated, resulting in lower recovery of PCT peptides in the supernatant. Protein acidic precipitation induced a lower recovery of PCT peptides compared with the other conditions. This was also observed in other studies [41], especially for high-molecular weight proteins where the disruption of the hydration sphere surrounding the proteins is more important in acidic conditions by positively charging the protein. Even if the addition of a protein precipitation step did not show any significant improvement or degradation of the PCT-related peptide signals (Fig. 4b), this step considerably reduced the sample complexity and allowed removing interferences (see ESM Fig. S6). Thus, the protein precipitation step with 50% acetonitrile and 0.5% SDC in water (v/v/v) was included in the sample preparation protocol.

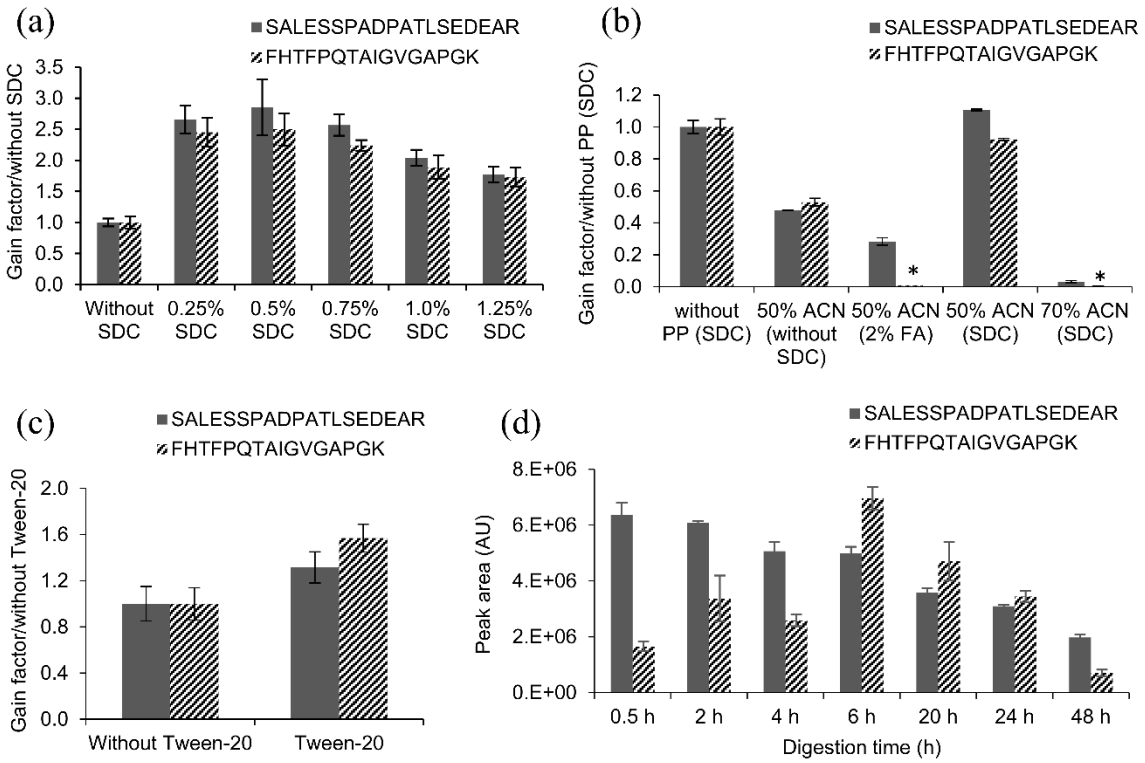


Fig. 4 *Protocol optimization for PCT quantification at sub-microgram per liter level. The results were obtained by analyzing two PCT related peptides by LC-MS/MS in a serum sample spiked with recombinant PCT*
(a) Optimization of the denaturation step with SDC. Different proportions of SDC ranging from 0.25% to 1.25% were evaluated in two processed replicates (N=2). The results are presented as the signal gain factor (peak area ratio) between the studied condition and the condition without SDC. The experiment was carried out without performing the protein precipitation step.
(b) Optimization of the protein precipitation (PP) step. Different acetonitrile contents with or without SDC were evaluated in two processed replicates (N=2). The results are presented as the signal gain factor (peak area ratio) between the studied condition and the condition without PP (SDC). (*) means that no signal was observed for FHTFPQTAIGVGAPGK peptide.
(c) Evaluation of the use of Tween-20 to assist the digestion step. The results are presented as the gain factor (peak area ratio) between the studied condition and the condition without using Tween-20, performed in three processed replicates (N=3).
(d) Kinetics of trypsin digestion from 500 µL of human serum spiked with recombinant PCT. Peak areas of the 2 PCT proteotypic peptides are reported for different digestion times (0.5h, 2h, 4h, 6h, 20h, 24h, and 48h). For each digestion time, the experiments were carried out once using the final sample preparation protocol in which only the digestion time varied. Samples were analysed three times. AU: Arbitrary Unit.

During the sample preparation, nonspecific hydrophobic adsorption of peptides on the microtube surface may occur and affect the quantification method's sensitivity. At the peptide level, several studies reported the ability of Tween-20 to prevent adsorption and to enhance peptides recovery [10,42–45]. Tween-20 is a non-ionic polysorbate surfactant and a gentle detergent that was not reported to affect trypsin activity [46]. Thus, Tween-20 can be added just before the digestion step to prevent peptide adsorption after their release without affecting trypsin efficiency. We evaluated the effect of Tween-20 on PCT-related peptides signals. Results are presented in Fig. 4c and show concordance with the literature. The addition of Tween-20 at a final proportion of 0.0001% before digestion

increased the PCT peptide signals by 1.3-fold for SALESSPADPATLSEDEAR peptide and 1.6-fold for FHTFPQTAIGVGAPGK peptide, compared to the condition without Tween-20. This increase was more important for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide, as this peptide is less hydrophilic (13% of hydrophilic residues) than the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (53% of hydrophilic residues). Thus, the addition of Tween-20 improves the peptide solubility and, thus, the recovery of these peptides. The digestion in the presence of this surfactant was retained for the quantification of PCT.

To accurately quantify a given protein in serum using a peptide-based calibration, complete digestion of the protein resulting in a 1:1 molar ratio between the resulting targeted proteotypic peptides and the original protein amounts is essential. Indeed, incomplete digestion will result in a negative bias between the actual amounts of the protein and the amounts of proteotypic peptides [34]. Thus, we evaluated the kinetics of the digestion of PCT in human serum. The results showed a maximum signal after 0.5 h for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and 6 h for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (Fig. 4d). The fact that optimal digestion times are not the same for the two peptides could result from the -KKR- residue chain, with three consecutive tryptic sites at the C-terminal side of the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide. A compromise between optimal conditions for the two peptides has to be made. Even though PCT concentration was determined by quantifying the SALESSPADPATLSEDEAR peptide, the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide was also monitored as a qualitative control to increase the specificity of the quantification. The lower sensitivity of the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide LC-MS/MS analysis due to its low solubility and the potential miss cleavage sites tend to favor the selection of digestion conditions optimal for this peptide. However, the SALESSPADPATLSEDEAR peptide intensity was 22% lower with a digestion time of 6 h compared with 0.5 h, explained by peptide degradation. A digestion time of 6 h was selected to enable using the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide as a qualitative control since it is required to identify the PCT intact form in human serum. To correct the negative bias in the quantification of SALESSPADPATLSEDEAR and also to take into account any material loss that could occur during sample preparation steps taking place before the addition of the SIL internal standard (e.g., protein precipitation by ACN, first SPE, peptide degradation), a correction factor was applied, as described hereafter.

ii. LC optimization

The high complexity of the matrix and high dynamic range of proteins concentration in serum may induce signal suppression due to the coelution of different peptides during LC-MS/MS analysis. Therefore, we need to resolve the peptides of interest and the proteolytic peptides from other proteins as much as possible. We optimized the LC gradient to improve peptides separation and decrease ionization suppression in the MS source (see ESM Fig. S7). Moreover, for the quantification of PCT, attention was also paid to the effect of different organic solvents and mobile phase additives on the MS response. Even if acetonitrile is the most commonly used organic solvent for peptide analysis by LC-MS, in our study, methanol allowed obtaining a better signal-to-noise ratio, with a sensitivity gain of up to 1.5-fold improvement (Fig. 5a). This observation was also previously reported [47,48] and could be explained by the high volatility of methanol compared to acetonitrile, facilitating the ion desolvation in the ESI source. In addition, we compared different concentrations of formic acid and acetic acid. The results presented in Fig. 5b indicate that 0.05 % (v/v) acetic acid content is the best compromise for detecting the two PCT-related peptides. This observation is in concordance with the literature, in which a low percentage of a weak acid was preferred with methanol [48]. Acetic acid, a weaker acid than formic acid (pKa 4.76 vs. 3.75), contributes to increasing peptide signals. A lower percentage of acetic acid (0.01%) limited the ionization efficiency of SALESSPADPATLSEDEAR peptide, which could not be detected at all anymore, while the signal of FHTFPQTAIGVGAPGK peptide reached its highest intensity. Indeed at the pH of mobile phases (pH = 4.6), the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (pH_I = 3.3) is mostly negatively charged, while the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide is present mainly in its positive forms (pH_I = 10.0).

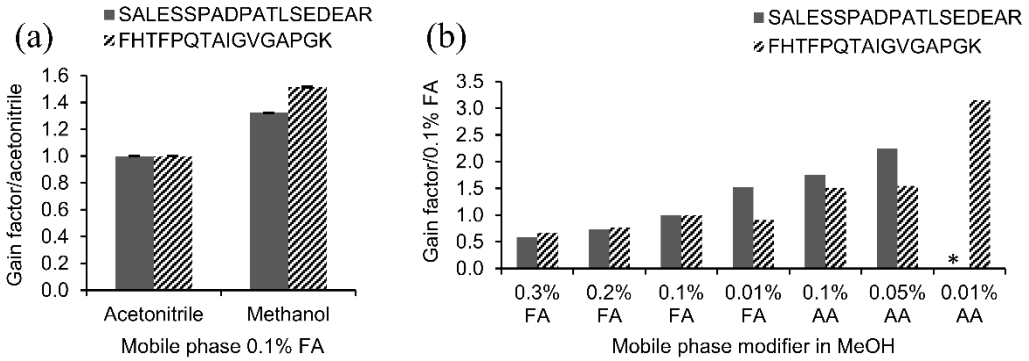


Fig. 5 *Optimization of LC mobile phases*

The results were obtained by analyzing PCT related peptides in a serum sample spiked with recombinant PCT using LC-MS/MS

(a) Comparaison between 0.1% FA in ACN and 0.1% FA in MeOH as organic mobile phase. The results are presented as the gain factor (peak area ratio) between the studied condition and the condition using acetonitrile taken as arbitrary reference. The experiment was performed in three processed replicates of serum samples (N=3). The relative standard bias was below 1.0%

(b) Comparison of different contents of formic acid (FA) or acetic acid (AA) in the mobile phase (% (v/v) in MeOH). The results are presented as the gain factor (peak area ratio) between the studied condition and the condition using 0.1% FA in MeOH

(*): at 0.01% AA in MeOH, no peptide signal was detected for SALESSPADPATLSEDEAR, because this peptide was mostly in anionic form

Moreover, MS conditions were also optimized in terms of MS source parameters and collision energy. The detailed data in MS optimization are presented in Fig. S8 (see ESM). The MS/MS spectra of the two selected peptides and their SIL standard peptide are shown in Fig. S9 (see ESM).

4. Evaluation of the method performance for the quantification of PCT in human serum using peptide-based calibration approach

i. Linearity

The linearity of the 6-point peptide-based calibration curve (corresponding PCT concentrations ranging between 0.092 µg/L and 5.222 µg/L) was established, with a regression coefficient above 0.9993. The average slope from three independent experiments was 0.9966 (intermediate precision = 0.5%). Residuals were randomly distributed around zero. The bias from the back-calculated concentrations of calibration samples ranged from -8.0 % to +3.9 % (Fig. 6). The detailed data are summarized in Table S3 (see ESM). The lowest concentration of the calibration range was 0.092 µg/L to cover any PCT or PCT-related peptide loss through the quantification process of PCT samples at 0.245 µg/L, corresponding to a clinical cut-off value.

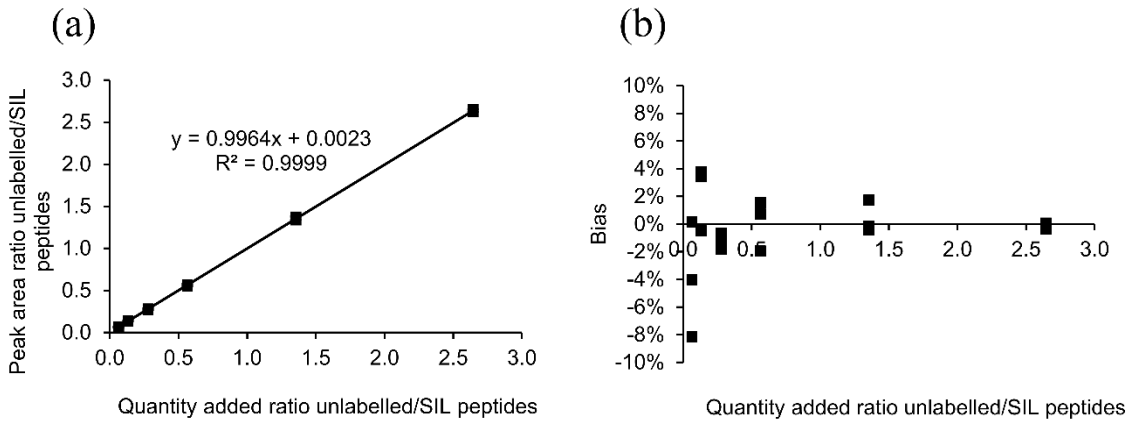


Fig. 6 *Six-point peptide-based calibration curve.*
(a) a linear relationship over the PCT concentration range of 0.092-5.222 µg/L (2.5 fmol to 125 fmol on-column) established by spiking unlabeled peptide and SIL-peptide (H) in the serum digest for quantifying PCT.
(b) the bias observed between the back-calculated concentration and the theoretical concentration at each concentration level
Points on the calibration curve are the values obtained from three independent experiments. The relative standard bias of each calibration point obtained from three independent experiments was below 10.1%. The linear regression's intercept was not significantly different from zero (P-value 0.509, rejecting hypothesis intercept different from zero)

ii. Trueness and precision for the quantification of the peptide in processed matrix

The trueness and precision were evaluated in intermediate precision conditions of measurement of peptide-based QC samples at two different concentrations (corresponding PCT concentration of 1.020 and 3.876 µg/L) in three processed replicates over three independent days. The results showed satisfying trueness and precision for the peptide-based QC samples. The intra-day bias and precision ranged from -2.6 % to 4.3 % and 0.4 % to 1.5 %. The inter-day bias and precision ranged from 1.1 % to 2.6 % and within ± 2.2 %, respectively. The data are detailed in Table S4 and S5 (see ESM).

iii. Trueness and precision for the quantification of the PCT

The trueness and precision were evaluated by analyzing PCT protein-based QC materials at four different concentrations (0.484, 0.912, 3.792, and 9.213 µg/L) in three processed replicates over two independent experiments. The results showed a satisfying precision. The intra-day precision ranged from 4.5 % to 14.7 %. The inter-day precision ranged from 9.7 % to 11.2 %. One sample was excluded on day 2 due to material loss during sample handling. Evaluation of the trueness shows a limited recovery of PCT. The mean total recovery from all replicates and all concentration levels of the optimized method was 38.1 % (%CV = 8.0 %) and 39.5 % (%CV = 12.3 %) for day 1 and day 2, respectively (Table 2). The mean total recovery from the two independent days was 38.8 % (%CV = 10.2 %).

Table 2. Determination of method's total recovery and the correction factor used to compensate for digestion incompleteness and material loss occurring before the addition of the internal standard using protein-based QC materials

	Theoretical spiked PCT concentration (µg/L)	Measured PCT concentration from SALESSPADPATLSEDEAR peptide quantification					
		Day 1			**Day 2**		
		Concentration (µg/L)	Total recovery (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)	Total recovery (%)	CV (%)
QC0	0.48	0.19	39.0		0.21	44.4	
QC0	0.48	0.18	36.4	9.3	0.17	34.9	13.2
QC0	0.48	0.21	43.4		0.18	36.4	
QC1	0.91	0.32	34.7		0.36	39.4	
QC1	0.91	0.37	40.8	9.2	0.37	40.2	14.7
QC1	0.91	0.37	40.9		0.28	30.5	
QC2	3.79	1.40	37.0		1.76	46.5	
QC2	3.79	1.52	40.0	4.5	NA	NA	38.3
QC2	3.79	1.52	40.2		1.01*	26.7	
QC3	9.21	3.04	33.0		3.91	42.5	
QC3	9.21	3.28	35.6	5.3	3.98	43.2	8.0
QC3	9.21	3.37	36.5		3.43	37.2	
Mean total recovery (%)			**38.1**			**39.5**	
CV (%)			8.0			12.3	
Correction factor			**2.64**			**2.57**	
SD			0.21			0.34	
CV (%)			8.1			13.2	
Final correction factor		**2.61**					
CV (%)		**10.4**					

(*) samples excluded due to the material loss during sample handling

5. Evaluation of the use of a correction factor for the quantification of PCT

The previous data show that even if the sample preparation process was rigorously optimized, the material loss remains high during different steps before SIL-peptide addition. These include protein precipitation, SPE protein extraction, and tryptic digestion. Interestingly, the negative bias of 22% due to sub-optimal digestion conditions for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (6 hours digestion time) only accounted for approximately one-third of recovery incompleteness. This demonstrates that other material losses occurring during the sample preparation steps are significant. Thus, a correction factor is required in any case, even with a digestion time of 0.5 hours. Although the peptide-based calibration approach is widely applied thanks to its ease of use and reduced cost [49–54], our results agree with a significant quantitative bias using this approach, as reported in other studies [55–57].

Although a correction factor allows taking into account material losses during the sample preparation, a prerequisite is that the correction factor should be robust enough and applicable to PCT quantification in any unknown sample over time. The reported mean total recovery was reproducible with a mean coefficient of variation of 10.4% through two independent experiments with four PCT concentration level samples processed in triplicate. These results support that a correction factor can successfully be applied to accurately quantify PCT in human serum with the peptide-based calibration approach. Therefore, a correction factor of 2.61 was used to correct the experimental bias.

The proposed method using a correction factor was finally applied in an independent experiment to quantify PCT spiked in serum samples at 0.245 µg/L, a clinical decision cut-off for diagnosis and antibiotic therapy monitoring in

sepsis and respiratory tract infection. The correction factor of 2.61 was applied to determine PCT concentration in the spiked samples at 0.245 µg/L in eight processed replicates. The bias and repeatability were -2.0% and 9.1%, respectively, which were lower than 20% as recommended by the guideline of bioanalytical method validation from FDA and EMA for quantification at the lowest concentration (Table 3) [26,27].

Fig. S10 shows PRM chromatograms of the two products of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide and their SIL-peptides by analyzing a pool of human serum obtained from healthy subjects and spiked with recombinant PCT at a concentration of 0.245 µg/L, corresponding to 2.5 fmol of each peptide injected on-column. No signal interfering with the signal of the peptides of interest or their SIL-peptides in human serum from healthy subjects could be detected. The coelution and same relative PRM peak area ratios across transitions between FHTFPQTAIGVGAPGK and its SIL-peptide confirmed the detection of PCT protein at 0.245 µg/L level.

Table 3. *Detailed data of PCT quantification at 0.245 µg/L in serum samples spiked with recombinant PCT using a peptide-based calibration curve with a correction factor*

	Theorical PCT concentration (µg/L)	Measured PCT concentration (µg/L)	Bias %	CV %
	0.245	0.251	2.6	**9.1**
		0.211	-13.9	
		0.263	7.5	
		0.225	-9.2	
		0.244	-0.5	
		0.213	-12.9	
		0.245	0.2	
		0.269	9.8	
Overall (N=8)	**0.245**	**0.240**	**-1.9**	

6. Method application: quantification of endogenous PCT in serum samples

The developed method was applied to analyze three patient sample pools to evaluate its suitability to measure endogenous PCT in unspiked patient samples. The results obtained by the ID-LC-MS/MS and the results obtained with the Kryptor Gold immunoassay are presented in Table 4. The precision, determined in intermediate precision conditions of measurement, for each patient pool sample was less than 7.1% (n=3), which is in concordance with the previous precision results.

The results obtained by the commercially available immunoassay Kryptor Gold were almost two-fold higher than those obtained by ID-LC-MS/MS (average relative difference of -54.3%, n=9, CV= 6.35%). It should be noticed that the difference between the immunoassay and the ID-LC-MS/MS method was consistent across the three materials that were measured with both methods, and an estimated coefficient of correlation of 0.996 was observed over only three concentration levels. This observed relative difference could first be explained by the difference of calibration system between the ID-LC-MS/MS method, and the compared immunoassay may have an impact. As both methods were not calibrated using the same calibrator(s), differences in the method used to determine the calibrators' concentration could induce a proportional bias between the two methods. Secondly, a lack of specificity of the immunoassay compared to the LC-MS technique in the presence of interferences from nonspecific binding of antibodies to compounds having a sequence close to PCT, while the ID-LC-MS/MS method exclusively measures the proteotypic peptides from PCT. However, such interferences are more related to random measurement error and may not explain a correlated systematic bias as the level of interference is unlikely to be proportional to the analyte

amount. However, in our study, the data were obtained from a restricted number of clinical samples, which may not represent the global situation over the whole PCT concentration range. A more extensive comparative study with a larger sample size, ideally individual samples, should be performed to confirm this observation.

Table 4. *Comparison between a commercially available immunoassay and the ID-LC-MS/MS method for three pools of human serum samples from patients suffering from sepsis*

	PCT concentration from the Kryptor Gold immunoassay measurements (µg/L)	PCT Concentration from ID-LC-MS/MS measurements (µg/L)	CV (%)	Relative difference between ID-LC-MS/MS and immunoassay (%)
	2.93	1.31		-55.3
Pool 1	2.93	1.37	7.1	-53.3
	2.93	1.50		-48.8
	6.48	2.79		-57.0
Pool 2	6.48	3.07	7.1	-52.6
	6.48	3.21		-50.5
	18.3	7.44		-59.3
Pool 3	18.3	7.71	5.9	-57.8
	18.3	8.34		-54.4

Relative difference = (ID-LC-MS/MS - immunoassay)/immunoassay x 100%

The large bias observed between ID-LC-MS/MS and immunoassays suggests that the same clinical decision limits cannot be used for both techniques. As it may be confusing for the medical community, this should be carefully considered and evaluated accurately.

Discussion

To our knowledge, only two analytical methods are described for the PCT quantification by LC-MS. Both involved immunocapture in sample preparation [23,24]. The current work proposed a method based on a thorough optimization of classical sample preparation techniques without using any antibody to quantify PCT at sub-microgram per liter level in human serum by µLC-MS. With a sample uptake of 500 µL of serum, a LOQ of 0.245 µg/L (about 20 pM) was achieved. This concentration is lower than the lower LOQ of 1.0 µg/L reported by Krastin *et al.*, in which 1 mL of serum/plasma sample was subject to an immunocapture enrichment at the protein level and the quantification involved a microflow LC system coupled with a triple quadrupole mass spectrometer. Recently, Dubois reported an analytical method to quantify PCT in serum with a LOQ of 0.1 µg/L starting from 100 µL of serum sample. In this work, the peptides separation was achieved on a capillary liquid chromatographic column of low diameter (300 µm) after immunoaffinity capture enrichment at the peptide level. Capillary flow LC or nanoflow LC systems allow obtaining low LOQ [13,44,58–60]. Indeed, the lower the chromatographic column's sectional area, the more concentrated the analyte and the higher the signal-to-noise ratio after electrospray ionization efficiency. However, nanoflow or capillary flow LC could often suffer from perfectible reproducibility of results when analyzing low abundant compounds in highly complex samples due to chromatographic overloading and the lack of stability of the ESI spray over time [61].

Moreover, the proposed method allows performing a targeted analysis with high robustness and specificity. Using antibodies with high specificity, modifications of the PCT sequence or side chains could affect the recognition between the antibody and the epitope, resulting in partial coverage of the total PCT content. Some forms of PCT are not recovered due to a potential antibody specificity restricted to a yet uncharacterized subset of PCT forms. It is expected that less specific techniques will reduce this phenomenon, but determining which forms of PCT are actually captured by antibodies or extracted by SPE is challenging. Although SPE used in the present method may

not capture 100% of all isoforms of a protein, SPE is considered less specific than immunoprecipitation. It is therefore expected that loss of protein modified forms, if any, will be less important than by immunoprecipitation. It is also expected that differences in specificity of the antibodies that could be caused by lot to lot variations will mitigate the risk that the same isoforms of PCT are not extracted if different lots of antibodies are used in the long run [62].

However, this work pointed out some limitations that may affect the application of this method. First, the specific sample preparation workflow involving numerous steps and the complete workflow duration compromises applying the method in clinical care where a rapid turnaround is needed to diagnose sepsis and monitor patients with antibiotic treatment.

From a metrological point of view, the need for reliable and comparable PCT measurement results is crucial for this clinically relevant protein biomarker [63]. There is currently no higher-order reference measurement procedure for the SI-traceable quantification of PCT in human serum. While the proposed method allows establishing metrological traceability of results to the SI units, the method was shown to have important limitations that compromise its use as a reference method.

In the proposed method, the quantification of PCT in human serum was performed using a peptide-based calibration. This strategy was described to be a suitable approach for absolute quantification of low abundant protein biomarkers and for medium/high abundance proteins with complex sample preparation [52,64,65]. However, in the present study, the quantification of protein-based QC materials (recombinant protein spiked in serum) evidenced the necessity to use a correction factor to quantify PCT in serum samples accurately. Even though the protein extraction recovery and tryptic digestion efficiency appear to be reproducible, the correction factor could be subject to some variations, e.g., in cases where digestion did not perform as usual and/or change reagents required in key steps of the sample preparation. Thus, the correction factor's validity should be monitored over time and between labs to confirm its robustness. In the perspective of a reference method for PCT, the use of such a correction factor appears as highly questionable, and a protein-based calibration should be preferred to a peptide-based calibration.

The specificity of the quantification with a peptide-based calibration approach relies on the SALESSPADPATLSEDEAR peptide because results based on the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide appear to be subject to variations of tryptic digestion completion. In healthy conditions, PCT is released in the bloodstream into three cleavage products: the N-terminal peptide NProCT (57 amino acids), the calcitonin (32 amino acids), and katacalcin (21 amino acids) [66]. In bacterial infectious conditions, PCT is released in the bloodstream into three forms: PCT (1-116), PCT (2-116), and PCT (3-116). The SALESSPADPATLSEDEAR peptide is located in the NProCT part of the sequence and the FHTFPQTAIGVGAPGK in the calcitonin-KKR-katacalcin part of the sequence (Fig. 2). Thus, the SALESSPADPATLSEDEAR peptide alone does not allow discriminating between full-length PCT forms and NProPCT, whereas using FHTFPQTAIGVGAPGK allows distinguishing between full-length PCT forms and calcitonin, katacalcin. Quantifying both FHTFPQTAIGVGAPGK and SALESSPADPATLSEDEAR peptides increases the specificity of the developed method for tPCT.

Despite these limitations, the presented work is still of interest. It presents a hyphenated sample preparation procedure and optimized LC-MS conditions allowing the quantification of PCT at sub-microgram per liter concentrations. To develop a candidate reference measurement procedure, the same sample preparation procedure could be applied to an ID-LC-MS/MS method using a protein-based calibration with a SI traceable recombinant protein primary calibrator and a SIL-protein as an internal standard should be investigated. A recombinant protein and its labeled analog would overcome all material loss and variation occurring during the whole workflow, particularly during the protein digestion step.

Conclusion

We developed a sensitive LC-MS/MS method to quantify PCT protein in human serum at a sub-microgram per liter level without using immunoaffinity capture enrichment. The method allowed the quantification of PCT concentration with a LOQ of 0.245 µg/L in human serum. PCT quantification was performed using a peptide-based calibration and a correction factor to overcome the bias caused by material loss occurring at the protein level (protein purification, tryptic digestion, protein/peptide adsorption, or degradation). The developed procedure was successfully applied to the quantification of endogenous PCT in three pools of clinical samples. This work established an alternative methodology to immunoaffinity capture enrichment and nano/capillary LC system for protein quantification at a sub-microgram per liter concentration in complex matrices.

Declarations

Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to declare that are relevant to the content of this article.

Availability of data and material: not applicable

Code availability: not applicable

Funding

This work was supported by the European Metrology Programme for Innovation and Research (EMPIR) joint research projects [15HLT07] "AntiMicroResist" and [18HLT03] "SEPTIMET" which have received funding from the EMPIR programme co-financed by the Participating States and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme. Huu-Hien Huynh and Maxence Derbez-Morin were supported by a CIFRE scholarship provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). Conseil Régional d'Île-de-France subsidized SMBP mass spectrometry equipment (Sesame 2010 No. 10022268).

Acknowledgements:

We would like to thank Dr. Qinde Liu and Dr. Yizhao Chen from Health Sciences Authority (HAS) of Singapore for scientific discussions.

References:

1. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. Mol Syst Biol. 2017;13:942.
2. Watts R. Trends and outlook for clinical diagnostics testing. https://sciex.com/Documents/brochures/clinical_diagnostics_trends2015.pdf. Accessed on 04/12/2020.
3. Antonelli G, Marinova M, Artusi C, Plebani M. Mass spectrometry or immunoassay: est modus in rebus. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1243–5.
4. van den Ouweland JMW, Kema IP. The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. J Chromatogr B. 2012;883–884:18–32.
5. Marinova M, Artusi C, Brugnolo L, Antonelli G, Zaninotto M, Plebani M. Immunosuppressant therapeutic drug monitoring by LC-MS/MS: Workflow optimization through automated processing of whole blood samples. Clin Biochem. 2013;46:1723–7.
6. Antonelli G, Marinova M, Artusi C, Plebani M. Mass spectrometry or immunoassay: est modus in rebus. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1243–5.
7. Hortin GL, Sviridov D. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. J Proteomics. 2010;73:629–36.
8. Neubert H, Shuford CM, Olah TV, Garofolo F, Schultz GA, Jones BR, et al. Protein Biomarker Quantification by Immunoaffinity Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Current State and Future Vision. Clin Chem. 2020;66:282–301.
9. Szapacs ME, Urbanski JJ, Kehler JR, Wilson R, Boram SL, Hottenstein CS, et al. Absolute quantification of a therapeutic domain antibody using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry and immunoassay. Bioanalysis. 2010;2:1597–608.
10. Bronsema KJ, Bischoff R, van de Merbel NC. High-sensitivity LC-MS/MS quantification of peptides and proteins in complex biological samples: the impact of enzymatic digestion and internal standard selection on method performance. Anal Chem. 2013;85:9528–35.
11. Bailly-Chouriberry L, Cormant F, Garcia P, Kind A, Popot M-A, Bonnaire Y. Identification of α-Cobratoxin in Equine Plasma by LC-MS/MS for Doping Control. Anal Chem. 2013;85:5219–25.
12. Zhang H, Xiao Q, Xin B, Trigona W, Tymiak AA, Dongre AR, et al. Development of a highly sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to quantify total and free levels of a target protein, interferon-gamma-inducible protein-10, at picomolar levels in human serum. Rapid Commun Mass Spectrom. 2014;28:1535–43.
13. Klont F, Joosten MR, Ten Hacken NHT, Horvatovich P, Bischoff R. Quantification of the soluble Receptor of Advanced Glycation End-Products (sRAGE) by LC-MS after enrichment by strong cation exchange (SCX) solid-phase extraction (SPE) at the protein level. Anal Chim Acta. 2018;1043:45–51.
14. Valdés A, Lewitt M, Wiss E, Ramström M, Strage EM. Development of a Parallel Reaction Monitoring-MS Method To Quantify IGF Proteins in Dogs and a Case of Nonislet Cell Tumor Hypoglycemia. J Proteome Res. 2019;18:18–29.
15. Torma AF, Groves K, Biesenbruch S, Mussell C, Reid A, Ellison S, et al. A candidate liquid chromatography mass spectrometry reference method for the quantification of the cardiac marker 1-32 B-type natriuretic peptide. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1397–406.
16. Owusu BY, Pflaum H, Garner R, Foulon N, Laha TJ, Hoofnagle AN. Development and validation of a novel LC-MS/MS assay for C-peptide in human serum. J Mass Spectrom Adv Clin Lab. 2021;19:1–6.
17. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. J Lab Clin Med. 1999;134:49–55.
18. Vijayan AL, Vanimaya, Ravindran S, Saikant R, Lakshmi S, Kartik R, et al. Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. J Intensive Care. 2017;5:51.
19. Müller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. Swiss Med Wkly. 2001;131:595–602.
20. Sager R, Kutz A, Mueller B, Schuetz P. Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited. BMC Med. 2017;15:15.
21. Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, Ferrer R, Gavazzi G, Gluck EH, et al. Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use. Clin Chem Lab Med. 2019;57:1308–18.

22. Schuetz P, Albrich W, Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. BMC Med. 2011;9:107.
23. Krastins B, Prakash A, Sarracino DA, Nedelkov D, Niederkofler EE, Kiernan UA, et al. Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum. Clin Biochem. 2013;46:399–410.
24. Dubois C. Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides. Doctoral Thesis. Université Paris-Saclay; 2019.
25. Josephs RD, Martos G, Li M, Wu L, Melanson JE, Quaglia M, et al. Establishment of measurement traceability for peptide and protein quantification through rigorous purity assessment—a review. Metrologia. 2019;56:044006.
26. EMA. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. Accessed on 10/17/2020.
27. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed on 01/10/2020.
28. Siepen JA, Keevil E-J, Knight D, Hubbard SJ. Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics. J Proteome Res. 2007;6:399–408.
29. Lawless C, Hubbard SJ. Prediction of Missed Proteolytic Cleavages for the Selection of Surrogate Peptides for Quantitative Proteomics. J Integr Biol. 2012;16:449–56.
30. Hoofnagle AN, Whiteaker JR, Carr SA, Kuhn E, Liu T, Massoni SA, et al. Recommendations for the generation, quantification, storage and handling of peptides used for mass spectrometry-based assays. Clin Chem. 2016;62:48–69.
31. Lau BYC, Othman A. Evaluation of sodium deoxycholate as solubilization buffer for oil palm proteomics analysis. PLoS One. 2019;14:e0221052.
32. Lin Y, Zhou J, Bi D, Chen P, Wang X, Liang S. Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. Anal Biochem. 2008;377:259–66.
33. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J Proteome Res. 2008;7:731–40.
34. León IR, Schwämmle V, Jensen ON, Sprenger RR. Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis. Mol Cell Proteomics. 2013;12:2992–3005.
35. Shahinuzzaman ADA, Chakrabarty JK, Fang Z, Smith D, Kamal AHM, Chowdhury SM. Improved in-solution trypsin digestion method for methanol–chloroform precipitated cellular proteomics sample. J Sep Sci. 2020;43:2125–32.
36. Porter C. Comparison of commercial LC MS/MS compatible detergents with sodium deoxycholate for shorgun proteomics. J Proteins Proteomics. 2014;5:151–61.
37. Ji QC, Rodila R, Gage EM, El-Shourbagy TA. A Strategy of Plasma Protein Quantitation by Selective Reaction Monitoring of an Intact Protein. Anal Chem. 2003;75:7008–14.
38. Bros P, Vialaret J, Barthelemy N, Delatour V, Gabelle A, Lehmann S, et al. Antibody-free quantification of seven tau peptides in human CSF using targeted mass spectrometry. Front Neurosci. 2015;9:302.
39. Torma AF, Groves K, Biesenbruch S, Mussell C, Reid A, Ellison S, et al. A candidate liquid chromatography mass spectrometry reference method for the quantification of the cardiac marker 1-32 B-type natriuretic peptide. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1397–406.
40. Fernández C, Santos HM, Ruíz-Romero C, Blanco FJ, Capelo-Martínez J-L. A comparison of depletion versus equalization for reducing high-abundance proteins in human serum. Electrophoresis. 2011;32:2966–74.
41. Wilffert D, Bischoff R, van de Merbel NC. Antibody-free workflows for protein quantification by LC–MS/MS. Bioanalysis. 2015;7:763–79.
42. Feng M, Morales AB, Poot A, Beugeling T, Bantjes A. Effects of Tween 20 on the desorption of proteins from polymer surfaces. J Biomater Sci Polym Ed. 1995;7:415–24.
43. Erde J, Loo RRO, Loo JA. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. J Proteome Res. 2014;13:1885–95.
44. Such-Sanmartín G, Bache N, Bosch J, Gutiérrez-Gallego R, Segura J, Jensen ON. Detection and differentiation of 22 kDa and 20 kDa Growth Hormone proteoforms in human plasma by LC-MS/MS. Biochim Biophys Acta. 2015;1854:284–90.

45. Olinares PDB, Dunn AD, Padovan JC, Fernandez-Martinez J, Rout MP, Chait BT. A robust workflow for native mass spectrometric analysis of affinity-isolated endogenous protein assemblies. Anal Chem. 2016;88:2799–807.
46. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html. Accessed on 04/10/2020.
47. Giorgianni F, Cappiello A, Beranova-Giorgianni S, Palma P, Trufelli H, Desiderio DM. LC−MS/MS Analysis of Peptides with Methanol as Organic Modifier: Improved Limits of Detection. Anal Chem. 2004;76:7028–38.
48. Gangnus T, Burckhardt BB. Improving sensitivity for the targeted LC-MS/MS analysis of the peptide bradykinin using a design of experiments approach. Talanta. 2020;218:121134.
49. Pan S, Aebersold R, Chen R, Rush J, Goodlett DR, McIntosh MW, et al. Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications. J Proteome Res. 2009;8:787–97.
50. Cao J, Gonzalez-Covarrubias V, Covarrubias VM, Straubinger RM, Wang H, Duan X, et al. A rapid, reproducible, on-the-fly orthogonal array optimization method for targeted protein quantification by LC/MS and its application for accurate and sensitive quantification of carbonyl reductases in human liver. Anal Chem. 2010;82:2680–9.
51. Dittrich J, Adam M, Maas H, Hecht M, Reinicke M, Ruhaak LR, et al. Targeted On-line SPE-LC-MS/MS Assay for the Quantitation of 12 Apolipoproteins from Human Blood. Proteomics. 2018;18:1700279.
52. Wagner R, Dittrich J, Thiery J, Ceglarek U, Burkhardt R. Simultaneous LC/MS/MS quantification of eight apolipoproteins in normal and hypercholesterolemic mouse plasma. J Lipid Res. 2019;60:900–8.
53. Gomez-Zepeda D, Taghi M, Smirnova M, Sergent P, Liu W-Q, Chhuon C, et al. LC–MS/MS-based quantification of efflux transporter proteins at the BBB. J Pharm Biomed Anal. 2019;164:496–508.
54. Hober A, Edfors F, Ryaboshapkina M, Malmqvist J, Rosengren L, Percy AJ, et al. Absolute Quantification of Apolipoproteins Following Treatment with Omega-3 Carboxylic Acids and Fenofibrate Using a High Precision Stable Isotope-labeled Recombinant Protein Fragments Based SRM Assay. Mol Cell Proteomics. 2019;18:2433–46.
55. Duan X, Abuqayyas L, Dai L, Balthasar JP, Qu J. High-throughput Method Development for Sensitive, Accurate and Reproducible Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Tissues Using Orthogonal Array Optimization and Nano-LC/SRM-MS. Anal Chem. 2012;84:4373–82.
56. Duan X, Dai L, Chen S-C, Balthasar JP, Qu J. Nano-scale Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and On-the-fly Orthogonal Array Optimization for Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibodies and the Application in Preclinical Analysis. J Chromatogr A. 2012;1251:63–73.
57. Nouri-Nigjeh E, Zhang M, Ji T, Yu H, An B, Duan X, et al. Effects of calibration approaches on the accuracy for LC-MS targeted quantification of therapeutic protein. Anal Chem. 2014;86:3575–84.
58. Adrait A, Lebert D, Trauchessec M, Dupuis A, Louwagie M, Masselon C, et al. Development of a Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ^{TM}) assay for the quantification of Staphylococcus aureus enterotoxin A in serum. J Proteomics. 2012;75:3041–9.
59. Klont F, Pouwels SD, Hermans J, van de Merbel NC, Horvatovich P, ten Hacken NHT, et al. A fully validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of the soluble receptor of advanced glycation end-products (sRAGE) in serum using immunopurification in a 96-well plate format. Talanta. 2018;182:414–21.
60. Wilffert D, Donzelli R, Asselman A, Hermans J, Govorukhina N, Ten Hacken NH, et al. Quantitative antibody-free LC-MS/MS analysis of sTRAIL in sputum and saliva at the sub-ng/mL level. J Chromatogr B. 2016;1032:205–10.
61. Bian Y, Zheng R, Bayer FP, Wong C, Chang Y-C, Meng C, et al. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS. Nat Commun. 2020;11:157.
62. Böttcher S, van der Velden VHJ, Villamor N, Ritgen M, Flores-Montero J, Escobar HM, et al. Lot-to-lot stability of antibody reagents for flow cytometry. J Immunol Methods. 2019 Dec 1;475:112294.
63. Huynh H-H, Bœuf A, Vinh J, Delatour V, Delatour V, Bœuf A, et al. Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: Activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders. Clin Chim Acta. 2021;515:111–21.
64. Suraj J, Kurpińska A, Olkowicz M, Niedzielska–Andres E, Smolik M, Zakrzewska A, et al. Development, validation and application of a micro–liquid chromatography–tandem mass spectrometry based method for simultaneous quantification of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in murine plasma. J Pharm Biomed Anal. 2018;149:465–74.

65. Suraj J, Kurpińska A, Sternak M, Smolik M, Niedzielska-Andres E, Zakrzewska A, et al. Quantitative measurement of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in plasma by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on stable isotope dilution method. Talanta. 2019;194:1005–16.
66. Becker KL, Nylén ES, White JC, Müller B, Snider RH. Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:1512–25

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin in human serum at sub-microgram per liter level using a peptide-based calibration

Huu-Hien Huynh, Amandine Bœuf, Maxence Derbez-Morin, Anne-Marie Dupuy, Béatrice Lalère, Vincent Delatour, Joëlle Vinh

Determination of mass fraction of the main peptide and its peptide impurities in the stock solution……..…..2

List of tables:

Table S1. AAA results from the SALESSPADPATLSEDEAR primary stock solution obtained from three separate experiments of gas-phase hydrolysis. 285
Table S2. Purity analysis of SALESSPADPATLSEDEAR with identification and quantification of peptide-based related impurities present in the primary stock solution as confirmed by LC-HRMS/MS and quantified by LC-HRMS.....286
Table S3. Calibration curve values of the three days method validation presenting the Pearson correlation coefficient, the linear slope, intercept, and the bias between the back-calculated concentration and the theoretical concentration of each calibrator point. 287
Table S4. Intra-day bias and precision results for two quality control levels in each validation experiment. The experiment was performed in three processed replicates per concentration level over three independent days.....287
Table S5. Inter-day bias and precision results for two quality control levels from 3 independent experiments of the method validation. Each experiment was performed in three processed replicates per concentration level.....288

List of figures:

Fig. S1 Amino acid sequence of PCT (UniProtKB database entry P01258). 288
Fig. S2 MS/MS spectrum of the main peptide SALESSPADPATLSEDEAR at m/z 973.4469 (z=2).....289
Fig. S3 Determination of the correction factor for the quantification of PCT from a patient sample using a peptide-based calibration (a copy of graphical abstract). 291
Fig. S4 LC-MS TIC chromatograms of the SIL-peptide with 160 ng peptide in buffer injected on the column.....292
Fig. S5 Comparison of different types of solid-phase extraction (SPE) cartridges at the protein level.....293
Fig. S6 Total ion chromatogram (TIC) PRM signal of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (charge state +2) and FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (charge state +3) obtained from a serum sample with a PCT concentration of 20 ng/mL without protein precipitation by ACN (A and B) or with protein precipitation in 50% ACN (C and D) between SDC addition and SPE extraction in the sample preparation workflow. 294
Fig. S7 Influence of LC gradient of mobile phase solvent B (MeOH, 0.1% FA) on the intensity of peptide signals296
Fig. S8 Optimization of MS parameters for the two selected peptides. 297
Fig. S9 Higher energy collisional dissociation spectra of the two selected peptides and their SIL standard peptide. 298
Fig. S10 Extracted ion chromatograms (XIC) of monitored transitions of SALESSPADPATLSEDEAR (charge state +2) and FHTFPQTAIGVGAPGK (charge state +3) peptides and their corresponding SIL-peptides.....299

Determination of mass fraction of the main peptide and its peptide impurities in the stock solution (1,2)

The concentrations of the main peptide (C^{SALES}) and of peptide impurity ($C^{impurity\ i}$) were expressed in µmol/g (quantity of peptide in µmol per 1 g of stock solution).

The concentration of impurities was estimated by the peak area ratio between the impurity and the main peptide ($R_{area}^{impurity\ i}$) and LCMS response factor ($F_{r)}$ compared to the main peptide:

$$C^{impurity\ i} = C^{SALES} * R_{area}^{impurity\ i} * F_r$$

The concentrations of amino acid produced by the main peptide (C_{AA}^{SALES}) and the peptide impurities ($C_{AA}^{impurity\ i}$) were calculated by taking into account the number of studied amino acid in the peptide sequence (N_{AA}^{SALES} or $N_{AA}^{impurity\ i}$):

$$C_{AA}^{SALES} = C^{SALES} * N_{AA}^{SALES}$$

$$C_{AA}^{impurity\ i} = C^{impurity\ i} * N_{AA}^{impurity\ i} = C^{SALES} * R_{area}^{impurity\ i} * F_r * N_{AA}^{impurity\ i}$$

The concentration of amino acid measured by amino acid analysis ($C_{AA}^{measured}$) is the total concentration of a given amino acid produced by the main peptide (C_{AA}^{SALES}) and all peptide impurities ($C_{AA}^{impurity\ i}, n\ impurities$), for each amino acid:

$$C_{AA}^{measured} = C_{AA}^{SALES} + \sum_{i=1}^{n} C_{AA}^{impurity\ i}$$

$$C_{AA}^{measured} = C^{SALES}\ x\ (N_{AA}^{SALE} + \sum_{i=1}^{n} R_{area}^{impurity\ i} * F_r * N_{AA}^{impurity\ i})$$

The concentration of the main peptide was then calculated as follows:

$$C^{SALES} = \frac{C_{AA}^{measured}}{N_{AA}^{SALE} + \sum_{i=1}^{n} R_{area}^{impurity\ i} * F_r * N_{AA}^{impurity\ i}}$$

The mass fraction of the main peptide (FM^{SALES}) expressed in µg/g was calculated using its mass weight (MW^{SALES}):

$$FM^{SALES} = C^{SALES} * MW^{SALES}$$

The mass fraction of the peptide impurities ($FM^{impurity\ i}$) expressed in µg/g was calculated using its mass weight ($MW^{impurity\ i}$):

$$FM^{impurity\ i} = C^{impurity\ i} * MW^{impurity\ i}$$

After determining the mass fraction of the main peptide and the peptide impurities from each selected amino acid, the final mass fraction of the main peptide and the peptide impurities was the average of all mass fraction obtained from each amino acid.

References:

1. Josephs R.D., et al. Metrologia, 2019, 56: 044006
2. Bros P. et al, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409: 2559-2567

Table S1. AAA results from the SALESSPADPATLSEDEAR primary stock solution obtained from three separate experiments of gas-phase hydrolysis.
The experiment was performed in three processed replicates per day over three independent days.

	Pro	Leu	Ala
Average raw amount of amino acid (mmol/g)	1.262	1.267	2.567
Average amount of amino acid (mmol/g) after impurity correction	1.228	1.240	2.499
Concentration of standard peptide (pmol/g)		620,000	
Concentration of standard peptide (µg/g)		1206	
Expanded uncertainty (k=2)		39	
Relative expanded uncertainty (k=2)		3.3%	

Table S2. Purity analysis of SALESSPADPATLSEDEAR with identification and quantification of peptide-based related impurities present in the primary stock solution as confirmed by LC-HRMS/MS and quantified by LC-HRMS

Code	Standard peptide and its impurities	RT (min)	Measured m/z	Calculated m/z	Mass error (ppm)	MS/MS confirmation	Estimated mass fraction (µg/g) (*)	Expanded uncertainty (k=2)	Expanded uncertainty relative (k=2)	Relative mass fraction
	SALESSPADPATLSEDEAR	22.74	1944.8933	1944.8912	1.08	Y	1206	39	3.3%	97.36%
I1	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 1	16.13	-	-	-	Y	2.4	2.2	92.4%	0.20%
I2	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 2	17.62	-	-	-	Y	1.7	1.6	92.4%	0.14%
I3	SALESSPADPATLSEDEAR isomer 3	22.51	-	-	-	Y	3.0	2.3	113.3%	0.24%
I4	PATLSEDEAR	2.48	1087.515	1087.5146	0.37	Y	7.8	7.2	92.4%	0.11%
I5	SALESSPAD	5.35	875.3885	875.3872	1.48	Y	1.3	1.2	92.5%	0.63%
I6	SALESSPAPATLSEDEAR	20.29	1829.8648	1829.8643	0.27	Y	2.4	2.2	92.4%	0.19%
I7	1916.8956 (-27.9983) (**)	21.51	1916.8956	-	-	-	2.6	2.4	92.4%	0.21%
I8	SALESSPDPATLSEDEAR / SALESSPADPTLSEDEAR	20.26-21.82	1873.8526	1873.8541	-0.80	Y	1.8	1.7	92.4%	0.15%
I9	SSALESSPADPATLSEDEAR	23.01	2031.9229	2031.9232	-0.15	Y	1.3	1.2	92.4%	0.10%
I10	SALESSPADPATLSDEAR / SALSSPADPATLSEDEAR	22.63	1815.8460	1815.8486	-1.43	Y	4.7	4.4	93.0%	0.38%
I11	SAALESSPADPATLSEDEAR	23.04	2015.9288	2015.9283	0.25	Y	1.8	1.6	92.7%	0.14%
I12	N-acetyl-PADPATLSEDEAR	26.85	1412.6461	1412.6419	2.97	Y	1.9	1.8	92.4%	0.16%

(*) The estimated amount was obtained by the extracted peak area (5 ppm mass error), assuming that all impurities have the same response factor in LC-HRMS analysis with an uncertainty of 80% of the response factor. Isobaric peptides (impurities I1, I2, and I3) represent analogues of the main peptide containing Ile instead of Leu. (**) Unidentified modification of the amino acid in N-terminus.

Table S3. *Calibration curve values of the three days method validation presenting the Pearson correlation coefficient, the linear slope, intercept, and the bias between the back-calculated concentration and the theoretical concentration of each calibrator point.*
The peptide signal was estimated using the sum of the peak area of the two most intense fragments (y_{13}^{+} and y_{10}^{+}).

		Theoretical concentration (µg/L)	Day 1	Day 2	Day 3	CV (%)
R^2			0.9997	0.9999	0.9992	
Slope			0.9983	1.0000	0.9909	0.5%
Intercept			-0.0004	0.0067	0.0005	
Bias (%)	Level 1	0.092	-4.0	0.2	-8.2	10.1
	Level 2	0.224	3.4	-0.5	3.8	0.9
	Level 3	0.561	-1.8	-0.7	-1.4	2.2
	Level 4	1.061	-2.0	0.7	1.5	2.1
	Level 5	2.601	1.7	-0.2	-0.5	1.4
	Level 6	5.222	-0.4	0.0	0.1	0.6

Table S4*. Intra-day bias and precision results for two quality control levels in each validation experiment. The experiment was performed in three processed replicates per concentration level over three independent days.*

Day 1				**Day 2**				**Day 3**			
Concentration (µg/L)		Bias (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)		Bias (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)		Bias (%)	CV (%)
Theoretical	Experimental			Theoretical	Experimental			Theoretical	Experimental		
0.986	1.003	1.7		1.001	1.014	1.3		0.996	1.038	4.3	
1.003	1.029	2.6	0.9	0.994	1.013	1.8	0.4	0.988	1.016	2.9	1.5
1.000	1.036	3.6		0.953	0.967	1.4		0.901	0.939	4.1	
3.787	3.809	0.6		3.697	3.600	-2.6		3.629	3.690	1.7	
3.770	3.864	2.5	1.0	3.475	3.465	-0.3	1.2	3.532	3.650	3.4	0.5
3.795	3.835	1.1		3.041	3.011	-1.0		3.520	3.669	4.3	

CV of three processed replicates was determined based on the measured concentration normalized to theoretical concentration obtained by weighting.

Table S5. Inter-day bias and precision results for two quality control levels from 3 independent experiments of the method validation. Each experiment was performed in three processed replicates per concentration level.

Level 1				Level 2			
Concentration (µg/L)		Bias	CV	Concentration (µg/L)		Bias	CV
Theoretical	Experimental			Theoretical	Experimental		
0.986	1.003			3.787	3.809		
1.003	1.029			3.770	3.864		
1.000	1.036			3.795	3.835		
1.001	1.014			3.697	3.600		
0.994	1.013	2.6%	1.1%	3.475	3.465	1.1%	2.2%
0.953	0.967			3.041	3.011		
0.996	1.038			3.629	3.690		
0.988	1.016			3.532	3.650		
0.901	0.939			3.520	3.669		

%CV and bias of three processed replicates over three independent days was determined based on the measured concentration normalized to theoretical concentration obtained by weighting

APFRSALESS PADPATLSED EARLLLAALV QDYVQMKASE

LEQEQEREGS SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT

FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD LERDHRPHVS MPQNAN

Fig. S1 *Amino acid sequence of PCT (UniProtKB database entry P01258).*

PCT is released in the bloodstream into three forms: NProCT (in green), calcitonin (in blue), and katacalcin (in red). The two selected signature peptides SALESSPADPATLSEDEAR (quantitative peptide) and FHTFPQTAIGVGAPGK (qualitative peptide) for PCT quantification are underlined. SALESSPADPATLSEDEAR peptide was selected to quantify the PCT protein, while FHTFPQTAIGVGAPGK peptide was used as a qualitative control to confirm the detection of the PCT.

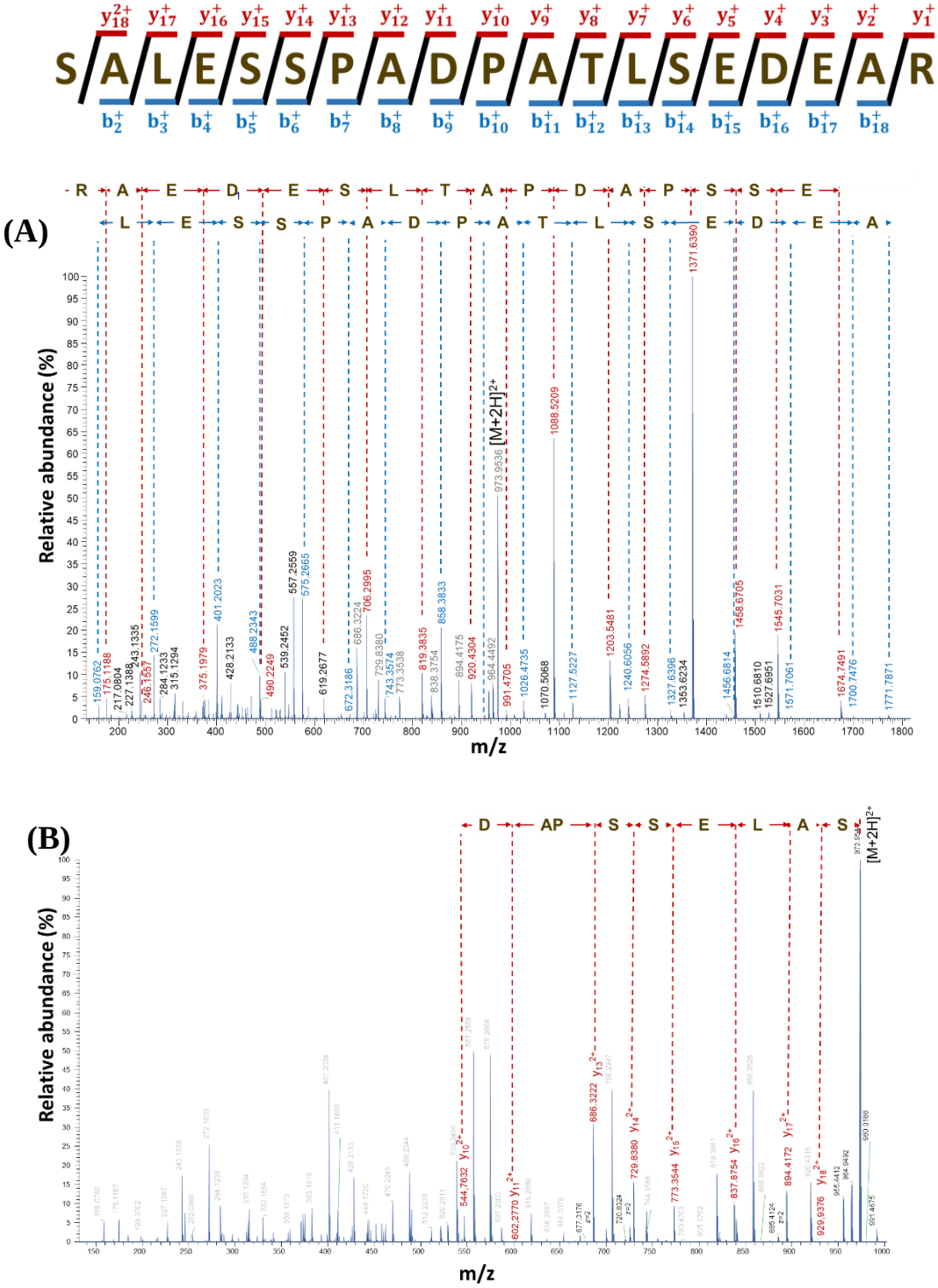


Fig. S2 *MS/MS spectrums of the main peptide SALESSPADPATLSEDEAR at m/z 973.4469 (z=2).*

(A) Fullscale MS/MS spectrum with singly charged product ions, y type in red, b type in blue. Doubly charged product ions are annotated in grey.

(B) MS/MS spectrum enlarged over 450-1000 m/z showing doubly charged y type product ions in red. Singly charged product ions are annonated in grey.

Based on the MS/MS data, evaluation of whole y type product ions series (singly and doubly charged) demonstrated the sequence coverage of 100%. The high-resolution, high-accuracy HCD profile was acquired with a Q Exactive Focus Instrument in the ESI+ mode at collision energy 36 eV. The fragmentation profile was obtained by direct infusion of the standard peptide solution in buffer.

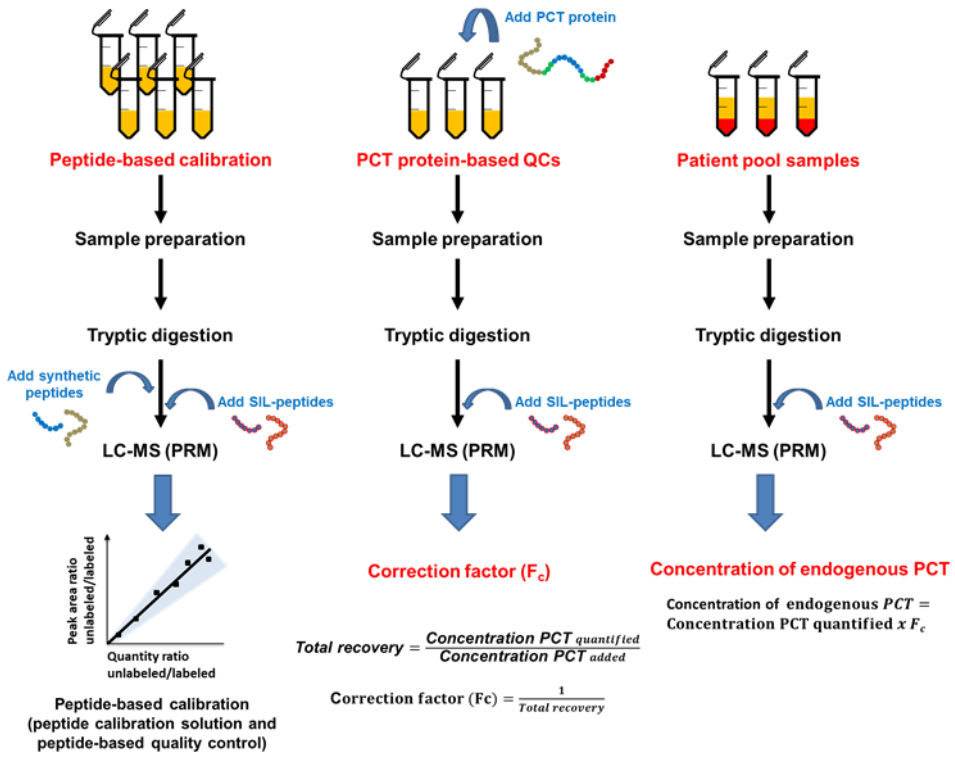
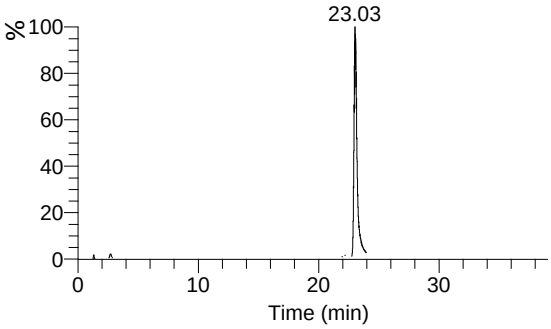
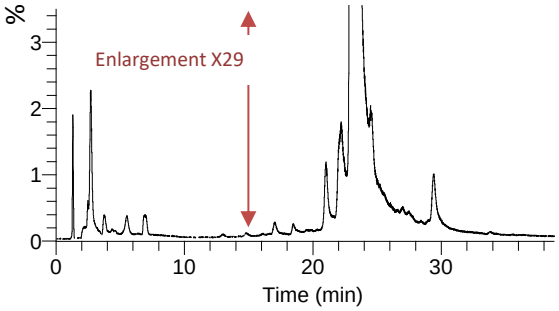


Fig. S3 *Determination of the correction factor for the quantification of PCT from a patient sample using a peptide-based calibration (a copy of graphical abstract).*

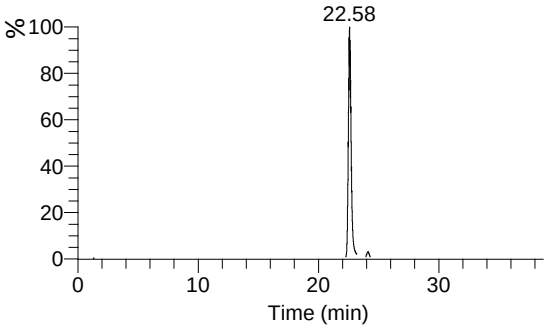
(A). SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R



(B). SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R with 29X magnification



(C). FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK



(D). FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK with 29X magnification

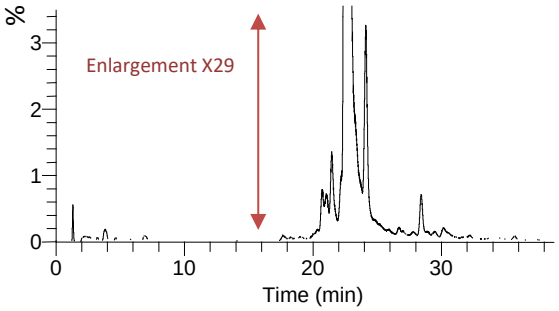


Fig. S4 *LC-MS TIC chromatograms of the SIL-peptide with 160 ng peptide in buffer injected on the column.*

(A) LC-MS chromatogram of the SALESSPADPATLSEDEA($^{13}C_3$,^{15}N)R SIL-peptide, (B) 29X magnified LC-MS chromatogram of the SALESSPADPATLSEDEA($^{13}C_3$,^{15}N)R SIL-peptide, (C) LC-MS chromatogram of the FHTFPQTAIGVGAP($^{13}C_5$,^{15}N)GK SIL-peptide, and (D) 29X magnified LC-MS chromatogram of the FHTFPQTAIGVGAP($^{13}C_5$,^{15}N)GK SIL-peptide. The presence of the unlabeled peptide in the SIL-peptide solution was 4.5E-4 % for SALESSPADPATLSEDEA($^{13}C_3$,^{15}N)R and 3E-4 % for FHTFPQTAIGVGAP($^{13}C_5$,^{15}N)GK, respectively, as estimated by the pic area ratio between the light peptide and the SIL-peptide by LC-HRMS (5 ppm mass error).

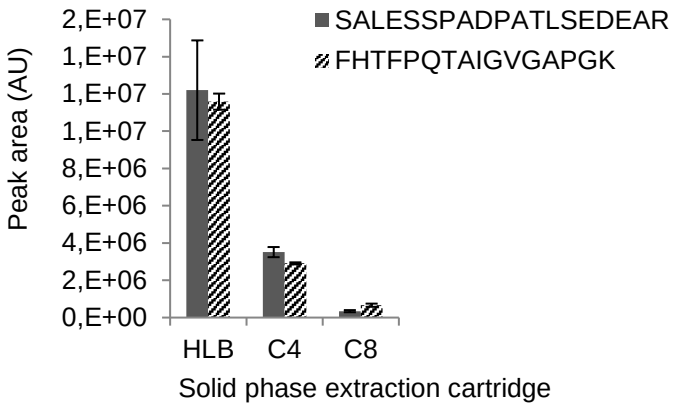


Fig. S5 *Comparison of different types of solid-phase extraction (SPE) cartridges at the protein level.*

The result was estimated using the peak area of the two most intense fragments per peptide. Three SPE cartridges were evaluated: HLB Oasis 500mg cartridge (Waters, Massachusetts, USA), C4 AttractSPE CAR3-C4-T4.5 (Affinisep, Petit Couronne, France), and C8 AttractSPE CAR3-C8-T2.5 (Affinisep, Petit Couronne, France). The experimental conditions for HLB are described in materials and methods (section 4). For C4 and C8 cartridges, the analyte of interest was eluted in 30% (v/v) ACN, 60% (v/v) ACN, and then 90% (v/v) ACN in water. The peak area corresponds to the sum of three elution fractions. The results showed high recovery when using the HLB SPE cartridge. AU: Arbitrary Unit.

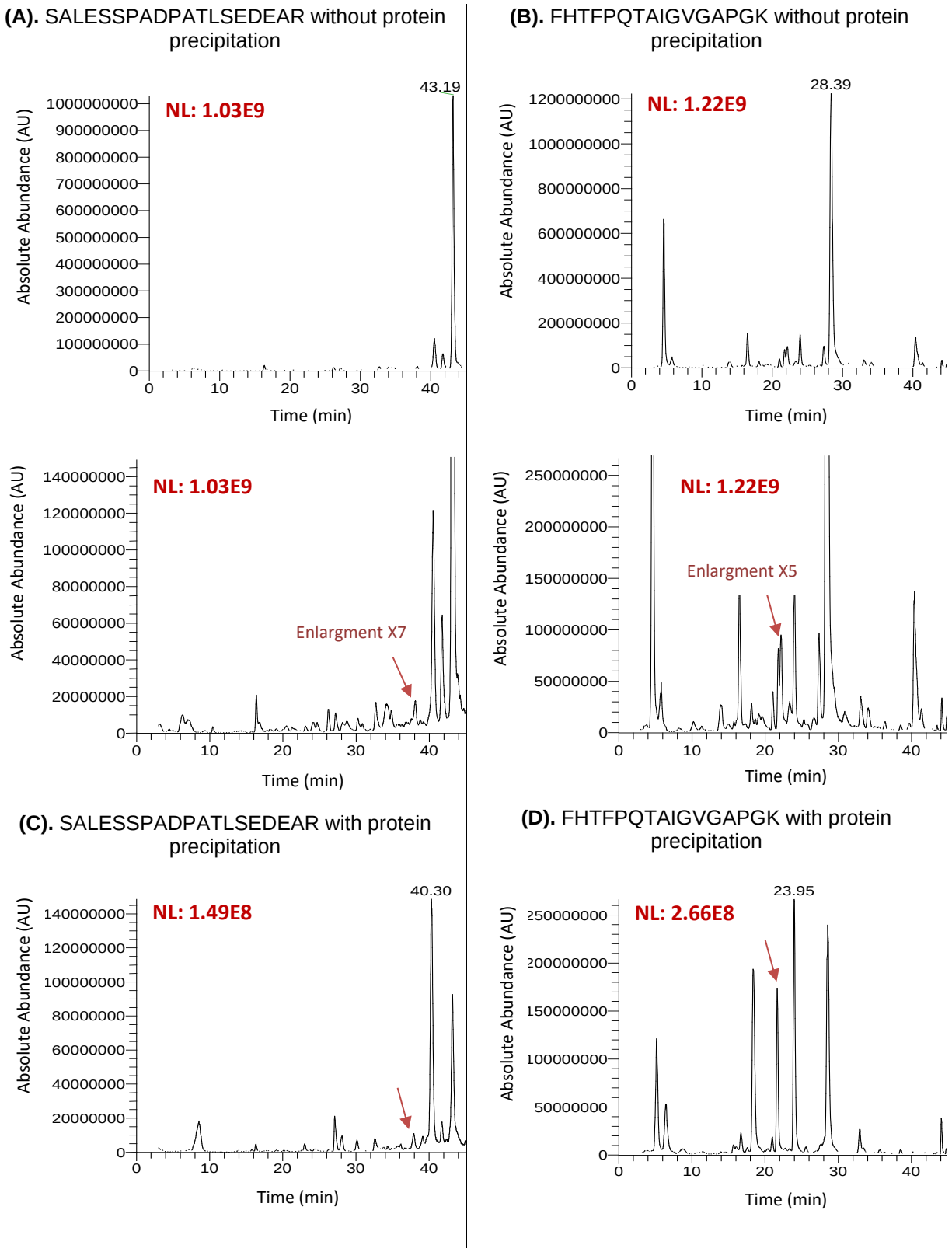


Fig. S6 *Total ion chromatogram (TIC) PRM signal of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (charge state +2) and FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (charge state +3) obtained from a serum sample with a PCT concentration of 20 ng/mL without protein precipitation by ACN (A and B) or with protein precipitation in 50% ACN (C and D) between SDC addition and SPE extraction in the sample preparation workflow.*

(A). TIC PRM (upper) and 7X magnified TIC PRM (lower) signal of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (charge state +2) without protein precipitation; (B). TIC PRM (upper) and 5X magnified TIC PRM (lower) signal of the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (charge state +3) without protein precipitation; (C). TIC PRM

signal of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide (charge state +2) with protein precipitation; (D). TIC PRM signal of the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (charge state +3) with protein precipitation. ACN precipitation reduces the sample's complexity by removing a subset of serum proteins, mostly high molecular weight proteins. TIC intensities (NL value) were 7-fold and 5-fold lower than without ACN precipitation for SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK peptides. AU: Arbitrary Unit.

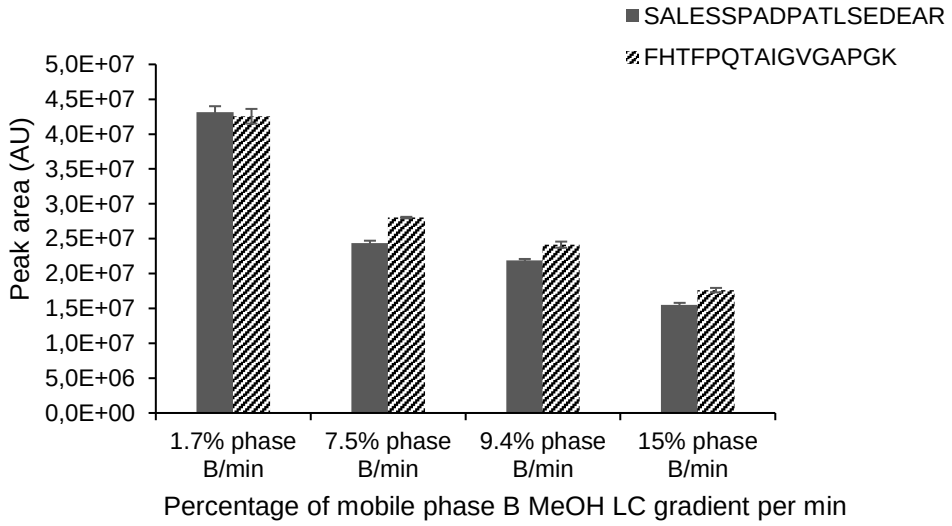


Fig. S7 *Influence of LC gradient of mobile phase solvent B (MeOH, 0.1% FA) on the intensity of peptide signals*

The result was estimated using the peak area of the two most intense fragments per peptide. The experiment was carried out by analysing two times for each condition. A lower gradient of mobile phase B allows a good separation of peptides of interest and the interferences coming high abundant protein in a complex matrix and avoids MS source saturation. AU: Arbitrary Unit.

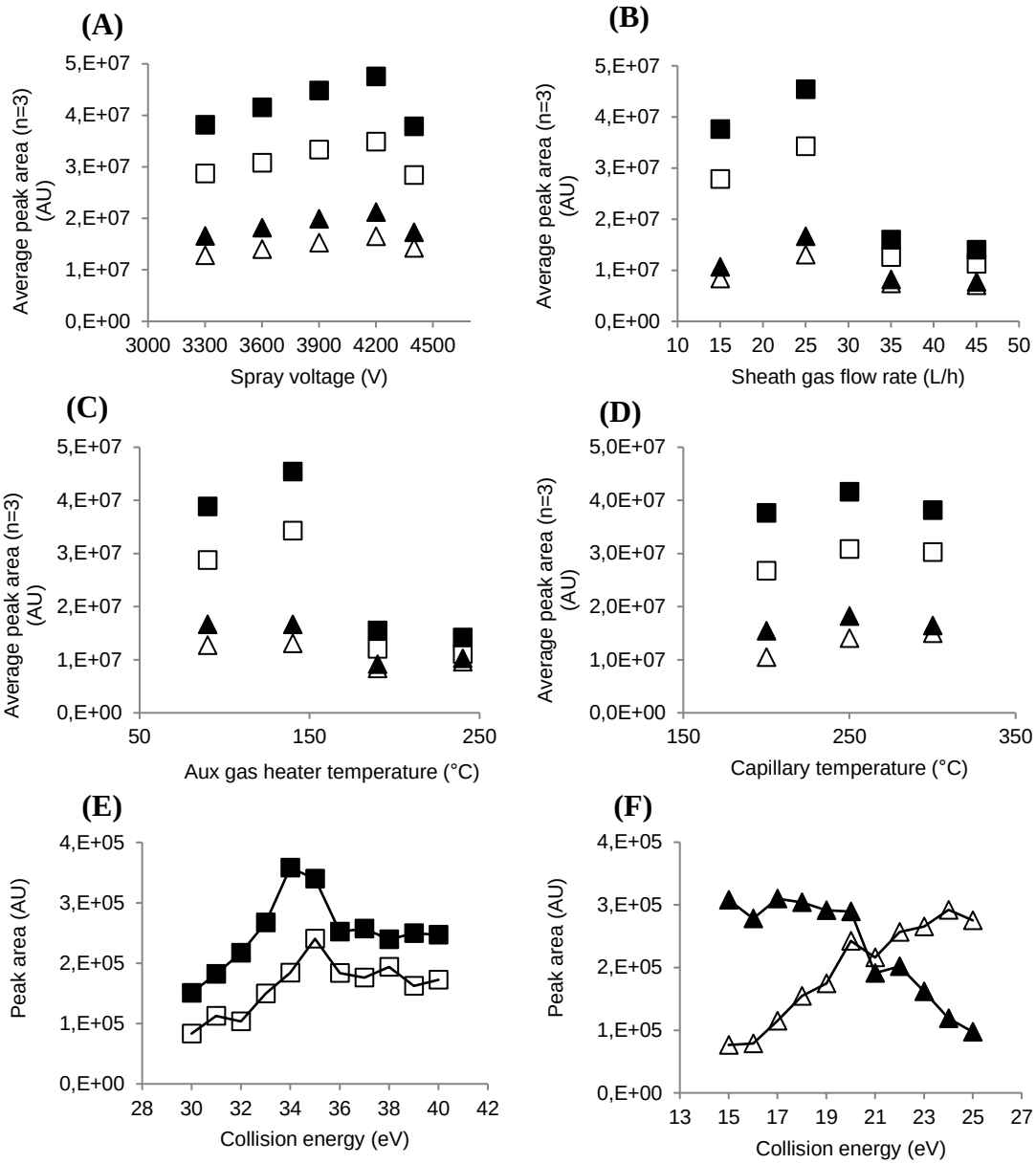


Fig. S8 *Optimization of MS parameters for the two selected peptides.*

Black squares correspond to fragment y_{13}^+ and white squares to fragment y_{10}^+ of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide. Black triangles correspond to fragment y_7^+ and white triangles to fragment y_3^+ of the FHTFPQTAIGVGAPGK. The experiment was performed by varying different parameters such as (A) spray voltage, (B) sheath gas flow rate, (C) auxiliary gas heater temperature, (D) capillary temperature, (E) collision energy for SALESSPADPATLSEDEAR peptide, and (F) collision energy for FHTFPQTAIGVGAPGK peptide. The optimized MS conditions (4.2 kV spray voltage, 25 L/h sheath gas flow rate, 140°C auxiliary gas heater temperature, 250°C capillary temperature, 35 eV and 20 eV of normalized collision energy for SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK peptides, respectively) were applied to develop the PCT quantification method in human serum. The experiment was carried out by analyzing peptide solution in buffer. AU: Arbitrary Unit.

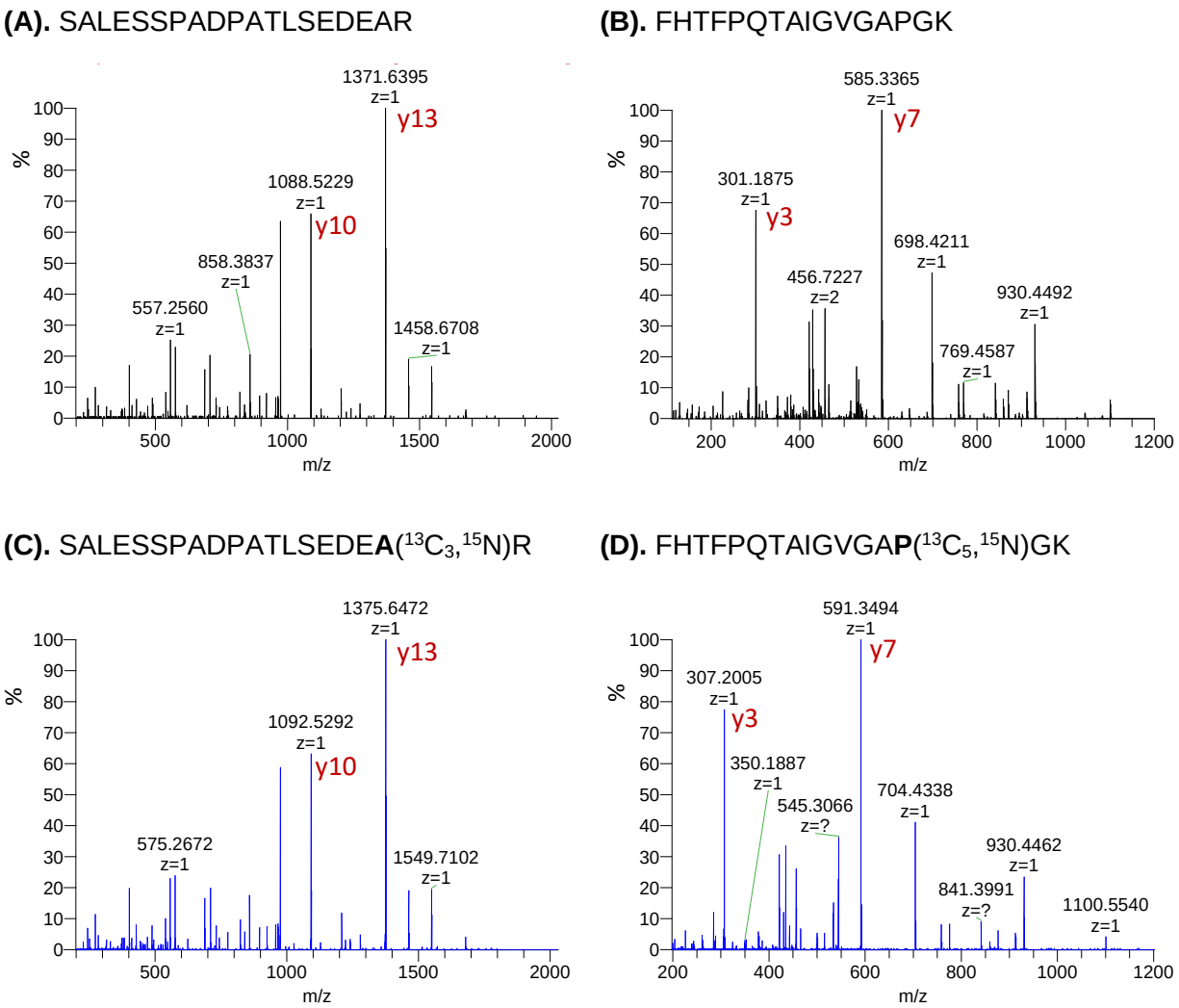
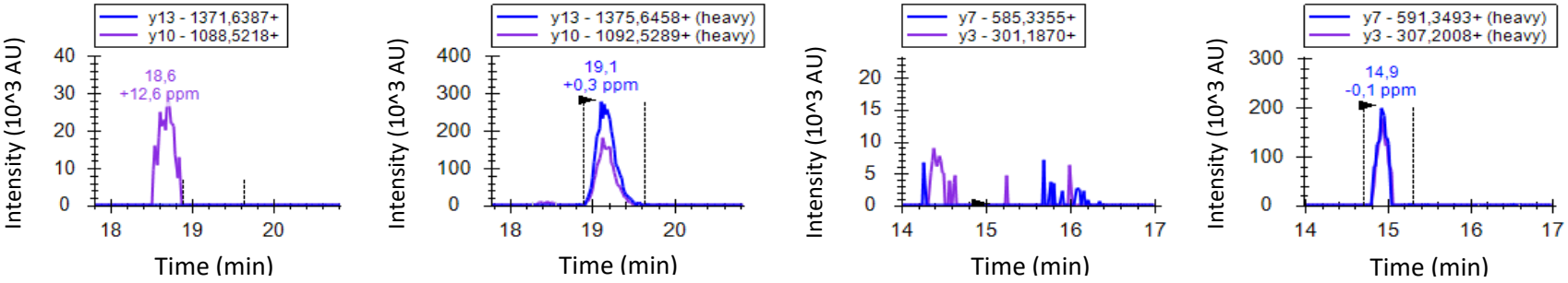


Fig. S9 *Higher energy collisional dissociation spectra of the two selected peptides and their SIL standard peptide.*

(A) SALESSPADPATLSEDEAR peptide, (B) FHTFPQTAIGVGAPGK peptide, (C) SALESSPADPATLSEDEA($^{13}C_3$,^{15}N)R peptide and (D) FHTFPQTAIGVGAP($^{13}C_5$,^{15}N)GK peptide.

(A). Human serum obtained from healthy subjects spiked with labelled peptide

SALESSPADPATLSEDEAR SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R FHTFPQTAIGVGAPGK FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK



(B). Human serum obtained from healthy subjects spiked with PCT recombinant protein at 0.245 µg/L and labelled peptides

SALESSPADPATLSEDEAR SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R FHTFPQTAIGVGAPGK FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK

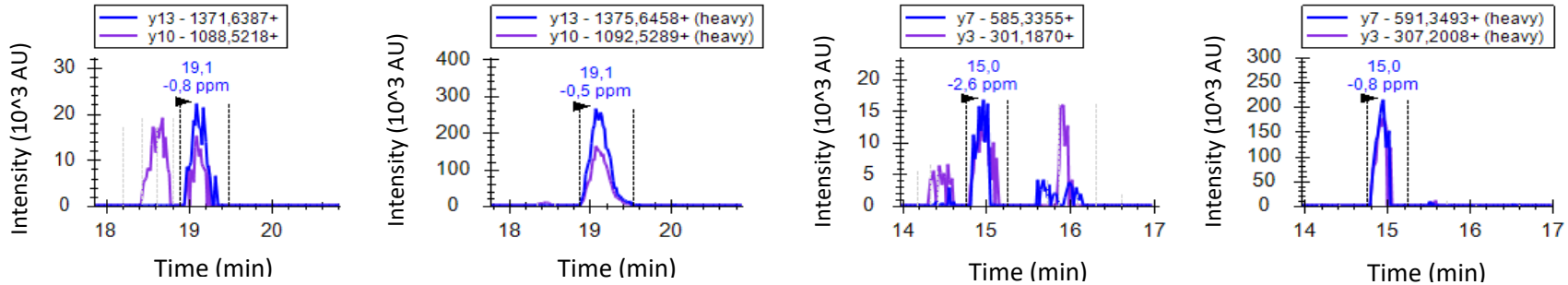


Fig. S10 *Extracted ion chromatograms (XIC) of monitored transitions of SALESSPADPATLSEDEAR (charge state +2) and FHTFPQTAIGVGAPGK (charge state +3) peptides and their corresponding SIL-peptides.*

XIC obtained when measuring human serum obtained from healthy subjects spiked with labelled peptides (A) and human serum obtained from healthy subjects spiked with a PCT recombinant protein at 0.245 µg/L and labelled peptides (B). Chromatograms were extracted without smoothing factor (none transform). AU: Arbitrary Unit

II.3.5 Méthode de quantification de la PCT par l'approche d'étalonnage protéique

La faisabilité du protocole analytique (préparation d'échantillon et analyse LC-MS) pour la quantification de la PCT à faible concentration dans le sérum humain a été démontrée précédemment avec un étalonnage peptidique. Cependant, l'utilisation d'une protéine recombinante comme étalon primaire et de son analogue marqué comme étalon interne pourrait améliorer les performances de la méthode, et s'affranchir de l'utilisation d'un facteur de correction. L'évaluation et la validation de la quantification de la PCT dans le sérum humain par ID-LC-MS/MS avec une stratégie d'étalonnage protéique a ainsi été réalisée pour le développement d'une méthode de référence d'ordre supérieur.

Les paramètres du protocole de préparation d'échantillons, ainsi que les paramètres de la chromatographie liquide et du spectromètre de masse restent inchangés par rapport à la méthode présentée précédemment. Seule la stratégie de quantification de la PCT a été adaptée. Les étalons ont alors été préparés à partir de la protéine recombinante Met-PCT (3-116) (PCT avec une méthionine N-terminale supplémentaire (3-116)) à différentes concentrations et son homologue marquée aux isotopes stables à concentration constante. Afin de corriger les variabilités possibles tout au long du processus de quantification, l'étalon interne a été ajouté dans les échantillons dès le début de la préparation d'échantillon. Comme cela a été mis en œuvre pour les peptides synthétiques, la protéine recombinante a été caractérisée par une approche PICAA. La concentration de la PCT recombinante dans la solution d'étalon primaire a été déterminée par AAA et son profil d'impureté par analyse de masse intacte par spectrométrie de masse haute résolution. Afin de confirmer et compléter les identifications des impuretés, une approche *top-down* a également été mise en œuvre. Tout ceci a permis de confirmer l'identité de la protéine Met-PCT (3-116) et d'identifier six impuretés protéiques, dont deux impuretés majoritaire (forme acétylée et oxydée de la protéine).

Cette méthode de quantification basée sur un étalonnage protéique a été validée en évaluant les principaux paramètres que sont la linéarité, la répétabilité analytique, la fidélité intermédiaire et la stabilité des peptides extraits dans le passeur d'échantillon. Les deux peptides SALESSPADPATLSEDEAR, situé sur le segment N-terminal de la PCT, et FHTFPQTAIGVGAPGK, situé dans la région appartenant aux deux segments calcitonine et katacalcine ont été suivis en mode PRM. Dans l'approche d'étalonnage peptidique rapportée dans l'étude précédente, les variations du peptide FHTFPQTAIGVGAPGK durant la digestion n'ont pas été corrigées par son étalon interne peptidique et n'avait pas permis d'utiliser le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK comme peptide de quantification. Dans l'approche d'étalonnage protéique avec l'utilisation de la protéine marquée comme étalon interne, ces variations sont destinées à être corrigées, et l'utilisation de deux peptides comme peptides de quantification devient donc possible.

La limite de quantification de la méthode est de 0,245 ng/mL (n=5, biais = 4,2 %, CV = 5,5 %) pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et de 0,5 ng/mL (n=6, biais = -7,4%,

CV% = 13,1 %) pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. Pour chacun des peptides, la fonction d'étalonnage est linéaire entre la limite de quantification et environ 14 ng/mL avec un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,9998 pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et supérieur à 9,9981 pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. De plus, pour les échantillons de concentration supérieure à 14 ng/mL et inférieure à 135 ng/mL, la quantification de la PCT est assurée grâce à la dilution d'un facteur 20 de l'échantillon avec du sérum blanc. Ainsi, pour une concentration comprise entre à 0,5 ng/mL et 135 ng/mL, les deux peptides ont été utilisés pour quantifier PCT, et seul le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été utilisé comme peptide de quantification pour une concentration comprise entre 0,25 ng/mL et 0,5 ng/mL. La concentration finale en PCT est obtenue par la moyenne des concentrations obtenues par les deux peptides. Les biais intra jours et inter jours évalués à partir d'échantillons de contrôle de qualité pour trois niveaux de concentration sur trois jours (environ 1 ng/mL, 4 ng/mL et 9 ng/mL), sont compris entre -3,3 % et 5,7 % et entre -3,0 % et – 0,7 % respectivement. La répétabilité ainsi que la fidélité intermédiaire sont évaluées sur ces mêmes échantillons à partir du CV sont inférieures à 4,0 %. De plus, une étude de stabilité a montré la stabilité des peptides extraits de la PCT pendant au moins 7 jours à 7°C dans le passeur d'échantillon.

L'incertitude des résultats de mesure a également été évaluée afin de connaitre la contribution des différentes sources d'incertitude telles que la préparation des étalons, la préparation des échantillons, le modèle d'étalonnage, la pureté de l'étalon primaire et la fidélité intermédiaire des résultats de mesure. L'incertitude élargie relative des résultats obtenus pour les trois niveaux de contrôle de qualité est inférieure à 11 % (k=2) pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et 16 % (k=2) pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK, et inférieure à 13 % (k=2) pour la concentration finale. La source majeure d'incertitude de ces résultats de mesure est l'incertitude liée à la détermination de la concentration de l'étalon primaire. A la limite de quantification, l'incertitude élargie relative est de 17% (k=2) pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et de 30 % (k=2) pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. L'incertitude liée au modèle d'étalonnage est la source majeure d'incertitude à cette concentration.

Enfin, la méthode développée a été appliquée à cinq échantillons réels constitués de pools de sérum de patients atteints du sepsis. Comme cela a été observé pour la méthode basée sur un étalonnage peptidique, les concentrations mesurées par l'immunoessai sont plus grandes que celles obtenues par la méthode ID-LC-MS/MS. Cependant, cette différence varie entre 20 % et 50 % et semble dépendante de la concentration. Ces observations étant obtenues sur un nombre restreint d'échantillons dont la commutabilité n'est pas démontrée (pool d'échantillons de patient) et ne mettant en œuvre qu'un seul immunoessai, des études de corrélations plus rigoureuses semblent nécessaires.

La méthode de référence candidate développée au cours de cette étude permettra dans un premier temps d'assigner des valeurs de référence à des MRC secondaires et à des

matériaux de contrôle de qualité utilisés lors de campagnes d'EEQ pour évaluer la comparabilité et l'exactitude de résultats de mesure à des seuils cliniques supérieurs à 0,25 ng/mL.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication, intitulée « A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator » et qui est en cours de finalisation et sera soumise prochainement dans le journal Clinical Chemistry and Laboratory Medecine.

Article 4 : A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator

Huu-Hien Huynh, Amandine Boeuf, Maxence Derbez-Morin, Anne-Marie Dupuy, Qinde Liu, Joëlle Vinh, Vincent Delatour

En préparation en vue de la soumission pour publication dans Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

A candidate high resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator

Huu-Hien Huynh[a, b], Vincent Delatour[a], Maxence Derbez-Morin[a, c], Qinde Liu[e], Joëlle Vinh[b], Amandine Boeuf[a]

[a] Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, Paris, France

[b] Biological Mass Spectrometry and Proteomics, SMBP, ESPCI Paris, Université PSL, CNRS, Paris, France

[c] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette, France

[d] Laboratoire de Biochimie et Hormonologie, CHU Montpellier, Université Montpellier 1, Montpellier, France

[e] Chemical Metrology Division, Applied Sciences Group, Health Sciences Authority, Singapore, Singapore

Corresponding author: Amandine Boeuf at Laboratoire National de Métrologie et d'Essai (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France; Telephone: (33) 1 40 43 39 21; email: amandine.boeuf@lne.fr

Abstract

Background: Procalcitonin (PCT) is a widely used biomarker for rapid sepsis diagnosis and antibiotic stewardship. Although measurement results of some PCT assays have been harmonized through traceability to the Brahms PCT LIA assay, the accuracy and comparability of the results remain questionable. To date, the traceability of the resultsto the SI Units has not been established. A reason for this is the absence of higher-order Reference Measurement Procedure (RMP) and Certified Reference Materials (CRMs) for PCT.

Methods: An antibody-free candidate RMP based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS) was validated to quantify PCT in human serum. To establish results traceability to the SI Units, a recombinant PCT used as primary calibrator was characterized by high-resolution mass spectrometry and amino acid analysis.

Results: Response was linear over the calibration range of 0.25-13.74 µg/L with correlation coefficients > 0.998. Quantification of samples above 13.74 µg/L was validated with a dilution, which allowed extending the measuring range up to 132 µg/mL. For all QC materials, intra-day bias was between -3.3% and +5.7%, and inter-day bias was between -3.0% and -0.7%. Intra-day precision was below 5.1%, and inter-day precision was below 4.0% for QC materials. The candidate RMP was successfully applied to the absolute quantification of PCT in five frozen human serum pools.

Conclusions: The candidate RMP is fit for the purpose to characterize secondary CRMs that will be used to monitor the accuracy and comparability of commercially available immunoassays. If deemed needed and feasible, the candidate RMP will pave the road toward standardization of PCT assays.

Keywords: procalcitonin, candidate reference method, isotope dilution mass spectrometry, sepsis

List of abbreviations used: PCT procalcitonin; RMP reference measurement procedure; CRM certified reference materials; ACN acetonitrile; FA formic acid; ID-LC-MS/MS isotope dilution associated liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; CRM certified reference material; DTT dithiothreitol (DTT); IAA iodoacetamide; LLOQ lower limit of quantification; HLOQ higher limit of quantification; CV coefficient of variation

Introduction

Procalcitonin (PCT) is a recognised sepsis biomarker allowing stratification of patients and management of the antibiotic therapy [1–3]. Different clinical decision cutoffs were established (e.g. 0.5 µg/L for sepsis diagnosis and 0.25 µg/mL for antibiotic initiation or discontinuation for a patient with moderate or mild illness outside ICU [4]). The use of PCT has been integrated into clinical guidelines and antimicrobial stewardship programs [4–6]. Thus, reliable and accurate measurements of this biomarker are critical. Facing a growing demand for PCT testing, the number of commercialized assays based on different technical principles has increased considerably in recent years [7]. Different studies underlined discrepancies of results provided by the different commercially available PCT assays [8–11], potentially impacting clinical decision at clinical cutoffs, but the source of such variability remains unclear [12]. A proposed route to improve results comparability and accuracy is the development of reference calibration materials value assigned with a higher-order reference procedure [13–15]. However, such a higher-order reference measurement system is still missing for PCT. Some assays have been harmonized through traceability to the Brahms PCT LIA assay as a surrogate reference method. However, the traceability of the results to the SI units has not yet been established, and this surrogate reference measurement system has not been adopted globally, implying that a large number of assays are not yet harmonized.

Thanks to its high selectivity and reproducibility, isotope dilution mass spectrometry has been successfully implemented to develop reference measurement procedures (RMPs) for SI-traceable quantification of clinically relevant proteins [16–21]. For the quantification of PCT in serum, three bottom-up studies based on LC-MS/MS were previously reported [22–24]. For all studies, isotope dilution relied on the use of stable isotope labelled (SIL) peptides spiked in the sample after protein digestion. However, a SIL-protein, spiked at the earliest stage of the sample preparation, allowing to overcome material loss occurring during sample processing, is considered as an ideal internal standard which has the same behaviour as the analyte of interest [25].

Here we described the development and validation of a candidate reference ID-LC-MS/MS method for the SI-traceable quantification of PCT in serum at clinically relevant concentrations using a recombinant protein as primary calibrator and a SIL-recombinant protein as an internal standard. Analytical performance in terms of trueness and precision was assessed. The uncertainty of measurement results was evaluated. The present method was used to perform SI-traceable quantification of PCT in five pools of frozen human serum as a proof of concept for the development of secondary Certified Materials.

Materials and methods

8. Chemicals and reagents

The recombinant protein methionine-procalcitonin 3-116 (Met-PCT [3-116]) and the isotopically labelled protein methionine-procalcitonin 3-116 (SIL-protein Met-PCT [3-116] labelled on arginine (R[$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]) and lysine residues (K[$^{13}C_4$,^{15}N])) at a concentration of ~1 mg/g (buffer stock solution) were purchased from Promise Advanced Proteomics (Grenoble, France). Supplier purified the Met-PCT [3-116] using three orthogonal techniques: ion exchange, reverse phase and size exclusion chromatography.

The amino acid CRMs L-leucine (CRM 6012-a, 99.9±0.2 %), L-phenylalanine (CRM 6014-a, 99.9±0.2 %), L-proline (CRM 6016-a, 99.9±0.2 %) and L-valine (CRM 6015-a, 99.9±0.2%) were obtained from National Metrology Institute of Japan (NIMJ, Tsukuba, Japan). The labelled amino acids were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA).

Sodium deoxycholate (SDC), ammonium bicarbonate, dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), Tween-20 and hydrochloric acid were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Acetonitrile, methanol absolute, formic acid (FA) (all LC-MS grade) were purchased from Biosolve (Dieuze, France). Acetic acid LC-MS grade was purchased from Fisher Chemical (Illkirch, France). Water was obtained on-site from a Millipore Milli-Q purification system (resistivity 18 MΩ.cm-1). Trypsin Gold (MS grade) was obtained from Promega (Madison, USA).

Human male serum (reference H4522, noted blank serum) was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

9. Instrumentation

The amino acids analyses, intact mass analyses of Met-PCT [3-116] and LC-MS/MS analysis of the digested sample were performed on a Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 ultra-performance liquid chromatography system coupled to a Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) noted Q Exactive Focus instrument afterwards.

The top-down analysis of Met-PCT [3-116] was conducted on a Thermo Scientific™ Dionex™ RSLC Ultimate 3000 nano-LC system coupled to a Thermo Scientific™ Orbitrap Eclipse™ Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific), noted Eclipse instrument afterwards.

10. Samples collection

Five pools of patient serum samples with different PCT concentration were provided by University Hospital Montpellier (Montpellier, France). Each pool was produced by pooling twelve single frozen donations obtained from patients suffering from sepsis or septic shock. These serum pools were analysed at the clinical chemistry laboratory of Montpellier Hospital to determine the PCT concentration with Brahms PCT sensitive Kryptor immunoassay (Compact Plus), and immediately stored at -80 °C until analysis.

11. Characterization and quantification of primary calibrator stock solution

a. Confirmation of Met-PCT [3-116] and impurities analysis

A characterisation of Met-PCT [3-116] protein and its impurities was carried out using two complementary approaches: high-accuracy high-resolution MS analyses of intact protein for impurities identification and top-down MS analyses using multiple fragmentation modes for protein characterization.

i. LC-MS/MS conditions for intact protein analysis

The Met-PCT [3-116] solution at 0.1 g/L in 5% (v/v) ACN in water was analyzed for potential impurities on an electrospray Q Exactive Focus mass spectrometer, operated in positive mode. The detail of source condition and mass spectrometry parameters were summarized in the Supplemental data, Table S1.

Chromatographic separation was performed on a C4 analytical column (150 x 1 mm, 5 µm, BioBasic™-4 Thermo Scientific). The mobile phases consisted of 0.1% FA (v/v) in water (phase A) and 0.1% (v/v) FA in acetonitrile (phase B). The separation was achieved using a linear gradient from 25% to 60% of phase B over 37min at a flow rate of 40 uL/min.

ii. LC-MS/MS conditions for top-down protein analysis

The Met-PCT [3-116] solution at 0.1 g/L in 5% (v/v) ACN in water was analyzed on a nanoelectrospray tribrid Eclipse instrument. Chromatographic separation was performed on a C4 analytical column (75 µm x 150 mm, 5 µm, Acclaim™ PepMap™ 300, Thermo Scientific). The mobile phases consisted of water/ACN 98:2, 0.1 % (v/v/v) FA (phase A) and water/ACN 10:90, 0.1 % (v/v/v) FA (phase B). The separation was achieved using a linear gradient from 25% to 60% B in 37 min at a flow rate of 300 nL/min. The sample was analyzed in data dependant acquisition mode, using four different fragmentation modes (HCD, EThDC, CID and UVPD). The detail of source condition and mass spectrometry parameters are summarized in the Supplemental data, Table S2.

b. Amino acid analysis

The SI-traceable quantification of Met-PCT [3-116] standard was performed by amino acid analysis as described previously [24]. Briefly, the Met-PCT [3-116] content was determined by quantification of phenylalanine, proline, valine and leucine by ID-LC-MS using a 5-point calibration curve after gas-phase hydrolysis in acidic conditions. Conditions of the gas-phase hydrolysis were optimized by carrying out the gas-phase hydrolysis (ELDEX Workstation) at different conditions: 110°C, 130°C or 150°C for 40h and 130°C for 24h and 72h. In each condition, four processed replicates were performed. The amino acids were quantified on the Q Exactive Focus instrument in selected ion monitoring mode. The isocratic separation was performed using a C18 column (150 x 2.1 mm, 1.7 µm, BEH C18, Waters) in water/ACN/FA 98:2:0.1 (v/v/v). The final concentration of protein was estimated as the average of four amino acid titrations determined from the optimal hydrolysis condition with 29 processed replicates over six independent experiments.

12. Preparation of Calibration and QC samples

Detailed preparation of calibration and quality control (QC) samples is available in Supplemental data, document 1. Briefly, the individual buffer stock solutions at ~1mg/g of Met-PCT [3-116] and SIL-protein Met-PCT [3-116] was gravimetrically diluted in blank serum. A set of six calibration samples (concentration of Met-PCT [3-116] ranging from 0.25 to 13.74 µg/L) and three QC samples (concentration of Met-PCT [3-116] of about 1.0, 4.0 and 9.0 µg/L) was prepared by spiking the Met-PCT [3-116] at different concentrations, and SIL Met-PCT [3-116] at 1.5 µg/L in blank serum. The calibration and quality control samples were aliquoted (500 µL) and stored at - 80 °C.

Samples used to determine the lower limit of quantification (LLOQ) were prepared as described for the QC samples by spiking the Met-PCT [3-116] at two different concentrations (0.25 and 0.50 µg/L) and SIL Met-PCT [3-116] at 1.5 µg/L in blank serum.

Samples used to determine the higher limit of quantification (HLOQ) were prepared by spiking PCT [3-116] at 132 µg/L in blank serum. The sample was then diluted with the blank serum to a concentration of 6.5 µg/L followed by adding SIL Met-PCT [3-116] at 1.5 µg/L.

13. Quantification procedure

c. Sample preparation procedure for PCT quantification in human serum

Patient samples were prepared gravimetrically by mixing about 480 µL of the sample with 20 µL of SIL-protein Met-PCT [3-116] at a concentration of ~ 40 µg/L. The calibrators, quality control materials and patient samples were processed as described previously [24]. Briefly, 500 µL of serum was subjected to protein denaturation using SDC detergent and precipitated using acetonitrile. The supernatant was diluted and then purified on a C18 solid-phase extraction (SPE) cartridge (HLB C18, Waters). Extracted proteins were reduced (DTT), alkylated (IAA) and digested with 4.6 µg trypsin Gold. Finally, the tryptic digest was purified on an HLB C18 SPE cartridge. The elution buffer was evaporated to dryness in a centrifugal vacuum concentrator, reconstituted with 100 µL of 0.1 % formic acid, 2 % MeOH in water (v/v/v) (noted final extract) and stored at -20 °C until LC-MS/MS analysis.

14. LC-MS/MS conditions

The digest samples were analysed on the Q Exactive Focus instrument in PRM mode, as described previously [24]. Briefly, the tryptic peptides were separated on a C18 analytical column (1 x 150 mm, 3 µm, Acclaim™ PepMap™ 100, Thermo Scientific) using 0.05% acetic acid in water (v/v) as mobile phase A and 0.05% acetic acid in methanol (v/v) as mobile phase B at a flow rate of 80µL/min. Peptides were eluted with the following gradient of mobile phase B: 2% for 2 min, linear from 2% to 22% in 8 min, linear from 22% to 38% in 1 min, linear from 38% to 42% in 14 min, and from 42% to 98% in 1 min.

SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK proteotypic peptides were previously selected [24]. Two transitions were selected per peptide, one used as peptide quantifier and one for peptide qualifier (see Supplemental data, Table S3). For PCT quantification, raw files were analysed by Xcalibur software version 4.1 (Thermo Scientific). The peak area of selected fragment ion was extracted from ion chromatograms with a mass tolerance of 10 ppm for PRM data.

15. Method validation

After having defined the calibration curve, the analytical performance for PCT quantification in human serum using protein-based calibration approach with SIL-protein as internal standard was validated regarding linearity, trueness, precision, dilution, autosampler stability of extracted peptides and carryover.

a. Linearity

The calibration curves were obtained with five to six calibrators per peptide by plotting the ratios of the peak areas of the peptides over their isotopically labelled counterparts against the corresponding ratios of the amounts of the peptides over their isotopically labelled counterparts. Linearity was evaluated by three sets of calibration samples prepared from three independent aliquots of Met-PCT [3-116] stock solution that were then diluted in the blank matrix. The linearity was evaluated according to the Pearson correlation coefficient, which was required to be >0.995. Besides, the accuracy of the quantification of each calibrant was evaluated by considering the calibrants as unknown samples. The bias between the measured concentration and the theoretical concentration determined gravimetrically should be within ±

20% for the lower limit of quantification and ± 15% for other levels. For each batch, a maximum of one calibrator was excluded from the curve. The individual peptide concentration was determined using its respective calibration curve; the mean concentration was calculated as the average of two individual concentration.

b.Trueness and precision

The trueness and precision were evaluated in intermediate precision conditions of measurement using three processed replicates of QC samples at three concentration levels (about 1.0, 4.0 and 9.0 µg/L) over three independent experiments (intra-assay: N=3 per concentration level, inter-assay: N= 9 per concentration level). The concentration of each sample was determined using the calibration curve prepared on the same day. Trueness was evaluated by the bias between the measured concentration and the theoretical concentration determined gravimetrically. The precision was calculated as the coefficient of variation (CV) of the measured peptide concentrations. Bias and precision (CV) should be within ±15 %.

c. Lower limit of quantification

The LLOQ was defined as the lowest concentration of the calibration curve with bias and precision within 20%. The LLOQ was assessed by analysing six processed replicate samples at 0.25 µg/L for SALESSPADPATLSEDEAR peptide and 0.5 µg/L for FHTFPQTAIGVGAPGK peptide.

d. Higher limit of quantification

To determine whether a serum sample with a PCT concentration exceeding the highest concentration of the calibration curve can be diluted before being processed as described above, an experiment was conducted by diluting 20-folds with blanc serum sample a spiked QC sample at a concentration of about 132 µg/L, which is 9-folds higher than the highest concentration of the calibration curve. The experiment was performed with six processed replicate samples. The bias and precision of the diluted samples should be within ± 15%.

e. Autosampler stability

The auto-sampler stability (7 °C) of final extract from QC samples was evaluated by comparing the concentration obtained at the beginning of the study (day 0) and those obtained 7 days later. The final extract was considered stable if the concentration was quantified within 20% of the initial concentration (day 0).

f. Carryover

Carryover is the ratio (in percentage) of peak area of the calibrator in blank sample acquisition, just after a prior injection of the calibrator at the highest concentration over peak area of the calibrator injected at the LLOQ. Carry-over should not exceed 20%.

16. Uncertainty evaluation of PCT quantification in human serum

Uncertainty was evaluated according to the ISO Guide 98-3GUM by using the bottom-up approach [26]. The combined uncertainty of the experimental values for QC levels, LLOQ, HLOQ and pools was

calculated by propagating the uncertainty associated with all relevant sources of measurement uncertainty, including gravimetric preparation of samples and calibrators, uncertainty associated with the regression model, precision.

The uncertainty (u_{total}) of mean concentration was calculated by combining the two uncertainties of PCT related peptides (u_{SALES} and u_{FHT}).

$$u_{total} = \frac{1}{2}\sqrt{u_{SALES}^2 + u_{FHT}^2}$$

The final uncertainty (u_{final}) of mean concentration was calculated by taking into account the uncertainty between peptides ($u_{interpeptide}$) obtained from ANOVA analysis.

$$u_{final} = \sqrt{u_{total}^2 + u_{interpeptide}^2}$$

Finally, the expanded uncertainty (U) was expressed by multiplying the final uncertainty with a coverage factor k = 2 corresponding to a level of confidence of approximately 95 %. The relative expanded uncertainty was expressed by the ratio between the expanded uncertainty and the measurement result.

Results

1. Characterization and quantification of primary calibrator stock solution

a. Confirmation of Met-PCT [3-116]

An ion chromatogram with the spectrum and isotopic distribution spectra after deconvolution of the major chromatographic specie is presented in Figure 1. The multi-charged spectrum was recorded and deconvoluted by Xcalibur software (Xtract algorithm) to obtain the molecular mass of Met-PCT [3-116]. The monoisotopic mass of MCT was 12749.1078 with a CV% of 0.0003% (n=3). This value agreed well with the theoretical value of 12749.1100 (mass error: -0.39ppm)**.** Furthermore, the identity of Met-PCT [3-116] was also confirmed by MS/MS analysis. By combining four fragmentation modes on the 14 charged state of the main compound in buffer stock solution (m/z = 912.3004), a sequence coverage of 60% of Met-PCT [3-116] was obtained and confirm the identity of the main compound in the buffer stock solution of primary calibrator.

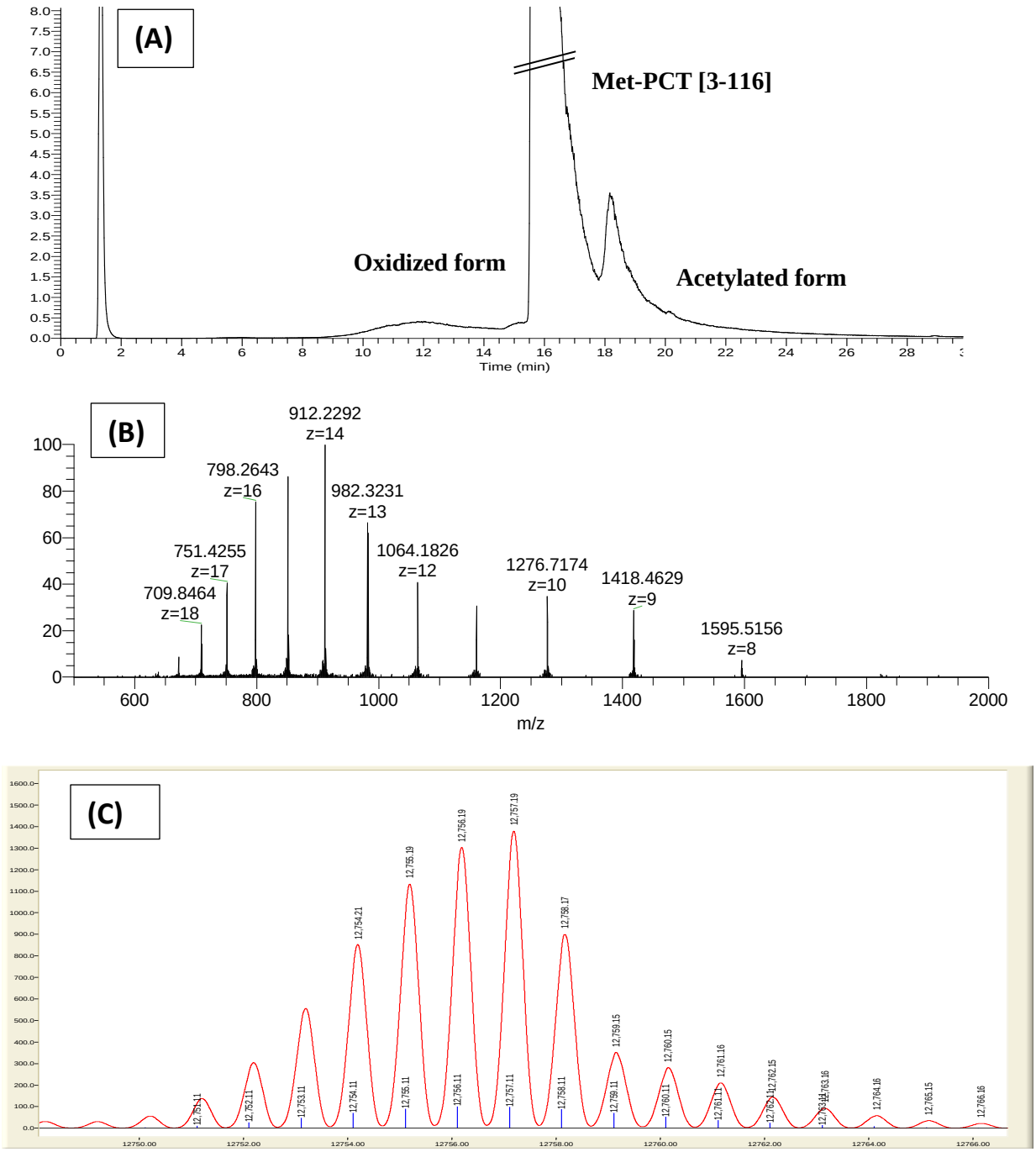


Figure 1. Characterization of the Met-PCT [3-116] primary calibrator. (A) Extracted ion chromatogram obtained by injecting 5 µg of the protein standard. The base peak represents Met-PCT [3-116]. (B) The multi-charged mass spectrum corresponding to the base peak Met-PCT [3-116] at 15.8 min. (C) Overlap between theoretical (blue) and observed (red) isotopic distributions of Met-PCT [3-116] after deconvolution.

b. Impurities analysis

The most intense impurities identified by accurate mass were oxidized PCT, acetylated PCT and truncated forms of PCT (Supplemental data, Table S5). Because of the structural similarity, the associated areas under the peak of the different species were compared. The relative peak area obtained from extracted chromatogram after deconvolution of oxidized PCT and acetylated PCT in the stock solution was 5.07% and 2.14% of the base peak. The truncated forms of PCT were less than 1%. The top-down analysis allowed to confirm the acetylated modification, which is located in the N-terminus of Met-PCT [3-116].

c. Quantification of primary calibrator stock solution by amino acid analysis

After optimizing the conditions of gas-phase hydrolysis, the highest concentration measured by amino acid analysis, with the lowest variation between the four amino acids (leucine, phenylalanine, proline, valine), was obtained at 130°C for 40h (see Supplemental data, Table S4). This experimental conditions at 130 °C allowed to hydrolyse the valine amide liaison, which is known to be challenging to cleave without degrading the amino acids produced. These optimized conditions were then applied to the quantification of the four amino acids in the primary stock solution of Met-PCT [3-116]. The mass fraction of the Met-PCT [3-116] (average from four amino acid results) in the stock solution was 807 ± 72 µg/g (k = 2). (Table 1).

Table 1. AAA results obtained from 29 processed replicates over six independent gas-phase hydrolyses of the primary calibrator stock solution:

	Phe	Pro	Val	Leu
Met-PCT [3-116] mass fraction obtained by each amino acid (µg/g)	788	783	858	797
Standard deviation (µg/g)	78	73	74	70
Met-PCT [3-116] mass fraction by combining four amino acids (µg/g)	807			
Expanded uncertainty U (coverage factor k=2) (µg/g)	72			
Relative expanded uncertainty U (coverage factor k=2) (%)	8.9%			

The full purity assessment experiment of the protein primary calibrator stock solution is on-going; this material was considered fit-for-purpose for this study.

2. Method validation

a. Linearity

The regression model is linear over the range 0.25-13.74 µg/L for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and over the range 0.47-13.74 µg/L for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide. The Pearson regression coefficient was above 0.998 for both peptides. Figure 3 shows calibrators obtained for each peptide from three independent days and the experimental bias of the back-calculated ratio compared to

the theoretical quantity ratio obtained for each calibrant from three independent experiments. The detailed data are summarized in Supplemental data, Table S6.

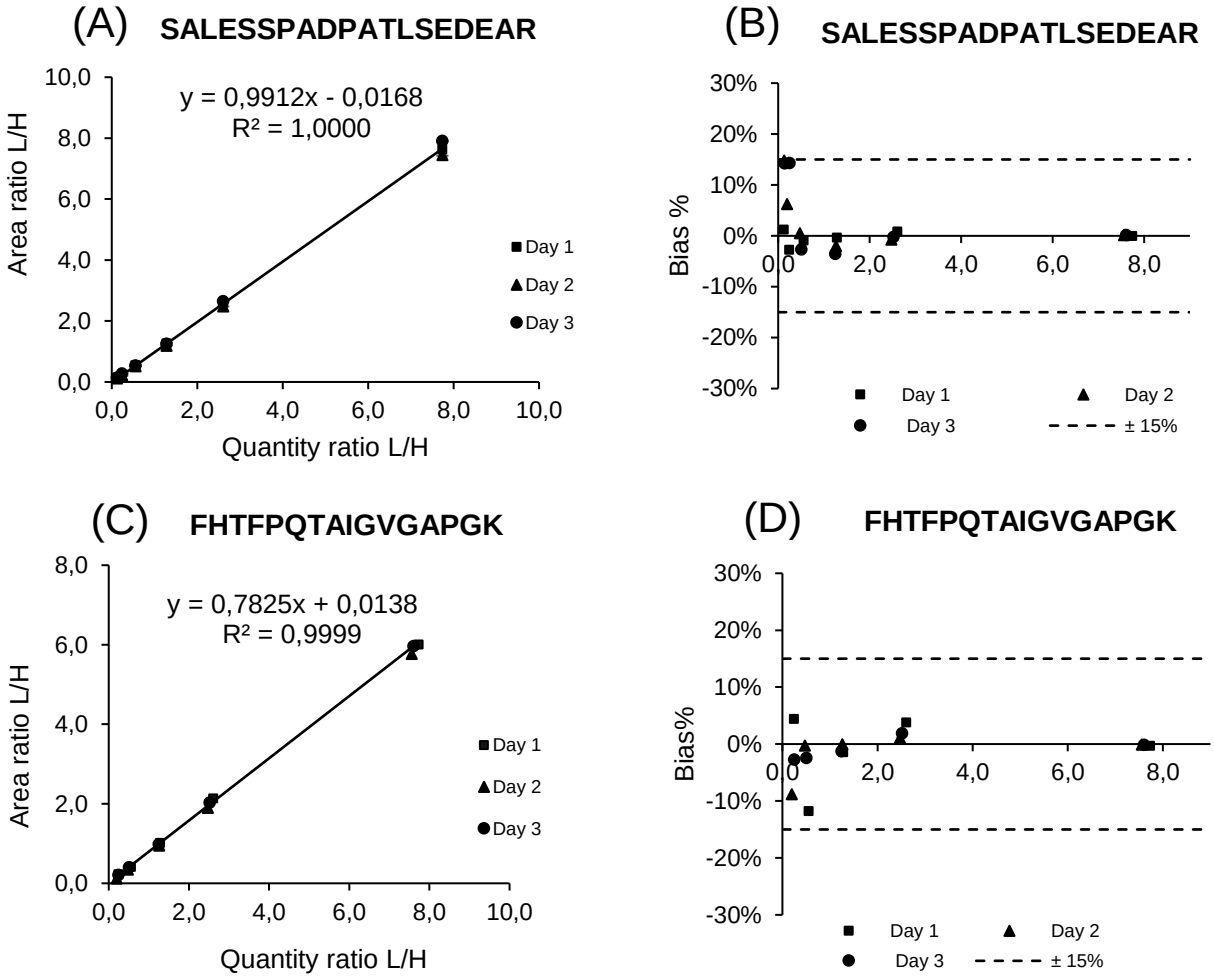


***Figure** 3: Linearity of PCT quantification by LC-MS/MS*

(A) Linearity of the signal response for SALESSPADPATLSEDEAR *peptide obtained with six points serum-based calibrators from three independent experiences (linearity equation was obtained by the average of results obtained from three independent days); (B) Percentage of deviation (%) of the back-calculated ratio compared to the theoretical quantity ratio of the* SALESSPADPATLSEDEAR *peptide; (C) Linearity of the signal response for* FHTFPQTAIGVGAPGK *peptide obtained with six points serum-based calibrators from three independent experiences (linearity equation was obtained by the average of results obtained from three independent days); (D) Percentage of deviation (%) of the back-calculated ratio compared to the theoretical quantity ratio of the* FHTFPQTAIGVGAPGK *peptide. Deviation % from all calibrator levels were between ±15%.*

b. Trueness and precision

The intra-day bias and inter-day bias ranged from -2.8% to 1.6% and -1.2% to 0.2% for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and -7.3% to 8.0% and -6.2% to 6.3% for the

FHTFPQTAIGVGAPGK peptide, respectively (Table 2). The intra-day precision and intermediate precision (inter-day) were below 3.3% and below 2.3% for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and below 8.8% and below 7.6% for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide (Table 3). For all QC materials, intra-day bias was between -3.3% and +5.7% and inter-day bias was between -3.0% and -0.7% for the mean concentration. Intra-day precision was below 5.1% and inter-day precision was below 4.0% for QC materials

Table 2. Intra-day and inter-day bias and precision of 3 independent experiments on QC materials. Each experiment was performed on three processed replicates at three different concentrations.

	Day 1			Day 2			Day 3			Inter-day		
	Concentration (µg/L)	Bias (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)	Bias (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)	Bias (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)	Bias (%)	CV (%)
	SALESSPADPATLSEDEAR peptide											
QC1	1.00	-0.2	2.2	0.99	-0.9	2.2	1.02	1.6	1.0	1.00	0.2	2.0
QC2	3.95	-1.2	2.5	3.97	-0.8	3.3	3.93	-1.7	1.4	3.95	-1.2	2.3
QC3	8.93	-0.8	2.4	9.03	0.3	1.7	8.75	-2.8	1.2	8.90	-1.1	2.1
	FHTFPQTAIGVGAPGK peptide											
QC1	0.94	-7.3	8.8	0.95	-2.8	0.9	0.93	-7.3	4.0	0.94	-6.2	5.0
QC2	3.95	2.4	1.3	4.09	1.5	2.5	3.90	-2.4	3.2	3.99	-0.3	3.8
QC3	10.09	6.0	5.2	8.90	-1.1	0.6	9.72	8.0	9.5	9.57	6.3	7.6
	Mean of two peptides											
QC1	0.97	-3.3	3.3	0.97	-2.9	1.3	0.97	-2.9	1.9	0.97	-3.0	2.0
QC2	3.95	-1.2	3.3	4.03	0.6	3.1	3.89	-2.1	0.9	3.97	-0.7	2.7
QC3	9.51	5.7	3.0	8.96	-0.4	1.0	9.23	2.6	5.1	9.24	-2.6	4.0

c. Lower limits of quantification

The LLOQ level was 0.25 µg/L for the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and 0.47 µg/for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide. Therefore, PCT concentration was calculated by the average of two concentrations obtained from two peptides for concentration above 0.47 µg/L, and by concentration obtained by SALESSPADPATLSEDEAR peptide for concentration below this limit. The mean bias and precision CV were 4.2% and 5.5%, respectively for a concentration of 0.25 µg/L and -0.7% and 7.5% for concentration of 0.51 µg/L.

d. Higher limit of quantification

QC quantification at concentration above the highest calibrators was quantified after a dilution with a factor 20, showed a bias and precision of 1.6% and 2.3% for SALESSPADPATLSEDEAR peptide and -5.5% and 0.2% for FHTFPQTAIGVGAPGK peptide. The method can quantify PCT for a concentration up to 132 µg/L.

e. Autosampler stability and carryover

Autosampler stability of 7 days at +7°C was demonstrated for all QC levels (bias from the initial concentration <20%). The two peptides concentration remained stable in the autosampler.

f. Carryover

No carryover was observed for the two peptides.

3. Application to the measurement of patient samples

As a proof of concept, the quantification strategy was further applied to five pools of patient serum samples on two independent experiments. The inter-assay precision ranged from 1.5% to 7.7% and from 6.5% to 10.5% for SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK, respectively (Table 4). The mean concentration was obtained with a precision below 5.1%. The concentration measured by immunoassay was higher than the one obtained by ID-LC-MS/MS, with a relative difference between ID-LC-MS/MS and immunoassay ranging from 18% to 55%.

Table 4: Individual peptide concentration and PCT concentration with inter-assay precision of the patient serum samples from two independent experiments.

	Immunoassay concentration (µg/L)	ID-LC-MS/MS						Relative difference between ID-LC-MS/MS and immunoassay (%) *
		SALESSPADPATLSEDEAR		FHTFPQTAIGVGAPGK		Mean of two peptides		
		Concentration (µg/L)	CV (%)	Concentration (µg/L)	CV (%)	Concentration (µg/L)	CV (%)	
Pool1	0.52	0.43	1.5	< LLOQ	-	-	-	-18.0%
Pool2	1.16	0.71	7.7	< LL0Q	-	-	-	-38.7%
Pool3	2.93	1.46	5.9	1.24	6.5	1.35	3.1	-53.9%
Pool4	6.48	3.01	2.9	2.82	10.5	2.92	5.1	-55.0%
Pool5	18.30	9.10	2.5	9.05	7.7	9.07	4.3	-50.4%

(*) relative difference = (LC-MS/MS-Immunoassay)/Immunoassay

4. Evaluation of measurement uncertainty

The uncertainty of individual peptide results was obtained by propagating uncertainty of the calibrator (u_{cal}), the uncertainty of the linear regression (u_{lin}) and uncertainty associated with the experimental precision t (u_{prec}). The uncertainty of the calibrator and the linear regression for each level of calibrators are presented in Supplemental data, Table S7 and Table S8. The relative expanded uncertainty of each concentration level of QC samples and pools of patient serum samples are summarized in Table 3. For all levels, the relative expanded uncertainty (k=2) was below 18% and below 30% when using the SALESSPADPATLSEDEAR peptide and the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide, respectively (Table 5). The relative uncertainties were lower for the results obtained using the SALESSPADPATLSEDEAR peptide. The relative expanded uncertainty (k=2) ranged from 7% to 18% for mean concentration, except for LLOQ FHTFPQTAIGVGAPGK and Pool1 samples (about 24%)

The relative contributions of the different components to the final uncertainty of individual peptide concentrations are presented in Supplemental data, Figure 1. The relative contribution of different components (u_{cal}, u_{lin} and u_{prec}) varied depending on the PCT concentration. The main contribution to the final uncertainty of low PCT concentrations was the uncertainty of the linear regression or the precision experiment, while for high PCT concentration, it was the uncertainty of the calibrator. Between the two peptides, the uncertainty from precision experiment was higher for the FHTFPQTAIGVGAPGK peptide.

Table 5: Relative expanded uncertainty of measurement results (k=2) for 6 QC materials and 5 pools of human serum

		SALESSPADPATLSEDEAR		FHTFPQTAIGVGAPGK		Mean of two peptides	
Level	Number of measurements	Concentration (µg/L)	$U_{k=2}$ (%)	Concentration (µg/L)	$U_{k=2}$ (%)	Concentration (µg/L)	$U_{k=2}$ (%)
LLOQ SALES	5*	0.25	17	< LLOQ	-	-	-
LLOQ FHT	6	0.54	11	0.47	30	0.51	23
QC1	9	1.00	11	0.94	16	0.97	13
QC2	9	3.95	10	3.99	11	3.97	7
QC3	8*	8.90	9	9.57	12	9.24	13
HLOQ	6	136.80	10	127.20	10	132.00	12
Pool1	3	0.43	11	< LLOQ2	-	-	-
Pool2	3	0.71	18	< LLOQ2	-	-	-
Pool3	6	1.46	12	1.24	15	1.35	24
Pool4	6	3.01	10	2.82	18	2.92	10
Pool5	6	9.10	9	9.05	14	9.07	8

(*) one sample was excluded due to sample loss during sample handling; (**) LLOQ1 corresponding to LLOQ when using SALESSPADPATLSEDEAR (SALES) peptide, LLOQ2 corresponding to LLOQ when using FHTFPQTAIGVGAPGK (FHT) peptide.

Discussion

We described here the validation of a candidate reference measurement procedure for the quantification of PCT in human serum by ID-LC-MS/MS. The quantification was carried out using a protein-based calibration strategy relying on the use of a PCT recombinant protein as primary calibrator and the corresponding isotope labelled recombinant protein as an internal standard. PCT was quantified through the quantification of two proteotypic peptides: SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK. The LLOQ was set at 0.25 µg/L for the quantification of PCT corresponding to the LLOQ of the SALESSPADPATLSEDEAR peptide. PCT quantification relies on the determination of the concentration of SALESSPADPATLSEDEAR for PCT concentration range 0.25-0.47 µg/L, and on mean concentration of SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK peptides for PCT concentration above 0.47 µg/L. The regression model proved to be linear from LLOQ 0.25 µg/L to 13.74 µg/L. Bias was +4.2% at LLOQ and between -6.2% and 6.3% for concentration above the LLOQ. Precision was 5.5% at the LLOQ and below 7.6% for concentration above the LLOQ. Quantification of samples above HLOQ was validated with a dilution factor of 20, which allow extending the measuring range up to 132.00 µg/mL.

In contrary to the other LC-MS/MS methods developed for the quantification of PCT [22–24], the present method relies on the use of a SIL-protein as an internal standard. The use of SIL-protein added at the beginning of the sample preparation process is considered as the ideal situation for protein quantification with the bottom-up approach because it allows compensating the bias caused by incomplete digestion or material loss occurring during the whole sample preparation and the LC-MS/MS analysis [25]. In a previous study, PCT quantification was carried out through peptide-based calibration and SIL-peptides as internal standards [24]. The FHTFPQTAIGVGAPGK peptide could not be used as quantifier peptide as it may be subject to miscleavage, which is not anymore a limitation since both endogenous and SIL-PCT are simultaneously proteolysed. With reference SIL-peptides a correction factor should be applied to compensate digestion incompleteness and material loss occurring before the digestion step, and the correction factor may vary over time which would be hardly detectable. In the present method, PCT quantification with low bias and high precision was archived without the use of a correction factor and through the quantification of both SALESSPADPATLSEDEAR and FHTFPQTAIGVGAPGK peptides for concentrations above 0.47 µg/L. These two selected peptides are located in two different regions of PCT and are not in the same region of epitopes usually targeted by commercially available immunoassays (Whicher, Bienvenu, and Monneret 2001). Therefore, measuring the two selected peptides allows to increase the specificity of the present method. Furthermore, as reported in the literature, PCT is present under three different isoforms characterized by the cleavage of one or two N-terminal amino acids [28]. Our method quantifies the total serum PCT, including these three isoforms as measured by the majority of commercially available immunoassays.

To establish results traceability to the SI units, the concentration of the primary calibrator was determined by amino acid analysis. The challenge associated with the development of a protein-based primary calibrator is the identification and quantification of all impurities containing the measured amino acids (proteins, peptides), which can be burdensome. To limit this issue as much as possible, the primary protein calibrator should be highly purified. Upon request, the recombinant protein was subjected to three orthogonal chromatography techniques consisting of ion exchange, reverse-phase and size exclusion chromatography in order to eliminate as many impurities as possible. The identity of protein standard

should be confirmed by combining intact mass analysis and top-down MS analysis using high-resolution mass spectrometry. The main impurity is an acetylated form of Met-PCT [3-116]. As the acetylation occurs on one of the three N-terminal residues of PCT (Met-Phe-Arg), this impurity affects neither the amino acid analysis results nor the LC-MS/MS quantification of the targeted peptides. The second major impurity is an oxidized form of PCT. Although it was not yet possible to unambiguously identify the oxidation site, however, the most frequent residues to be subjected to oxydation are methionine and cysteine, therefore, it does not affect the residues targeted by amino acid analysis (phenylalanine, proline, valine and leucine) and that these two residues are not localized in the sequence of the two proteotypic peptides. Four other impurities corresponding to modified or truncated forms of PCT were identified with low abundance (<0.6%). The truncated forms observed with a delta mass of about -1300 Da had a retention time close to the one of the recombinant protein. The two modified forms with delta mass of +29 Da and -17 Da also shows a coelution with the recombinant protein. The purification step performed, including size exclusion chromatography, and the retention time, suggest that these low abundant forms are artefacts generated during the LC-MS analysis and not present in the original sample. Therefore, the raw amino-acid analysis results were not corrected, which highlights the benefits of working with highly purified materials.

Calibration range and LLOQ of the method encompass the clinical range of PCT concentrations found in serum from patients with sepsis or septic shock. However, the analytical sensitivity of the candidate RMP is not yet sufficient to accurately measure PCT concentrations at physiological conditions or in the serum of patients with local infection (< 0.25 µg/L). As substantial discrepancies between immunoassays were reported in some EQA schemes targeting very low PCT concentrations [12], it would be desirable to improve the method's sensitivity. This improvement could be achieved either through instrumental developments (e.g. reducing LC flow rates, use of a more sensitive mass spectrometer) and/or through an improvement of the sample preparation step (e.g. use of immuno-enrichment).

In order to ensure that laboratory measurements are clinically usable, it has been recommended that no more than one-third of the maximum allowable uncertainty of routine assays should be consumed by higher-order references [29]. In addition to the correct implementation of calibration traceability, the achievement of appropriate analytical performance specifications for RMPs and CRMs is essential but can be challenging in the case of low abundant proteins like PCT. Relative expanded uncertainties of results obtained with our method are generally in the range of 7-18%, but in some cases, they reached up to 24%, which is probably too high. In the described method, the uncertainties associated to the value assignment of the primary calibrator, the linearity of the calibration curve and the precision of measurements appeared as the primary sources of measurement uncertainty but in the two cases were measurement uncertainties were larger, this situation was caused by a lack of consistency between concentrations of the two measured proteotypic peptides. This observation raises the question of whether some samples could contain different amounts of truncated forms of PCT, such as NProCT and calcitonin-KKR-katacalcin.

In a first attempt to apply the method and evaluate how results from the candidate RMP compare with those from immunoassays, five pools of frozen human serum were measured with the candidate RMP and the Brahms PCT sensitive Kryptor immunoassay as an example. The immunoassay reported results that were higher than those of the candidate RMP with the relative difference ranging from 18% to 55% (Table 4). This result could be explained by cross-reactivity issues as well as differences in calibration

and/or measurands. Although most PCT immunoassays employ two antibodies targeting different regions of PCT, it cannot be excluded that other forms than the three full-length isoforms of PCT are measured by immunoassays. It can thus be speculated that the immunoassays and the ID-LC-MS/MS method do not measure the same compounds. However, it should be noted that only five samples were measured, and only one immunoassay was involved.

Regardless of these considerations, the correlation between immunoassays and the candidate RMP should be established for all available immunoassays and not only Brahms PCT sensitive Kryptor immunoassay. Also, the correlation should be established using a much larger number of samples of proven commutability, which was not the case in the present study.

Conclusion

We developed an ID-LC-MS/MS method for the SI traceable quantification of PCT in human serum at a clinical cutoff concentration (0.25–13.74 µg/L) using a protein-based calibration approach. The use of recombinant protein as primary calibrator and as internal standard improved the method accuracy, compared to a previously developed method based on peptide calibrators for which a correction factor was required to account for incomplete digestion and material loss during sample preparation. The present method thus appears suitable to determine PCT concentration in EQA materials and secondary CRMs that could be used to monitor the accuracy and comparability of commercially available immunoassays for PCT at clinically relevant concentrations. Before the method can be used for standardization purposed, the need and feasibility for recalibrating all immunoassays need to be investigated, and the first step will be to correlate of all major immunoassays with the candidate RMP using a large panel of commutable materials. If improving comparability of results provided appears to be desirable and if standardization of calibration through the use of standard calibrators value assign with the RMP appears as the best way to do so, it will be necessary to evaluate the feasibility and the impact of assays recalibration. Indeed, a change in calibration could imply revising the clinical decision limits, which could be confusing for the medical community and costly for the assay manufacturers.

Funding

This work was supported by the European Metrology Programme for Innovation and Research (EMPIR) joint research projects [15HLT07] "AntiMicroResist" and [18HLT03] "SEPTIMET" which have received funding from the EMPIR programme co-financed by the Participating States and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme. Huu-Hien Huynh and Maxence Derbez-Morin were supported by a CIFRE scholarship provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). Mass spectrometry equipment was supported by SESAME 2018 n°EX039194 of Région Ile-de-France and IBiSA 2019 grants.

Acknowledgements:

We want to thank Dr Yizhao Chen from Health Sciences Authority (HAS) of Singapore for scientific discussions.

References

[1] P. Schuetz, Y. Wirz, R. Sager, M. Christ-Crain, D. Stolz, M. Tamm, L. Bouadma, C.E. Luyt, M. Wolff, J. Chastre, F. Tubach, K.B. Kristoffersen, O. Burkhardt, T. Welte, S. Schroeder, V. Nobre, L. Wei, H.C. Bucher, N. Bhatnagar, D. Annane, K. Reinhart, A. Branche, P. Damas, M. Nijsten, D.W. de Lange, R.O. Deliberato, S.S. Lima, V. Maravić-Stojković, A. Verduri, B. Cao, Y. Shehabi, A. Beishuizen, J.-U.S. Jensen, C. Corti, J.A. Van Oers, A.R. Falsey, E. de Jong, C.F. Oliveira, B. Beghe, M. Briel, B. Mueller, Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections, Cochrane Database Syst. Rev. 10 (2017) CD007498. https://doi.org/10.1002/14651858.CD007498.pub3.

[2] G.A. Wanner, M. Keel, U. Steckholzer, W. Beier, R. Stocker, W. Ertel, Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients, Crit. Care Med. 28 (2000) 950–957. https://doi.org/10.1097/00003246-200004000-00007.

[3] R. Sager, A. Kutz, B. Mueller, P. Schuetz, Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited, BMC Med. 15 (2017) 15. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0795-7.

[4] P. Schuetz, A. Beishuizen, M. Broyles, R. Ferrer, G. Gavazzi, E.H. Gluck, J. González Del Castillo, J.-U. Jensen, P.L. Kanizsai, A.L.H. Kwa, S. Krueger, C.-E. Luyt, M. Oppert, M. Plebani, S.A. Shlyapnikov, G. Toccafondi, J. Townsend, T. Welte, K. Saeed, Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use, Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) 1308–1318. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1181.

[5] S. Harbarth, K. Holeckova, C. Froidevaux, D. Pittet, B. Ricou, G.E. Grau, L. Vadas, J. Pugin, Geneva Sepsis Network, Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 (2001) 396–402. https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.3.2009052.

[6] P. Schuetz, W. Albrich, B. Mueller, Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future, BMC Med. 9 (2011) 107. https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-107.

[7] H.H. Huynh, A. Boeuf, J. Vinh, V. Delatour, IFCC WG-PCT, Evaluation of the necessity and the feasibility of the standardization of procalcitonin measurements: activities of IFCC WG-PCT with involvement of all stakeholders, (submitted).

[8] M. Dipalo, L. Guido, G. Micca, S. Pittalis, M. Locatelli, A. Motta, V. Bianchi, T. Callegari, R. Aloe, G. Da Rin, G. Lippi, Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays, Pract. Lab. Med. 2 (2015) 22–28. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2015.07.001.

[9] A.B. Chambliss, J. Hayden, J.M. Colby, Evaluation of procalcitonin immunoassay concordance near clinical decision points, Clin. Chem. Lab. Med. 57 (2019) 1414–1421. https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1362.

[10] G. Lippi, G.L. Salvagno, M. Gelati, M. Pucci, C. Lo Cascio, D. Demonte, D. Faggian, M. Plebani, Two-center comparison of 10 fully-automated commercial procalcitonin (PCT) immunoassays, Clin. Chem. Lab. Med. 58 (2019) 77–84. https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0888.

[11] O. Ruzzenente, G.L. Salvagno, M. Gelati, G. Lippi, Analytical evaluation of the novel Lumipulse G BRAHMS procalcitonin immunoassay, Pract. Lab. Med. 6 (2016) 8–13. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2016.07.001.

[12] H.H. Huynh, A. Boeuf, J. Pfannkuche, P. Schuetz, M. Plebani, P. Kaiser, M. Thelen, T. Badrick, A. Kessler, B. Poggi, G. Nordin, U. Tiikkainen, G. Davies, D. Kesseler, J. Vinh, V. Delatour, Harmonization status of procalcitonin measurements: what correlation studies and EQA schemes tell us ?, (submitted).

[13] M. Panteghini, Traceability, reference systems and result comparability, Clin. Biochem. Rev. 28 (2007) 97–104.

[14] G.H. White, Metrological traceability in clinical biochemistry, Ann. Clin. Biochem. 48 (2011) 393–409. https://doi.org/10.1258/acb.2011.011079.

[15] D. Armbruster, Metrological Traceability of Assays and Comparability of Patient Test Results, Clin. Lab. Med. 37 (2017) 119–135. https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.09.010.

[16] A.F. Torma, K. Groves, S. Biesenbruch, C. Mussell, A. Reid, S. Ellison, R. Cramer, M. Quaglia, A candidate liquid chromatography mass spectrometry reference method for the quantification of the cardiac marker 1-32 B-type natriuretic peptide, Clin. Chem. Lab. Med. CCLM. 55 (2017) 1397–1406. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1054.

[17] T.T.H. Tran, J. Lim, J. Kim, H.-J. Kwon, G.C. Kwon, J.-S. Jeong, Fully international system of units-traceable glycated hemoglobin quantification using two stages of isotope-dilution high-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1513 (2017) 183–193. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.056.

[18] A. Leinenbach, J. Pannee, T. Dülffer, A. Huber, T. Bittner, U. Andreasson, J. Gobom, H. Zetterberg, U. Kobold, E. Portelius, K. Blennow, IFCC Scientific Division Working Group on CSF proteins, Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid-β in cerebrospinal fluid, Clin. Chem. 60 (2014) 987–994. https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.220392.

[19] J.-O. Jeppsson, U. Kobold, J. Barr, A. Finke, W. Hoelzel, T. Hoshino, K. Miedema, A. Mosca, P. Mauri, R. Paroni, L. Thienpont, M. Umemoto, C. Weykamp, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood, Clin. Chem. Lab. Med. 40 (2002) 78–89. https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.016.

[20] P. Kaiser, T. Akerboom, L. Dux, H. Reinauer, Modification of the IFCC reference measurement procedure for determination of HbA1c by HPLC-ESI-MS, GMS Ger. Med. Sci. 4 (2006). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2703220/ (accessed April 6, 2020).

[21] T. Kinumi, R. Mizuno, A. Takatsu, Quantification of serum C-peptide by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: enhanced detection using chemical modification and immunoaffinity purification, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 953–954 (2014) 138–142. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.019.

[22] B. Krastins, A. Prakash, D.A. Sarracino, D. Nedelkov, E.E. Niederkofler, U.A. Kiernan, R. Nelson, M.S. Vogelsang, G. Vadali, A. Garces, J.N. Sutton, S. Peterman, G. Byram, B. Darbouret, J.R. Pérusse, N.G. Seidah, B. Coulombe, J. Gobom, E. Portelius, J. Pannee, K. Blennow, V. Kulasingam, L. Couchman, C. Moniz, M.F. Lopez, Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum, Clin. Biochem. 46 (2013) 399–410. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.12.019.

[23] C. Dubois, Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides., Université Paris-Saclay, 2019.

[24] H.H. Huynh, A. Boeuf, M. Derbez-Morin, A.M. Dupuy, B. Lalère, J. Vinh, V. Delatour, Development of an antibody free ID-LC MS method for the quantification of procalcitonin in human serum at sub-nanogram per milliliter level using a peptide-based calibration, (submitted).

[25] E. Nouri-Nigjeh, M. Zhang, T. Ji, H. Yu, B. An, X. Duan, J. Balthasar, R.W. Johnson, J. Qu, Effects of Calibration Approaches on the Accuracy for LC–MS Targeted Quantification of Therapeutic Protein, Anal. Chem. 86 (2014) 3575–3584. https://doi.org/10.1021/ac5001477.

[26] ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement (Part 3. Guide to the expression of uncertainty in measurement GUM:1995), (2010).

[27] J. Whicher, J. Bienvenu, G. Monneret, Procalcitonin as an Acute Phase Marker, Ann. Clin. Biochem. 38 (2001) 483–93.

[28] S. Wrenger, T. Kähne, C. Bohuon, W. Weglöhner, S. Ansorge, D. Reinhold, Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV), FEBS Lett. 466 (2000) 155–159. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01779-2.

[29] F. Braga, M. Panteghini, Defining permissible limits for the combined uncertainty budget in the implementation of metrological traceability, Clin. Biochem. 57 (2018) 7–11. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.007.

A candidate high-resolution mass spectrometry-based reference method for the quantification of procalcitonin in human serum using a characterized recombinant protein as primary calibrator

Huu-Hien Huynh, Vincent Delatour, Maxence Derbez-Morin, Qinde Liu, Joëlle Vinh, Amandine Boeuf

Supplemental data

Supplemental document. Preparation of solutions

All steps of preparation of solution were performed gravimetrically using calibrated precision balances.

1. **Stock solutions and working solutions**

Individual primary stock solutions were gravimetrically prepared in human serum for Met-PCT [3-116] and SIL-protein Met-PCT at 12.18 µg/g and 14.23 µg/g, respectively. Solutions were aliquoted and stored at -80 °C ± 10 °C.

The individual primary stock solutions of Met-PCT [3-116] and SIL-protein Met-PCT were diluted with human serum to obtain individual working solutions of unlabelled protein and labelled protein at 22.15 ng/g and 44.93 ng/g, respectively. Solutions were aliquoted and stored at -80 °C ± 10 °C.

2. **Protein calibrators and internal quality control materials**

Six points calibration curves were prepared by mixing an increasing amount of Met-PCT [3-116] working solution and a constant amount of SIL-protein Met-PCT working solution with a quantity ratio of peptides ranging from 0.14 to 12.10 (corresponding to a PCT concentration from 0.25 µg/L to 21.29 µg/L).

Three quality control (QC) materials were prepared by mixing three different amounts of Met-PCT [3-116] working solution and a constant amount of SIL-protein Met-PCT working solution to reach a quantity ratio of 0.51, 2.03 and 5.08 (corresponding to a PCT concentration of 0.88, 3.61 and 8.93 µg/L, respectively). The Met-PCT [3-116] working solutions used for the preparation of calibration solutions and QC materials were prepared from two different aliquots of the individual primary stock solutions.

3. **Protein samples for dilution test**

PCT samples at 135 µg/L were prepared by diluting Met-PCT [3-116] working solution in human serum. This solution was then diluted with human serum by a factor of about 20 to prepare six PCT sample at 6.77 µg/L. The diluted PCT samples were then mixed with SIL-protein Met-PCT working solution to reach a concentration of 6.52 µg/L.

Supplemental Table S1: Mass spectrometry parameters for intact protein analysis

Parameter	Value
Spray voltage (V)	3500
Sheath gas flow rate*	35
Sweep gas flow rate*	1
Auxiliary gas heater temperature (°C)	200
Auxiliary gas flow rate	10
Capillary temperature (°C)	250
S-lens RF level*	50
Resolution	35000
Scan range (m/z)	400-1500
AGC target	$1^{E}6$

(*) arbitrary units

Supplemental Table S2: Mass spectrometry parameters for protein top-down analysis

	Parameter	Value
	Spray voltage (V)	2500
	Sheath gas flow rate*	10
	Sweep gas flow rate*	0
	Auxiliary gas heater temperature (°C)	140
	Auxiliary gas flow rate	5
	Capillary temperature (°C)	300
	S-lens RF level*	30
MS analysis	Orbitrap resolution	120000
	Scan range (m/z)	500-2000
HCD mode	Orbitrap resolution	120000
	HCD collision energy (%)	35
	Isolation window (m/z)	1.8
	Filter at precursor level (m/z)	908-945
CID mode	Orbitrap resolution	120000
	CID collision energy (%)	35
	Isolation window (m/z)	1.8
	Filter at precursor level (m/z)	908-945
EThCD mode	Orbitrap resolution	120000
	ETD reaction time (ms)	2.5
	Isolation window (m/z)	1.8
	Filter at precursor level (m/z)	908-945
	SA Collision Energy (%)	35
UVPD mode	Orbitrap resolution	120000
	UVPD activation time (ms)	100
	Isolation window (m/z)	1.8
	Filter at precursor level (m/z)	908-945

(*) arbitrary units

***Supplemental Table S3**. Amino acid sequence, retention time and PRM parameters for the detection of two selected peptides and its internal standards.*

Proteotypic peptide	Retention time (min)	Precursor ion		Collision energy (eV)	Fragment ion		
		ion	m/z		ion	m/z	Type
SALESSPADPATLSEDEAR	19.2	$[M+2]^{2+}$	973.4529	35	y13+	1371.6387	quantifier
					y10+	1088.5218	qualifier
SALESSPADPATLSEDEA**R**[$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]	19.2	$[M+2]^{2+}$	978.4570	35	y13+	1381.6469	quantifier
					y10+	1098.5301	qualifier
FHTFPQTAIGVGAPGK	14.9	$[M+3]^{3+}$	543.2912	20	y7+	585.3355	quantifier
					y3+	301.187	qualifier
FHTFPQTAIGVGAPG**K**[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]	14.9	$[M+3]^{3+}$	545.9626	20	y7+	593.3497	quantifier
					y3+	309.2012	qualifier

Supplemental Table S4. AAA results obtained at different conditions of gas-phase hydrolysis, each condition was evaluated in four processed replicates.

Hydrolysis conditions	Concentration (µg/g) (CV %, n = 4)				Average of four amino acids (µg/g) (CV %)
	Leu	Phe	Pro	Val	
110 °C, 40 h	814.4 (1.0)	808.7 (1.4)	804.7 (1.3)	814.4 (1.0)	819.5 (2.6)
130 °C, 24h	871.0 (1.6)	867.3 (0.5)	866.4 (2.1)	882.5 (3.3)	871.8 (0.9)
130 °C, 40h	878.2 (1.9)	864.4 (1.8)	881.2 (2.1)	941.3 (2.1)	891.3 (3.8)
130 °C, 72h	851.1 (3.5)	839.2 (3.0)	848.4 (4.9)	881.5 (5.4)	855.1 (2.1)
150 °C, 40h	775.6 (1.1)	773.5 (1.5)	783.2 (0.8)	873.6 (1.3)	805.5 (6.0)

Supplemental Table S5. Main impurities of the stock solution of primary calibrator obtained by HRMS

Monisotopic mass	Retention time (min)	Peak area	Mass difference compared to Met-PCT	Area ratio
12749.1456 (Met-PCT)	15.83	1.4E+09	-	100.00%
12765.1029	15.65	7.1E+07	15.9573	5.07%
12791.1566	18.19	3.0E+07	42.0110	2.14%
11380.4462	16.97	7.4E+06	-1368.6994	0.53%
12778.0834	15.61	7.3E+06	28.9378	0.52%
12732.0461	15.78	6.4E+06	-17.0995	0.46%
11458.5201	16.18	1.4E+06	-1290.6255	0.10%

Supplemental Table S6. Data detailing calibration curves for each selected peptide. Results obtained by the mean of two transitions per peptide.

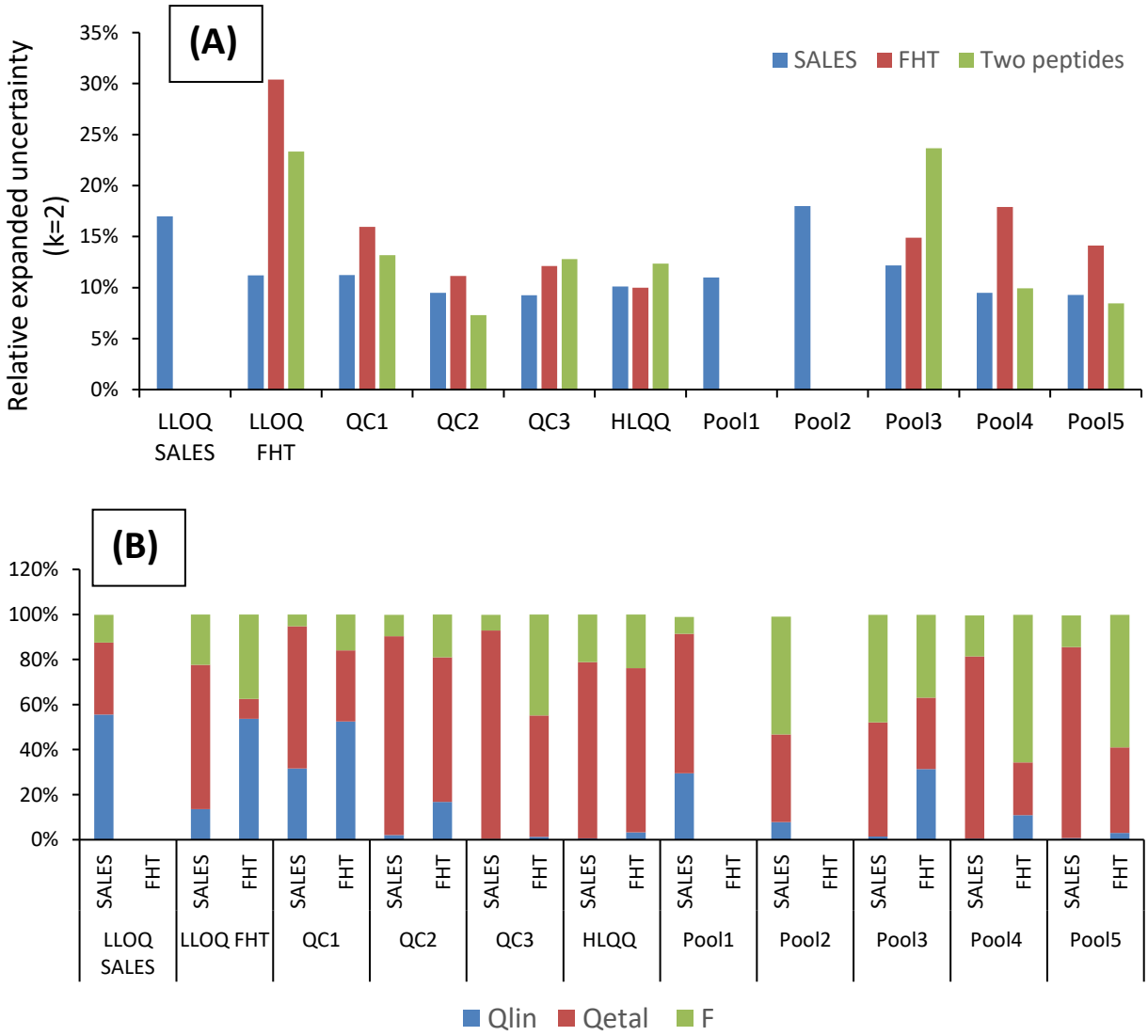
	Theorical concentration (µg/L)	Day 1	Day 2	Day 3	Mean	CV
SALESSPADPATLSEDEAR peptide						
Slope		0.9859	0.9641	1.0232	0.9911	3.0%
R2		0.9999	1.0000	0.9998	0.9999	
Bias (%)	0.23	1.2%	14.8%	14.2%		
	0.45	-2.8%	6.2%	14.3%		
	0.98	-0.9%	0.5%	-2.7%		
	2.27	-0.4%	-2.0%	-3.6%		
	4.55	0.8%	-0.7%	-0.2%		
	13.74	-0.1%	0.1%	0.1%		
FHTFPQTAIGVGAPGK peptide						
Slope		0.7745	0.7666	0.7825	0.7746	1.0%
R2		0.9995	0.9994	0.9981	0.9990	
Bias (%)	0.45	4.4	-8.8	-2.8		
	0.98	-11.8	-0.2	-2.5		
	2.27	-1.4	0.0	-1.3		
	4.55	3.8	1.1	1.9		
	13.74	-0.3	-0.1	-0.2		

Supplemental Table S7. *Example of uncertainties of the calibrators spiked in serum (u_{cal})*

Calibrator	Concentration (µg/L)	Uncertainty (µg/L)	Relative uncertainty (k=1) (%)
Cal 6	13.75	0.61	4.45%
Cal 5	4.53	0.20	4.45%
Cal 4	2.25	0.10	4.45%
Cal 3	0.90	0.04	4.45%
Cal 2	0.45	0.02	4.46%
Cal 1	0.26	0.01	4.48%
Cal 0	0	-	-

Supplemental Table S8. Example of uncertainties of the linear regression (u_{lin})

Calibrator	Quantity ratio L/H	Peak area ratio L/H	Uncertainty	Relative uncertainty (k=1) (%)
Cal 6	7.74	7.62	0.0195	0.3
Cal 5	2.61	2.59	0.0082	0.3
Cal 4	1.28	1.26	0.0079	0.6
Cal 3	0.56	0.54	0.0086	1.6
Cal 2	0.24	0.23	0.0091	3.9
Cal 1	0.12	0.12	0.0093	7.7
Cal 0	0	0		--



Supplemental Figure 1: Uncertainty estimation. (A)Relative expanded uncertainties of the individual peptide results and the final results. (B) Relative contribution of different components to the final uncertainty of individual peptide results: uncertainty of the calibrator (u_{cal}), the uncertainty of the linear regression (u_{lin}) and the precision experiment (u_{prec}).

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse étaient dans un premier temps d'évaluer l'état actuel de la comparabilité des résultats obtenus par les différentes méthodes de dosage pour documenter et comprendre la variabilité des résultats observée et dans un second temps de développer une méthode référence candidate d'ordre supérieur pour la quantification absolue de la PCT dans le sérum humain par la méthode ID-LC-MS.

Afin d'évaluer la nécessité d'établir la traçabilité métrologie des résultats de dosages de la PCT aux unités SI, une étude bibliographique des études de corrélations et une analyse des données obtenues par les campagnes d'EEQ a été menée. Malgré une dispersion des résultats observée entre les méthodes, et en particulier au sein des méthodes du groupe Brahms où un effort d'harmonisation a pourtant été initié, l'état actuel de la comparabilité des résultats obtenus entre les différentes méthodes reste à être démontré correctement. En effet, la commutabilité des matériaux EEQ utilisés lors de ces campagnes n'a pas été évaluée, ce qui ne permet pas de déterminer si les variabilités observées sont réellement dues aux méthodes elles-mêmes et/ou des effets de matrice imputables aux échantillons de contrôle. L'étude réalisée démontre le besoin de disposer de matériaux commutables pour évaluer la comparabilité des résultats de mesure de la PCT et la nécessité de mieux comprendre l'origine des différences observées. Ainsi, il est prévu d'organiser une étude de commutabilité afin d'identifier et qualifier des échantillons de contrôle de qualité adaptés à l'évaluation de la comparabilité des résultats. Un certain nombre de difficultés devront être levées, telles que la sélection des méthodes impliquées dans l'étude, les modalités de dosage, le nombre, le volume et la concentration des échantillons servant à caractériser la commutabilité des matériaux de contrôle et le choix de ces derniers. La première étape consiste à définir pour quels échantillons la commutabilité sera évaluée. Plusieurs possibilités vont être évaluées : le mélange des échantillons de faibles et fortes concentrations, l'ajout de la PCT recombinante venant de différentes sources, l'impact de la lyophilisation et de la congélation). Comme la nature de la matrice est susceptible d'impacter le comportement de ces échantillons, il sera intéressant d'évaluer le comportement de ces différents types d'échantillons, ce qui sera possible en analysant la commutabilité des échantillons de contrôle utilisés par les différents organisateurs d'EEQ. La seconde étape consiste à sélectionner les méthodes pour lesquelles la commutabilité d'échantillons de contrôle sera évalué. Il est nécessaire que l'études impliquent l'ensemble des méthodes de dosage pour juger la comparabilité des résultats de l'ensemble des méthodes disponibles. Dans le cas idéal, les méthodes de dosage impliquées doivent d'une part avoir une sélectivité comparable et d'autre part une fidélité suffisante. Pourtant, très peu d'informations sont disponibles concernant les entités réellement mesurées par les immunoessais actuels (formes tronquées, isoformes) et certaines méthodes présentent parfois une fidélité perfectible, en particulier pour les concentrations basses de la PCT. Par conséquent, il est possible que les résultats de l'étude soient difficiles à interpréter. L'étape suivante consiste à sélectionner les échantillons utilisés pour qualifier la commutabilité des

échantillons de contrôle. La principale contrainte concernant la sélection des échantillons utilisés pour caractériser la commutabilité des échantillons de contrôle réside dans le fait qu'idéalement, ceux-ci doivent être le plus proches possible d'échantillons de patient, c'est-à-dire des échantillons frais obtenus d'un donneur unique et n'ayant subi aucune modification. Cependant, il est difficilement envisageable d'obtenir des échantillons frais obtenus à partir d'un donneur unique en quantité suffisamment importante pour couvrir toutes les méthodes participantes et que ces échantillons soient analysés dans un délai suffisamment court en raison de la stabilité limitées des échantillons frais.

La chaine de traçabilité au SI n'est actuellement pas établie pour les mesures de la PCT en raison de l'absence de matériaux de référence certifiés et de méthode de référence d'ordre supérieur. Afin de pallier ce manque, une méthode de référence candidate d'ordre supérieur pour le dosage de la PCT dans le sérum humain par la méthode ID-LC-MS a été développée au cours de ce projet à l'interface entre la protéomique quantitative et la métrologie. La dilution isotopique est communément mise en œuvre pour le développement de méthode de référence afin de minimiser les variabilités entre les échantillons (effets matrice, pertes de la protéine ou des peptides lors de la préparation d'échantillon) et ainsi les biais de quantification. Lors du développement d'un système de référence, il est nécessaire de s'assurer que la méthode de référence et les méthodes de dosage en routine mesurent les mêmes formes de l'analyte. Or, les méthodes de dosage de routine de la PCT sont nombreuses et possèdent potentiellement des spécificités différentes, dues à l'utilisation de différentes méthodes pour capturer la protéine PCT (anticorps monoclonaux ou polyclonal, dont le nombre peut varier) et différentes méthodes de détection. Le mesurande annoncé par les fabricants de DMDIV est la PCT humaine, seulement la forme réellement mesurée par les méthodes de routine n'est pas clairement décrite. Seules quelques méthodes, telles que la méthode Liaison Brahms ou Lumipulse Brahms, décrivent les deux épitopes ciblés par les anticorps utilisés, situés sur les parties calcitonine et katacalcine de la protéine. Ainsi, les trois isoformes circulantes de la PCT en cas de sepsis (PCT(1-116), PCT(2-116) et PCT(3-116)) ne semblent pas être discriminées par les méthodes de routine. Le mesurande a ainsi été défini comme la concentration de la PCT totale (incluant les trois isoformes circulantes) dans le sérum humain mesurée par le biais de deux peptides protéotypiques de la PCT : SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK. Le premier peptide est situé sur la section N-terminale de la PCT, le second sur la section calcitonine-KKR-katacalcine. Par conséquent, la quantification du peptide SALESSPADPATLSEDEAR prendra en compte la présence des trois isoformes de la PCT et la forme de clivage N-terminal, tandis que celle réalisée par le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK reflète la présence des trois isoformes de la PCT et la forme de clivage calcitonine-KKR-katacalcine. En analysant du sérum d'individu sain non enrichi en PCT recombinante, les formes de clivage N-terminale et calcitonine-KKR-katacalcine n'ont pas été détectées dans l'extrait après l'étape de précipitation protéique et de purification des protéines. Cependant, en l'absence de standards de ces deux formes, il n'a pas été possible de vérifier si ces formes sont réellement absentes après la purification des protéines ou si elles ne sont pas détectées

par la méthode décrite. Par conséquent, il s'avère nécessaire d'assurer la bonne concordance entre les résultats obtenus par les deux peptides pour exclure la présence d'autres formes contenant les peptides SALESSPADPATLSEDEAR et FHTFPQTAIGVGAPGK. Cela permet d'assurer la spécificité de la méthode pour une quantification de la PCT totale comprenant les trois isoformes.

Le principal challenge rencontré lors du développement de la méthode de quantification par ID-LC-MS a été le niveau de concentration de la protéine PCT à atteindre pour disposer d'une méthode de référence pertinente cliniquement. En effet, les seuils de décision clinique les plus bas sont de 0,5 ng/mL pour le diagnostic du sepsis et de 0,25 ng/mL à 0,5 ng/mL pour l'initiation et la gestion du traitement antibiotique. De plus, ce challenge a été accru par le choix de s'affranchir de l'utilisation des anticorps spécifiques à la PCT couramment utilisés dans les méthodes de dosage en routine. En effet, une approche de purification des protéines basée sur les propriétés physicochimiques des protéines du sérum a été retenue afin de disposer d'une méthode de référence indépendante des méthodes de routine ne présentant pas les mêmes biais de quantification (réactivité croisée, la perte de formes de la PCT non reconnues par les anticorps). L'ensemble de ces points a nécessité la réalisation de nombreuses optimisations afin d'atteindre la limite de quantification désirée. Dans un premier temps, l'optimisation a principalement porté sur la séparation chromatographique en faisant varier les différents paramètres influents (nature de la phase mobile organique, agent d'appariement d'ion, débit, température, gradient d'élution) et la détection en spectrométrie de masse (paramètres de source et de fragmentation). Dans un second temps, l'optimisation a porté sur la préparation d'échantillon, qui a été rigoureusement étudiée afin d'améliorer la sensibilité de la méthode et de réduire la complexité de l'échantillon. Une étape de dénaturation des protéines par l'agent SDC, suivi par une précipitation protéique, une extraction en phase solide au niveau protéique puis au niveau peptidique ont été implémentées pour la quantification de la PCT. Cette optimisation du protocole de préparation d'échantillon a été longue mais nécessaire pour atteindre la limite de quantification désirée avec la stratégie de quantification adoptée pour le développement d'une méthode de référence candidate.

Le choix de la stratégie d'étalonnage de la méthode de quantification en matrice et de la nature des étalons primaires utilisés demeure un point clé pour le développement de la méthode de référence candidate, en particulier pour assurer le raccordement des résultats aux unités SI. Cette traçabilité aux unités du SI est assurée par l'utilisation d'un étalon primaire d'ordre supérieur dont la pureté a été caractérisée en accord avec l'état de l'art métrologique. Dans le cas idéal, ces étalons primaires doivent être similaires à la PCT endogène de manière à produire des solutions étalons en matrice qui sont soumises aux mêmes étapes de préparation que les échantillons. Cela nécessite donc de disposer d'une protéine recombinante comme étalon primaire. Cependant, la caractérisation de la pureté d'une protéine recombinante représente un défi technique important et leur production est couteuse. L'utilisation de peptides synthétiques comme étalons primaires représente alors

une alternative. Les deux approches d'étalonnage peptidique et protéique ont été évaluées dans le cadre de ce projet afin de sélectionner l'approche la plus adaptée pour développer la méthode de référence. Selon les stratégies d'étalonnage, deux types d'étalon interne ont été utilisés : des peptides marqués avec les isotopes stables de même séquence que les peptides protéotypiques et une protéine recombinante marquée avec les isotopes stables de même séquence que la protéine d'intérêt. Les performances de ces deux approches ont été évaluées à travers les deux méthodes de quantification décrites ci-dessous.

Pour la méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain par l'approche d'étalonnage peptidique, le peptide SALESSPADPATLSEDEAR a été utilisé comme peptide de quantification et le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK comme peptide de confirmation. Dans ce contexte, l'étalon primaire est donc une solution pure du peptide SALESSPADPATLSEDEAR. La quantification de cet étalon primaire peptidique a été réalisée par l'approche PICAA. Les impuretés peptidiques ont été identifiées par spectrométrie de masse haute résolution et quantifiées relativement au peptide d'intérêt. Douze impuretés ont été identifiées et quantifiées dans la solution de l'étalon primaire avec une fraction massique relative de 0,10 % à 0,64 % par rapport au peptide d'intérêt SALESSPADPATLSEDEAR. La concentration finale de l'étalon primaire du peptide a été obtenue par la soustraction des contributions des impuretés au résultat brut des analyses d'acides aminés. Ainsi, la fraction massique finale est de 1206 ± 39 µg/g avec une incertitude élargie relative de 3,3 %. Cette incertitude étant suffisamment faible pour répondre au besoin de la méthode de quantification de la PCT afin d'assurer une faible incertitude sur le résultat de quantification de la PCT dans le sérum, cet étalon primaire a donc été utilisé pour la quantification de la PCT. La méthode de quantification de la PCT par un étalonnage peptidique présente un faible biais entre -2,6 % et 4,3 % et une fidélité intermédiaire inférieure à 2,2 % pour les échantillons de contrôle de qualité de type peptidique. Pour la quantification de la PCT via le peptide SALESSPADPATLSEDEAR, il a été nécessaire d'appliquer un facteur de correction de 2,61 afin de compenser les pertes de matériel et les variabilités associées aux étapes de préparation d'échantillon au niveau protéique et de digestion tryptique. Ce facteur de correction a été déterminé avec une fidélité de 10 % en évaluant différents niveaux de concentration répartis sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage sur deux expériences indépendantes. Cette méthode a permis de quantifier des échantillons de sérum supplémentés en PCT recombinante à une concentration de 0,25 ng/mL avec une fidélité intermédiaire inférieure à 9,1 % et un biais de -1,9 %. La nécessité d'utiliser un facteur de correction dont la variabilité à long terme n'est pas encore rigoureusement documentée et le manque de spécificité dû à l'utilisation d'un seul peptide pour la quantification de la PCT ne permet pas d'envisager l'utilisation de cette méthode comme méthode de référence.

Pour la méthode de quantification de la PCT dans le sérum humain par l'approche d'étalonnage protéique, un travail comparable à celui effectué pour la caractérisation de l'étalon primaire peptidique a été réalisé sur une solution de protéine recombinante. Cependant, la caractérisation de l'étalon primaire protéique présente plus de difficultés

techniques. L'identification de la protéine d'intérêt et des impuretés d'origine protéique par spectrométrie de masse haute résolution a été complétée par des analyses de spectrométrie de masse avec une approche *top-down*. Six impuretés principales de l'étalon primaire ont été identifiées par l'analyse de HRMS en mode masse intacte. Le traitement de données de l'approche *top-down* doit être poursuivi mais a permis de confirmer une impureté majeure : la forme acétylée de la protéine en N-terminal. Les impuretés identifiées à ce stade n'impactant pas la quantification par analyse des acides aminés, aucune correction n'a été apportée. La fraction finale de la PCT dans l'étalon primaire est de 807 ± 72 µg/g (k=2) avec une incertitude élargie relative de l'ordre de 8,9 %. L'étalon primaire a été utilisé pour la suite de ce travail. La méthode de quantification de la PCT par un étalonnage protéique a permis d'atteindre une limite de quantification de 0,25 ng/mL pour le peptide SALESSPADPATLSEDEAR et de 0,47 ng/mL pour le peptide FHTFPQTAIGVGAPGK. La concentration finale de la PCT est déterminée par la moyenne de la concentration des deux peptides pour les concentrations supérieures à 0,47 ng/mL et uniquement par le peptide SALESSPADPATLSEDEAR pour une concentration inférieure à cette valeur. Les dosages à des concentrations proches des limites de quantification ont été rapportées avec un faible biais de 4,2 % et une fidélité intermédiaire se traduisant par un CV de 5,5 % pour la concentration finale de 0,25 ng/mL et un biais de -0,7 % et un CV de 7,5 % pour la concentration finale de 0,51 ng/mL. Ces résultats répondent aux critères de validation de méthode de l'Agence européenne des médicaments (EMA) et de l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA). Cette stratégie a confirmé sa supériorité en termes de spécificité et de justesse de mesure par rapport à la stratégie d'étalonnage peptidique. En effet, cette méthode développée a permis de quantifier la PCT dans le sérum par le biais de deux peptides protéotypiques et d'éviter l'utilisation d'un facteur de correction lié aux rendements de purification et de digestion. De plus, ces résultats ont également confirmé les bénéfices de l'utilisation de la protéine recombinante marquée par rapport aux peptides marqués. Par conséquent, la méthode basée sur la stratégie d'étalonnage protéique en utilisant la protéine recombinante marquée est plus appropriée pour le développement de la méthode de référence dans le cadre d'une chaîne de traçabilité métrologique. Cette méthode développée a été ensuite comparée aux méthodes de quantification de la PCT publiées.

Les deux méthodes de quantification développées dans le cadre de cette thèse présentent une limite de quantification de 0,25 ng/mL à partir d'une prise d'essai de 500 µL de sérum plus faible que celle observée par Krastins et *al.* (1 ng/mL avec une prise d'essai de 1mL sérum et une étape d'immunoprécipitation au niveau des protéines) (183). La méthode de référence candidate est donc plus performante car elle utilise deux fois moins de sérum (0,5 mL contre 1 mL) et présente une limite de quantification quatre fois plus faible. Une étude récente sur la quantification de la PCT a été rapporté dans le manuscrit de thèse du Docteur Dubois avec une limite de détection de 0,1 ng/mL et une prise d'essai de 100 µL de plasma (184). Cependant la méthode développée lors de cette étude a mis en œuvre une immunoprécipitation au niveau peptidique et un système chromatographique de type

capillaire LC (colonne de 300 µm de diamètre interne, débit de 6 µL/min). La limite de quantification de la méthode de référence candidate de 0,25 ng/mL a, quant à elle, été obtenue sur un système chromatographique de type micro LC (colonne de 1 mm de diamètre interne, débit de 80 µL/min) sans recours à l'utilisation des anticorps.

Cependant, cette limite de quantification extrêmement encourageante pour la quantification d'une protéine dans un milieu complexe, ne permet pas de couvrir la gamme de la concentration de la PCT en conditions physiologiques (0,05 ng/mL) ou en cas d'infections locales ayant une concentration inférieure à 0,25 ng/mL (concentration mesurée avec une méthode de type immunoessai). A ce stade, la méthode de référence candidate permet déjà d'assigner des valeurs de référence à des matériaux de référence certifiés et des échantillons de contrôle de qualité utilisés lors de campagnes d'EEQ pour évaluer la comparabilité et l'exactitude de résultats de mesure à des seuils cliniques supérieures à 0,25 ng/mL. Pour que la méthode développée soit utilisée pour la standardisation des méthodes de routine si celle-ci est considérée nécessaire, la sensibilité de cette méthode de quantification doit couvrir la limite de quantification des méthodes de dosage de routine variant de 0,05 ng/mL à 0,2 ng/mL. Plusieurs possibilités permettant d'améliorer la sensibilité peuvent être envisagées. Une première option est d'augmenter le volume de la prise d'essai, cependant cette approche entraine également une augmentation importante de la quantité des protéines extraites, donc la quantité des peptides injectés en LC-MS après la digestion. Cela a été confirmé lors de notre évaluation en augmentant d'un facteur deux la prise d'essai. Une option alternative est d'adopter une stratégie des ajouts-dosés pour les échantillons de faible concentration. Cependant, il est important de déterminer la quantité de la PCT à ajouter dans l'échantillon et le nombre de points de la courbe d'ajouts-dosés afin d'assurer la capacité de discriminer de faibles différences de concentration entre des échantillons différents, car cela peut grandement impacter la justesse de la quantification. De plus, cette approche augmente le nombre d'échantillons, et donc le coût et le temps d'analyse. Il est également important de noter qu'il est difficile d'obtenir une quantité de sérum de patients atteints du sepsis suffisante pour développer ces deux approches. Une autre option au niveau chromatographique est de réduire encore d'avantage la complexité de l'extrait élué par la chromatographie liquide arrivant à la source. En effet, bien qu'une étape de SPE ait été implémentée suite à la digestion enzymatique, celle-ci n'est peut-être pas suffisante pour réduire la complexité de l'extrait après la digestion du sérum et ainsi éviter des effets de suppression de signal liée à la compétition d'ionisation au niveau de la source MS. Ce phénomène pourrait être réduit par l'utilisation d'un système de séparation analytique en deux dimensions. En fonction des protéines étudiées, la limite de quantification peut atteindre 0,05-0,1 ng/mL avec une augmentation de limite de quantification de plus de 100 fois par rapport au système conventionnel à seule dimension (261). Cependant, cette faible limite de quantification observée est obtenue en combinant deux systèmes de séparation analytique de type nano LC. En effet, l'utilisation d'un système de séparation analytique miniaturisé de type LC capillaire ou nano LC permet d'augmenter grandement la sensibilité de la méthode. Ainsi, Wilffert et *al.* ont observé une amélioration

d'un facteur dix de la sensibilité de la méthode de quantification de la protéine rhTRAIL en utilisant un système nano LC (colonne de 150 µm de diamètre interne) au lieu du système micro LC (colonne de 2,1 mm de diamètre interne) (205,252). De même, l'étude du Docteur Dubois a rapporté une augmentation d'un facteur de 3,4 en aire du pic d'un peptide de la PCT en passant d'un système LC conventionnel (colonne de 2,1 mm de diamètre interne) au système capillaire LC (colonne de 300 µm de diamètre interne) (184). Il serait donc intéressant d'étudier ce type de système pour évaluer le gain en sensibilité qui pourrait être obtenu sur la méthode de référence candidate. Cependant, il est important de souligner que la complexité de l'échantillon extrait peut impacter l'efficacité du système de type nano ou capillaire LC. En effet, la quantité maximale pouvant être injectée sur ces systèmes est réduite due au faible volume de la colonne, et donc à sa capacité de rétention : cela nécessite de réduire la quantité de l'échantillon injecté ou de réduire le volume de la prise d'essai du protocole développé, tout en restant au-delà de la limite de détection en MS. De plus, ces systèmes peuvent souffrir d'une faible reproductibilité dans le temps (283). Une autre possibilité pour améliorer la sensibilité est le recours à une préparation d'échantillon beaucoup plus spécifique, notamment avec l'utilisation d'anticorps spécifiques à la PCT ou à ses peptides protéotypiques. Cependant, comme évoqué précédemment dans l'étude de Krastins *et al.*, l'utilisation d'anticorps spécifiques à la PCT ne permettrait pas d'atteindre une limite de quantification compatible avec une méthode de référence Une étape d'extraction spécifique au niveau peptidique comme mis en œuvre dans le manuscrit de thèse du Docteur Dubois pourrait alors être envisagée. Cependant, la reproductibilité entre les différents lots d'anticorps pourrait limiter la robustesse de la méthode de référence. Une alternative pour une purification spécifique est l'utilisation des aptamères. Ce sont des oligonucléotides synthétiques qui sont capables d'interagir avec un analyte d'intérêt avec une grande affinité et spécificité. Les principaux avantages des aptamères sont la sélection et la production in vitro sans recours au modèle animal comme pour les anticorps et sa grande pureté et reproductibilité. De plus, les aptamères sont très stables dans une large gamme de pH et sont conservés à température ambiante sur du long terme (296). Selon différentes études publiées, les aptamères sont rapportés équivalents à l'utilisation des anticorps pour la purification de la protéine PCSK9 dans le plasma, mais avec un faible bruit de fond en analyse LC-MS en raison de leur spécificité à la protéine d'intérêt (297). Ceci a également été observé dans une étude de Richards et *al.* (298). Récemment, l'utilisation d'affimères a été présentée comme une alternative à l'utilisation d'anticorps. Les affimères sont des polypeptides de taille beaucoup plus faible qu'un anticorps qui sont produits avec l'expression des protéines en *E.Coli.* L'étude de Klont *et al*. a rapporté une amélioration de 25 % de la limite de quantification par rapport à l'utilisation des anticorps pour la quantification de la protéine sRAGE (299). Cependant, comme les aptamères, la production représente un coût non négligeable car il est nécessaire d'identifier préalablement les candidates à partir d'une base des données très complexes, puis de les tester. L'utilisation en routine nécessite également d'importantes optimisations.

Les deux méthodes développées au cours de ce projet ont été appliquée à des échantillons cliniques (pools d'échantillons de patients présentant un sepsis), une fidélité inférieure à 7,7 % a été rapportée pour les deux méthodes. Cependant, une différence de quantification entre les méthodes LC-MS et les immunoessais a été observée. Ainsi, les seuils de décision clinique de 0,25 ng/mL et 0,5 ng/mL établis à partir de mesures faites avec des immunoessais ne sont potentiellement pas couverts par la méthode de référence candidate. Toutefois, il est important de noter que cette différence de quantification n'a été observée que sur un panel restreint d'échantillons dont la commutabilité n'a pas été démontrée pour les méthodes mises en œuvre et que seulement une méthode immunoessai a été utilisée. De plus, les pools d'échantillons étudiés ont subi différents cycles de congélation-décongélation ce qui peut potentiellement avoir un impact sur la commutabilité des échantillons et fausser la comparaison entre les deux méthodes. Ainsi, des études complémentaires seront nécessaires afin de déterminer la pertinence de la méthode développée en tant que méthode de référence d'ordre supérieur. De plus, les formes réellement mesurées par les méthodes de routine ne sont pas clairement décrites. En effet, comme décrit dans la littérature, une concentration de la PCT élevée a également été observée en cas de traumatisme, de cancer ou suite à certaines chirurgies, ce qui est considérée comme faux positif pour le diagnostic du sepsis bactérien. Comme décrit précédemment, la PCT existe sous plusieurs isoformes et formes de clivages. Sur le plan clinique, il serait intéressant de déterminer si les différentes isoformes de la PCT correspondent à des états pathologiques spécifiques. Une approche permettant de déterminer ce que dosent effectivement les méthodes de routine consisterait à analyser le contenu de l'échantillon après la ou les étapes d'immunocapture. En effet, cet échantillon contient les analytes que les anticorps capturent réellement, par exemple la PCT et/ou les différentes formes de la PCT et/ou d'éventuels interférents capturés par réactivité croisée. Cette solution pourrait ensuite être analysée par LC-MS/MS avec la stratégie *bottom-up* ou *top-down* en mode de fragmentation DDA (*Data Dependant Acquisition*) afin d'identifier les analytes capturés par les anticorps. Dans le cas d'une méthode par spectrométrie de masse avec une stratégie *bottom-up*, la détection de la PCT est réalisée par le biais de la quantification de certains peptides protéotypiques, les peptides générés en fonction de l'enzyme sélectionnée permettent de discriminer les différentes formes de la PCT. L'enzyme endoprotéinase AspN clive les liaisons peptidiques du côté N-terminal du résidu acide aspartique, ce qui permet d'obtenir le peptide issu de la partie N-terminal des trois isoformes de la PCT. Quant à la stratégie *top-down*, l'analyse de la protéine entière permet d'acquérir les informations les plus complètes de plusieurs isoformes de la PCT capturées par les anticorps des méthodes de routine et d'éviter la perte d'information par la génération des petits peptides indétectables en LC-MS.

Ces deux approches décrites ci-dessus peuvent également être implémentées pour le développement de la méthode de quantification de la PCT dans le sérum. Cependant, avec un protocole de préparation d'échantillon n'impliquant pas l'utilisation d'anticorps pour une purification spécifique de la PCT, la quantité d'enzyme nécessaire est importante. Or le coût

de l'endoprotéinase AspN est en général 50 fois plus élevé que l'enzyme trypsine, utilisée par défaut pour la protéolyse des protéines en protéomique *bottom-up* : cela la génère ainsi un coût important pour les analyses. En outre, l'approche *top-down* est très prometteuse, une méthode bien optimisée pourrait permettre une amélioration de la sensibilité de la méthode en évitant l'étape de digestion. De plus, la PCT est un bon candidat pour cette approche grâce à sa faible masse moléculaire de 12,7 kDa ce qui permet d'obtenir une efficacité de fragmentation plus élevée. Cependant, il faut tenir compte des difficultés techniques concernant la séparation chromatographique, l'ionisation et la fragmentation des protéines entières. En effet, chaque protéine est détectée sous la forme d'une distribution de plusieurs espèces ioniques multichargées, une matrice très complexe en protéine ou une mauvaise séparation chromatographique entraine donc une superposition de plusieurs distributions multichargées, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Il est donc crucial d'utiliser des approches de purification très spécifiques en amont (anticorps, aptamères, affimères) afin de réduire la complexité de la matrice. De plus, il faut également souligner des difficultés dans la discrimination des formes variantes très proches de la protéine d'intérêt, en effet, une faible différence de rapport m/z entre les formes variantes et la protéine d'intérêt est difficilement détectée même avec l'instrument de haute résolution. Nous pouvons étudier les espèces faiblement chargées ou la différence de rapport m/z est plus grande, cependant la fragmentation de ces espèces est moins efficace par rapport à celles fortement chargées. Finalement, l'interprétation des résultats d'acquisition représente une difficulté supplémentaire en raison du manque de solutions bio-informatiques disponibles.

Comme décrit précédemment, la caractérisation de l'étalon primaire de type protéine est plus complexe. Les impuretés pouvant avoir une structure protéique proche, dérivant de la protéine étalon, avec ou sans modifications chimiques ou post-traductionnelles. Même si elles sont présentes en quantité relative très faible, elles peuvent être hétérogènes et nombreuses, et leur effet global peut ne pas être négligeable sur les résultats de dosage. C'est pour cela que l'étalon a été utilisé exclusivement après plusieurs étapes de purification orthogonales. Il est cependant nécessaire de disposer d'instruments travaillant à très haute résolution pour l'analyse en masse intacte afin de pouvoir séparer les différentes espèces de rapport masse sur charge très proches, et dont les massifs isotopiques multichargés se superposent parfois, malgré des masses monoisotopiques distinctes. Combinée avec une grande précision de mesure, cela permet de déterminer expérimentalement la différence de masse exacte entre la protéine d'intérêt et les impuretés pour déduire la composition atomique des modifications, et proposer des formules brutes ou semi développées. Enfin, il est primordial de réaliser des analyses structurales complémentaires de type top-down afin d'identifier les isoformes en présence, et de localiser plus précisément les modifications par spectrométrie de masse tandem, pour pouvoir corriger le cas échéant le résultat de dosage par AAA. Il faut noter qu'il est également important d'améliorer la capacité de pic de nos séparations chromatographiques.

Un travail complémentaire sur les différents types de phases stationnaires et de phases mobiles permettant de séparer les formes variantes très proches de la protéine d'intérêt n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette étude et serait certainement très intéressant.

Quelle que soit la stratégie adaptée pour améliorer la limite de quantification, une exigence relative à la méthode de référence concerne les incertitudes de mesure associées doit être prise en compte. En effet, l'incertitude de mesure de tous les résultats qui découlent de la chaîne de traçabilité sont directement dépendant de l'incertitude associée aux résultats fournis par la méthode de référence développée. Comme l'incertitude augmente tout au long de la chaîne de traçabilité, il est nécessaire qu'elle soit la plus faible possible au niveau des références d'ordre supérieur. En général, l'incertitude associée au système de mesure de référence doit représenter moins de 30 % des incertitudes tolérées par les méthodes de dosage de routine. Cependant, ces exigences sur l'incertitude des méthodes de routine ne sont pas encore définies pour le dosage de la PCT. Dans notre étude, les principales sources d'incertitudes sont liées à l'incertitude de l'étalon primaire protéique déterminée par l'analyse des acides aminés pour les fortes concentrations supérieures à 1 ng/mL et à l'incertitude générée par le modèle de la droite d'étalonnage pour les faibles concentrations inférieures à 1 ng/mL. Une incertitude élargie relative finale rapportée supérieure à 15 % exige encore d'autres optimisations sur la méthode de référence primaire pour la caractérisation de la protéine recombinante et l'incertitude associée au modèle d'étalonnage avant de pouvoir être mise en place comme méthode de référence pour la standardisation des dosages de la PCT.

Une autre exigence pour la méthode de référence est sa justesse. Il est primordial d'assurer la justesse de la méthode et la stabilité des résultats de mesure, indépendamment du temps et de l'espace. Sachant que la méthode de référence constitue un point d'ancrage pour toutes les autres méthodes de dosage de la PCT, un biais de justesse peut avoir un impact majeur sur la justesse des mesures effectuées par les méthodes de dosages en routine, et donc sur la prise en charge diagnostique et thérapeutique du patient. Bien que l'utilisation d'un étalon primaire traçable aux unités SI et la stratégie de dilution isotopique aient été mises en œuvre pour assurer la justesse des mesures, il est néanmoins nécessaire de construire un réseau de laboratoires de référence des dosages de la PCT pour démontrer sa robustesse et détecter d'éventuelles dérives dans le temps. Cela nécessitera d'organiser des études d'inter-comparaison internationale entre les différents laboratoires de référence.

L'établissement de la chaîne de traçabilité est un processus long et complexe et nécessite la participation des toutes les parties prenantes. La méthode de référence candidate développée au cours de cette thèse apporte une pierre à l'édifice qui permettra dans un premier temps d'assigner des valeurs de référence à des MRC secondaires et à des matériaux de contrôle de qualité. Ces matériaux, dont la commutabilité devra être démontrée, permettront d'évaluer le besoin de standardisation des mesures de la PCT. La

standardisation sera alors mise en œuvre si cela est jugé nécessaire et si les performances de la méthode de référence sont adéquates suite aux améliorations proposées.

Annexes

Annexe A. Procédure d'analyse des acides aminés

1. Réactif :

- NMIJ CRM 6011-a Alanine Pureté 99.9 ±0.2 % (k=2)
- NMIJ CRM 6012-a Leucine Pureté 99.9 ±0.2 % (k=2)
- NMIJ CRM 6013-a Isoleucine Pureté 99.7 ±0.2 % (k=2)
- NMIJ CRM 6014-a Phenylalanine Pureté 99.9 ±0.2 % (k=2)
- NMIJ CRM 6015-a Valine Pureté 99.8 ±0.2 % (k=2)
- NMIJ CRM 6016-a Proline Pureté 99.9 ±0.2 % (k=2)
- NIST CRM 2389a : solution de contrôle de qualité
- Acides aminés marqués (Valine-$^{13}C_5$,^{15}N, Phénylalanine-$^{13}C_9$,^{15}N, alanine-$^{13}C_3$,^{15}N, proline-$^{13}C_5$, isoleucine-$^{13}C_6$, leucine-$^{13}C_6$) de pureté supérieure à 97 % (Cambridge isotope Laboratories, Andover, MA, Etats-Unis)
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Eau milliQ (Milli-Q system, Millipore, MA, Etats-Unis).
- Acétonitrile (qualité LC-MS) (Biosolve, Dieuze, France)

2. Equipement :

- Balance de portée 20 g avec une résolution de 1 µg
- Balance de portée 200 g avec une résolution de 10 µg
- Evaporateur Speedvac (Thermo Scientific)
- Station d'hydrolyse liquide Reacti-Therm III #TS-18824 (Thermo Scientific)
- Station d'hydrolyse gazeuse H/D Workstation Eldex SunChrom (Napa, Etats-Unis)
- Colonne Acquity UPLC, BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm (Waters, Massachusetts, Etats-Unis)
- Chromatographe en phase liquide Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Spectromètre de masse Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific)

3. Préparation des solutions :

La quantification absolue en ID-LC/MS par les acides aminés nécessite de préparer une gamme d'étalonnage spécifique pour chaque analyte à quantifier. Les étalons sont préparés à partir d'une solution mère multi-acides aminés (multi-AA) non marqué et d'une solution mère multi-AA marqués. En effet, en fonction du nombre d'acide aminé et la quantité de chaque acide aminé dans le peptide/protéine que ces deux solutions mères sont préparées.

La solution mère multi-AA est composée des acides aminés pur de pureté certifiée (les matériels CRM). Pour chaque acide aminé, deux solutions individuelles sont préparées à une concentration de 50 µg/g dans l'HCl à 0,1 mol/L pour acide aminé non marqué et marqué. Celles-ci sont ensuite mélangées pour créer deux solutions mères multi-AA non marqués et marqués en respectant la quantité de chaque acide aminé dans la séquence de peptide/protéine. La gamme d'étalonnage est préparée gravimétriquement à partir de ces deux solutions dans la proportion indiquées dans le *Tableau 21*.

Tableau 21. Préparation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des acides aminés par ID-LC/MS

Etalon	Volume de solution mère multi-AA non marqués (µL)	Volume de solution mère milti-AA marqués (µL)
Q = 0,5	150	300
Q = 0,75	225	300
Q = 1,0	300	300
Q = 1,5	450	300
Q = 2,0	600	300

Les solutions de contrôle de la justesse sont préparées gravimétriquement à partir du matériel NIST CRM 2389a en mélangeant avec la solution mère multi-AA marqués.

Chaque échantillon à quantifier est préparé gravimétriquement en diluant la solution mère du peptide synthétique ou de la protéine dans l'eau MilliQ, dans lequel les acides aminés marqués correspondants sont également ajoutés.

4. Hydrolyse en condition acide

L'hydrolyse des peptides/protéines en condition acide sont réalisée par les deux techniques : hydrolyse en phase gazeuse ou hydrolyse en phase liquide.

a. Hydrolyse en phase gazeuse

Le protocole d'hydrolyse en phase gazeuse est illustré dans la *Figure 84*. Les échantillons sont séchés pour éliminer le solvant dans un concentrateur sous vide Speedvac. Les échantillons sont ensuite placés dans un tube d'hydrolyse gazeuse, dans lequel 200 µL de solutions HCl 6N est ajouté. Le tube d'hydrolyse est fermé sous vide et placé dans une station d'hydrolyse gazeuse chauffée à la température nécessaire (110 °C – 130 °C) pendant le temps nécessaire (24h à 72h).

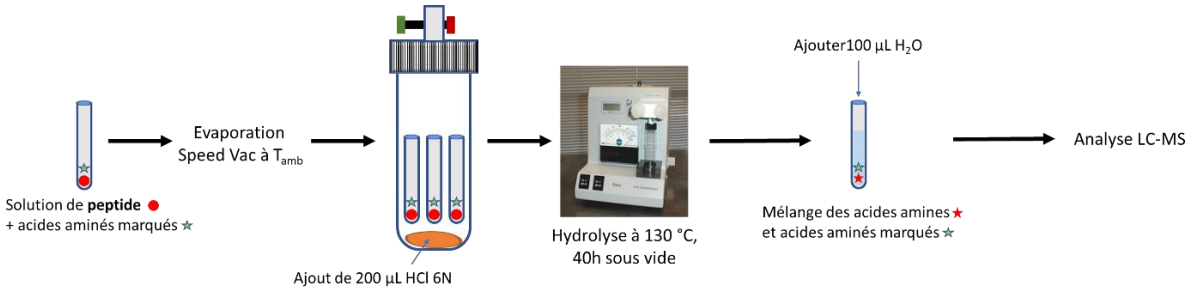


Figure 84. Schéma d'analyse des acides aminés par l'hydrolyse en phase gazeuse

Une fois la réaction d'hydrolyse achevée, les échantillons sont sortis du tube d'hydrolyse et re-suspendus dans 100 µL eau MilliQ. L'échantillon est conservé à 4°C jusqu'à l'analyse LC-MS.

b. Hydrolyse en phase liquide

Les échantillons sont séchés pour éliminer le solvant avec le Speedvac puis repris dans 300 µL HCl 6N, et transférés dans un tube d'hydrolyse liquide. Les tubes d'hydrolyse liquide sont ensuite fermés et placés dans une station d'hydrolyse liquide chauffée à la température nécessaire (110 °C – 130 °C) pendant le temps nécessaire (24h à 72h). Une fois la réaction d'hydrolyse achevée, l'échantillon est transféré dans un flacon. Le tube d'hydrolyse est lavé avec 1 ml eau MilliQ. Les deux fractions sont combinées et séchées à nouveau avec le Speedvac. L'échantillon est ensuite re-suspendu dans 100 µL eau MilliQ. L'échantillon est conservé à 4°C jusqu'à l'analyse LC-MS.

5. Condition d'analyse LC-MS

Les étalons, le contrôle de la justesse et les échantillons d'hydrolyse sont analysés en LC-MS. Les conditions chromatographiques et celles de spectromètre de masse sont détaillées dans le *Tableau 22, Tableau 23 et Tableau 24*. La détection des acides aminés non marqués et

marqués est réalisée en mode SIM. Les aires des pics sont extraites avec une erreur de masse de 5 ppm par rapport à la valeur théorique du rapport masse sur charge en utilisant l'algorithme Quanbrowser du logiciel Xcalibur version 4.1 (Thermo Scientific).

Tableau 22. Conditions de chromatographie liquide pour la séparation des acides aminés

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	Acquity UPLC, BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm
Phases mobiles	Phase A : Eau MilliQ, 0,1 % FA Phase B : ACN 0,1 % FA
Température	25 °C
Volume d'injection	2 µL
Débit	150 µL/min
Gradient	0 min : 1 % B 10 – 13 min : 2,5 % B 13,5 – 18,5 min : 1 % B

Tableau 23. Conditions de la source d'ionisation ESI pour l'analyse des acides aminés

Paramètre	**Valeur**
Tension du spray (V)	3500
Débit du gaz de nébulisation*	40
Débit du gaz de balayage*	1,5
Température du gaz auxiliaire (°C)	300
Débit du gaz auxiliaire*	10
Température du capillaire de transfert (°C)	250
Ouverture S-lens*	30

(*) unité arbitraire

Tableau 24. Liste d'inclusion pour la détection des acides aminés

Composé	Formule	Charge (z)	m/z	Fenêtre de détection
Alanine	$C_3H_7NO_2$	1	90.05496	0 – 2,2 min
Alanine marquée		1	94.06240	0 – 2,2 min
Isoleucine	$C_3H_{13}NO_2$	1	132.10191	2,5 – 6 min
Isoleucine marquée		1	138.12210	2,5 – 6 min
Phénylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	1	166.08626	5 – 11 min
Phénylalanine marquée		1	176.11350	5 – 11 min
Leucine	$C_3H_{13}NO_2$	1	132.10191	2,5 – 6 min
Leucine marquée		1	138.12210	2,5 – 6 min
Proline	$C_5H_9NO_2$	1	116.07061	0 – 3 min
Proline marquée		1	121.06300	0 – 3 min
Valine	$C_5H_{11}NO_2$	1	118.08626	1,9 – 3 min
Valine marquée		1	124.10020	1,9 – 3 min

Annexe B. Procédure d'analyse des impuretés et quantification relative de la solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR en masse intacte MS

1. Réactif

- Peptide SALESSPADPATLSEDEAR (Pepscan Prestp, Lelystad, Pays-Bas)
- DMSO (Merck Millipore, Massachusetts, Etats-Unis)
- Eau MilliQ (Milli-Q system).
- Acétonitrile (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide formique (qualité LC-MS) (Biosolve)

2. Equipement

- Colonne Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 250 mm, 5 µm
- Chromatographie en phase liquide Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific))
- Spectromètre de masse Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific)

3. Préparation des solutions

Le peptide est reconstitué dans DMSO/eau MilliQ 1:1 (v/v), appelée la solution mère. La solution mère est diluée gravimétriquement avec l'eau MilliQ pour atteindre une concentration de 16 µg/g. Cette solution est ensuite analysée par LC-MS

4. Conditions d'analyse LC-MS

Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse sont détaillées dans le *Tableau 25* et le *Tableau 26*. La détection des impuretés est réalisée en mode Full Scan MS. Le chromatogramme obtenu est déconvolué par la fonction Xtract de l'algorithme Qualbrowser du logiciel Xcalibur version 4.1 (Thermo Scientific). Les aires des pics sont ensuite extraites avec une erreur de masse de 5 ppm par rapport à la valeur théorique du rapport m/z.

Tableau 25. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés du peptide synthétique SALES

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 250 mm, 5 µm
Phases mobiles	Phase A : eau milliQ, 0,1 % FA Phase B : ACN, 0,1 % FA
Température	60 °C
Volume d'injection	8 µL
Débit	100 µL/min
Gradient	0 – 5 min : 5 % B 57 min : 30 % B 58 – 61 min : 90 %B

62 -70 min : 5 % B

Tableau 26. Condition de la source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés du peptide synthétique SALES

Paramètre	Valeur
Tension du spray (V)	4200
Débit du gaz de nébulisation*	10
Débit du gaz de balayage*	0
Température du gaz auxiliaire (°C)	140
Débit du gaz auxiliaire*	5
Température du capillaire de transfert (°C)	250
Ouverture S-lens*	50
Résolution	35000
Gamme de scan (m/z)	400-1500
AGC valeur	$1^{E}6$

(*) unité arbitraire

Annexe C. Procédure d'analyse des impuretés de la solution mère de la protéine PCT en masse intacte MS

1. Réactif

- Solution mère de la protéine PCT recombinante (Promise Advanced Proteomics), (quantifiée par l'approche PICAA)
- Eau MilliQ (Milli-Q system).
- Acétonitrile (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide formique (qualité LC-MS) (Biosolve)

2. Equipement

- Colonne BioBasic 300 C4 , 1 mm x 150 mm, 5 µm (Thermo Scientific)
- Chromatographie en phase liquide Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific))
- Spectromètre de masse Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific)

3. Préparation des solutions

La solution mère est diluée avec 5 % (v/v) ACN dans l'eau MilliQ pour atteindre une concentration de 80 µg/g. Cette solution est ensuite analysée par LC-MS

4. Conditions d'analyse LC-MS

Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse sont détaillées dans le *Tableau 27* et le *Tableau 28*. La détection des impuretés est réalisée en mode Full Scan MS. Le chromatogramme obtenu est déconvolué par la fonction Xtract de l'algorithme Qualbrowser du logiciel Xcalibur version 4.1 (Thermo Scientific). Les aires des pics sont ensuite extraites avec une erreur de masse de 20 ppm par rapport à la valeur théorique du rapport m/z.

Tableau 27. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés de la PCT

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	BioBasic 300 C4 , 1 mm x 150 mm, 5 µm
Phases mobiles	Phase A : eau milliQ, 0,1 % FA Phase B : ACN, 0,1 % FA
Température	60 °C
Volume d'injection	5 µL
Débit	40 µL/min
Gradient	0 min : 5 % B 3 min : 25 % 40 min : 60%57 min : 30 % B 41 – 48 min : 90 % B 49 -60 min : 5 % B

Tableau 28. Conditions de source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés de la PCT

Paramètre	**Valeur**
Tension du spray (V)	3500
Débit du gaz de nébulisation*	35
Débit du gaz de balayage*	1
Température du gaz auxiliaire (°C)	200
Débit du gaz auxiliaire*	10
Température du capillaire de transfert (°C)	250
Ouverture S-lens*	50
Résolution	35000
Gamme de scan (m/z)	400-1500
AGC valeur	$1^{E}6$

(*) unité arbitraire

Annexe D. Procédure d'analyse des impuretés de la solution mère de la protéine PCT en mode top-down

1. **Réactif**

- Solution mère de la protéine PCT recombinante (Promise Advanced Proteomics), (quantifiée par l'approche PICAA)
- Eau MilliQ (Milli-Q system).
- Acétonitrile (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide formique (qualité LC-MS) (Biosolve)

2. **Equipement**

- Cartouche précolonne Pepmap C4, 300 µm
- Colonne Pepmap 300 C4, 75 µm x 100 mm, 5 µm (Thermo Scientific)
- Chromatographie en phase liquid RSLCnano UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific)
- Spectromètre de masse Thermo Scientific™ Orbitrap Eclipse Tribrid (Thermo Scientific)

3. **Préparation des solutions**

La solution mère est diluée avec 5 % (v/v) ACN dans l'eau MilliQ pour atteindre une concentration de 80 µg/g. Cette solution est ensuite analysée par LC-MS

4. **Conditions d'analyse LC-MS**

Les conditions chromatographiques et celles de spectromètre de masse sont détaillées dans le *Tableau 29* et le *Tableau 30*. La détection des impuretés est réalisée en mode Full Scan MS. Le chromatogramme obtenu est déconvolué par la fonction Xtract de l'algorithme Qualbrowser du logiciel Xcalibur version 4.1 (Thermo Scientific). Les aires des pics sont ensuite extraites avec une masse d'erreur de 20 ppm par rapport à la valeur théorique du rapport m/z.

Tableau 29. Conditions de chromatographie liquide pour l'analyse des impuretés de la PCT

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	Pepmap C4, 75 µm x 100 mm, 5 µm
Phases mobiles	Phase A : 98 % eau MilliQ, 2 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v) Phase B : 10 % eau MilliQ, 90 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v)
Température	45 °C
Volume d'injection	2 µL
Débit	300 nL/min
Gradient	0 – 5 min : 5 % B 6 min : 25 % 43 min : 60 % 44 – 51 min : 90 % B 52 -63 min : 5 % B

Tableau 30. Condition de la source de spectrométrie de masse pour l'analyse des impuretés de la PCT

	Paramètre	Valeur
	Tension du spray (V)	2500
	Débit du gaz de nébulisation*	10
	Débit du gaz de balayage *	0
	Température du gaz auxiliaire (°C)	140
	Débit du gaz auxiliaire*	5
	Température du capillaire de transfert (°C)	300
	Ouverture S-lens*	30
Analyse MS	Orbitrap résolution	120000
	Gamme de scan (m/z)	500-2000
Analyse en mode HCD	Orbitrap résolution	120000
	Energie de collision HCD (%)	35
	Précurseur filtre (m/z)	908-954
	Fenêtre d'isolation (m/z)	1.8
Analyse en mode CID	Orbitrap résolution	120000
	Energie de collision CID (%)	35
	Précurseur filtre (m/z)	908-954
	Fenêtre d'isolation (m/z)	1,8
Analyse en mode EThCD	Orbitrap résolution	120000
	Temps de réaction ETD (ms)	2,5
	Précurseur filtre (m/z)	908-954
	Fenêtre d'isolation (m/z)	1,8
	Energie de collision SA (%)	35
Analyse en mode UVPD	Orbitrap résolution	120000
	Temps d'activation UVPD (ms)	100
	Précurseur filtre (m/z)	908-954
	Fenêtre d'isolation (m/z)	1,8

(*) unité arbitraire

Annexe E. Procédure de quantification de la PCT dans le sérum humain par l'ID-LC-MS/MS

1. Réactif

- Solution mère du peptide SALESSPADPATLSEDEAR, quantifiée par l'approche PICAA
- Peptide FHTFPQTAIGVGAPGK (Pepscan Presto)
- Peptides marqués SALESSPADPATLSEDE**A**($^{13}C_3$,^{15}N)R, FHTFPQTAIGVGA**P**($^{13}C_5$,^{15}N)GK (Pepscan Presto)
- Solution mère de la protéine PCT recombinante (Promise Advanced Proteomics), (quantifiée par l'approche PICAA)
- DMSO (Merck Millipore)
- Déoxycholate du sodium Sodium deoxycholate (SDC) (Sigma Aldrich)
- Bicarbonate d'ammonium (Sigma Aldrich)
- Dithiothréitol (Sigma Aldrich)
- Iodoacetamide (Sigma Aldrich)
- Tween-20 (Sigma Aldrich)
- Acétonitrile (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Méthanol absolu (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide formique (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide trifluoroacétique (qualité LC-MS) (Biosolve)
- Acide acétique (qualité LC-MS) (FisherChemical, Illkirch, France)
- Eau MilliQ (Milli-Q system)
- Enzyme Trypsin Gold (qualité MS) (Promega, Madison, USA).
- Sérum humain (référence H4522) (Sigma Aldrich).

2. Equipment

- Cartouche SPE HLB Oasis 500 mg, 6cc (Waters, Massachusetts, USA)
- Cartouche SPE HLB Oasis 30 mg, 1cc (Waters)
- Evaporateur concentrateur sous vide Speedvac (Thermo Scientific)
- Thermomixeur (Thermo Scientific)
- Colonne Acclaim Pepmap 100 C18, 1 mm x 150 mm, 3 µm (Thermo Scientific)

- Chromatographe en phase liquide Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific)
- Spectromètre de masse Thermo Scientific™ Q Exactive™ Focus hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific)

3. Préparation d'échantillons en matrice

Cinq cents microlitres de sérum humain sont préparés gravimétriquement dans un tube Eppendorf de 2mL, dans lequel 500 µl de solution 1 % (w/w) SDC dans l'eau MilliQ sont ajoutés. L'échantillon est placé dans un bain à ultrason pendant 5 min puis agité à température pendant 10 min. Un millilitre d'acétonitrile est ajouté ensuite dans l'échantillon pour la précipitation protéique. L'échantillon est agité pendant 10 min avant d'être centrifugé pendant 5 min à 14000 g à température ambiante. Le surnageant obtenu est ensuite dilué avec 14 mL d'eau MilliQ pour réduire la fraction organique avant de déposer sur la cartouche SPE HLB 500 mg. La cartouche SPE est préalablement conditionnée avec 3 mL méthanol, 3 mL 60 % (v/v) acétonitrile et 3 mL eau MilliQ. Après avoir déposé l'échantillon, la cartouche est lavée avec 3 mL eau MilliQ puis 1 mL 10 % (v/v) méthanol. L'éluat est récupéré avec 1 mL 60 % (v/v) acétonitrile dans un tube Eppendorf de 1.5 mL. L'échantillon extrait est ensuite évaporé pour éliminer le solvant à température ambiante avec le Speedvac. L'extrait évaporé re-suspendu avec 10 µl méthanol, puis subit une réaction de réduction avec 82 µL solution contenant 15,3 mM ammonium bicarbonate, 20,8 mM dithiothréitol dans l'eau MilliQ pendant 1 h à 37 °C. L'échantillon est ensuite alkylé avec 18 µL 500 mM iodoacétamide dans l'eau MilliQ pendant 1 h à 20 °C dans l'obscurité. Après alkylation, l'échantillon est ensuite dilué avec 92 µL solution contenant 94 mM bicarbonate d'ammonium, 2,4 % (v/v) acétonitrile et 0,00024 % (v/v) Tween 20 dans l'eau. La digestion est réalisée par l'ajout de 6 µL 770 µg/mL trypsine gold dans 50mM acide acétique pendant 6 h à 37°C. La digestion est arrêtée avec 2 µl acide formique.

Vingt microlitres de solution contenant les peptides marqués sont ajoutés dans le digestat, puis dilués avec 1 mL 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau MilliQ avant l'étape de purification. La purification est réalisée en utilisant la cartouche SPE HLB 30 mg préalablement conditionnée avec successivement 1 mL 0,1 % (v/v) TFA dans l'acétonitrile, 1 mL 10 % (v/v) acétonitrile 0,1 % TFA (v/v) dans l'eau. Par la suite, après avoir déposé le

digestat dilué, la cartouche SPE est lavée avec 1 mL 0,1 % (v/v) TFA dans l'eau milliQ et 1 mL 10 % (v/v) acétonitrile 0,1 % (v/v) TFA dans l'eau. Les peptides sont dilués avec 1 mL 20% (v/v) acétonitrile, 0,1 % (v/v) TFA dans l'eau. L'extrait est ensuite évaporé pour éliminer le solvant et ensuite re-suspendu avec 100 µL 2 % (v/v) méthanol, 0,1 % (v/v) acide formique dans l'eau MilliQ.

4. Conditions d'analyse LC-MS

Les échantillons sont analysés en LC-MS/MS. Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse sont détaillées dans les *Tableau 31*, *Tableau 32* et *Tableau 33*. La détection des peptides non marqués et marqués est réalisée en mode PRM. Les aires des pics sont extraites avec une erreur de masse de 10 ppm par rapport à la valeur théorique du rapport masse sur charge en utilisant l'algorithme Qualbrowser du logiciel Xcalibur version 4.1 (Thermo Scientific).

Tableau 31. Récapitulatif des paramètres chromatographiques optimisés de la méthode LC-MS pour la quantification de la PCT dans le sérum humain

Paramètres de chromatographie liquide	
Colonne	Acclaim™ PepMap™ 100 C18 analytical column (1 x 150 mm, 3 µm)
Phases mobiles	Phase A : Eau MilliQ, 0,05 % acide acétique Phase B : MeOH 0,05 % acide acétique
Température	60 °C
Volume d'injection	20 µL
Débit	80 µL/min
Gradient	0 min : 2 % B 2 – 10 min : 20 % B 10-11 min : 16 % B 11 – 25 min : 4 % B

Tableau 32. Paramètre de source MS final pour la quantification de la PCT en sérum

Paramètre	Valeur
Tension du spray (V)	4200
Débit du gaz de nébulisation*	25
Débit du gaz de balayage*	0
Température du gaz auxiliaire (°C)	140
Débit du gaz auxiliaire*	2
Température du capillaire de transfert (°C)	250
Ouverture S-lens*	50
Résolution	35000
Fenêtre d'isolation (m/z)	1,5
IT maximal (ms)	242
Valeur AGC*	2E5

(*) unité arbitraire

Tableau 33. Paramètres MS pour la détection en PRM des peptides de la PCT et leurs étalons internes marqués

Séquence du peptide	Ion précurseur		Energie de collision (eV)	Ion produit	
	ion	m/z		ion	m/z
SALESSPADPATLSEDEAR	$[M+2]^{2+}$	973.4529	35	y13+ y10+	1371.6387 1088.5218
SALESSPADPATLSEDEA**R**[$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]	$[M+2]^{2+}$	978.4570	35	y13+ y10+	1381.6469 1098.5301
SALESSPADPATLSEDE**A**[$^{13}C_3$,^{15}N]R	$[M+2]^{2+}$	975.4565	35	y13+ y10+	1375.6387 1092.5218
FHTFPQTAIGVGAPGK	$[M+3]^{3+}$	543.2912	20	y7+ y3+	585.3355 301.187
FHTFPQTAIGVGAPG**K**[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]	$[M+3]^{3+}$	545.9626	20	y7+ y3+	593.3497 309.2012
FHTFPQTAIGVGA**P**[$^{13}C_5$,^{15}N]GK	$[M+3]^{3+}$	545.2958	20	y7+ y3+	591.3493 307.2008

Références

1. Pitte M. La qualité des soins. 2019. Disponible : https://www.espacesoignant.com/soignant/qualite-des-soins-et-evaluation-des-pratiques/qualite-des-soins [consulté le 21 Octobre 2020]
2. Grober ED, Bohnen JMA. Defining medical error. Can J Surg. 2005;48:39–44.
3. Makary MA, Daniel M. Medical error—the third leading cause of death in the US. British Medical Journal Publishing Group. Disponible: https://www.bmj.com/content/353/bmj.i2139 [consulté le 3 Mai 2020]
4. Berwick DM, Leape LL. Reducing errors in medicine. BMJ. 1999;319:136–7.
5. Carver N, Gupta V, Hipskind JE. Medical Error. StatPearls. Disponible : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430763/ [consulté le 2 Octobre 2020]
6. Plebani M. Diagnostic Errors and Laboratory Medicine – Causes and Strategies. EJIFCC. 2015;26:7–14.
7. The Lewin Group. The value of Diagnostics Innovation, Adaption and Diffusion into Health care. Disponible : https://dx.advamed.org/sites/dx.advamed.org/files/resource/Lewin%20Value%20of%20Diagnostics%20Report.pdf [consulté le 25 Octobre 2020]
8. Ngo A, Gandhi P, Miller WG. Frequency that Laboratory Tests Influence Medical Decisions. J Appl Lab Med. Oxford Academic; 2017;1:410–4.
9. Rohr U-P, Binder C, Dieterle T, Giusti F, Messina CGM, Toerien E, et al. The Value of In Vitro Diagnostic Testing in Medical Practice: A Status Report. PLoS ONE. 2016;11:e0149856.
10. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. Ann Clin Biochem. SAGE Publications; 2010;47:101–10.
11. Reason J. Human error: models and management. BMJ. British Medical Journal Publishing Group; 2000;320:768–70.
12. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem. 2007;53:1338–42.
13. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clin Chim Acta. 2009;404:16–23.
14. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med. 2006;44:750–9.
15. Klee G. Impact on medical decisions, a study at the Mayo Clinic, USA. Requirements of physicians for standardized/comparable measurements. Disponible: https://www.bipm.org/ws/JCTLM/ORIGINS/Allowed/Documents/SPEAKER-KLEE.pdf [consulté le 16 Juin2020]
16. Miller WG, Myers GL. Commutability Still Matters. Clin Chem. 2013;59:1291–3.
17. White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry. Ann Clin Biochem. 2011;48:393–409.
18. Vesper HW, Myers GL, Miller WG. Current practices and challenges in the standardization and harmonization of clinical laboratory tests. Am J Clin Nutr. 2016;104 Suppl 3:907S-12S.
19. Wielgosz RI, Maniguet S. JCTLM Database Report 2 December 2019. Disponible : https://www.bipm.org/cc/JCTLM/Allowed/December_2019/2-RWielgosz_JCTLM-DB_2019.pdf [consulté le 14 Janvier2020]
20. Buchta C, Coucke W, Mayr WR, Müller MM, Oeser R, Schweiger CR, et al. Evidence for the positive impact of ISO 9001 and ISO 15189 quality systems on laboratory performance - evaluation of immunohaematology external quality assessment results during 19 years in Austria. Clin Chem Lab Med. 2018;56:2039–46.

21. Survey_regarding_accreditation_of_medical_laboratories_within_EA_2019.pdf. Disponible: https://www.cofrac.fr/fileadmin/user_upload/cofrac/Actualites/Survey_regarding_accreditation_of_medical_laboratories_within_EA_2019.pdf [consulté le 3 Novembre 2020]
22. COFRAC. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale (SH GTA 06). Disponible : https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06 [consulté le 21 Octobre 2020]
23. Miller WG, Jones GR, Horowitz GL, Weykamp C. Proficiency Testing/External Quality Assessment: Current Challenges and Future Directions. Clin Chem. 2011;57:1670–80.
24. Braga F, Pasqualetti S, Panteghini M. The role of external quality assessment in the verification of in vitro medical diagnostics in the traceability era. Clin Biochem. 2018;57:23–8.
25. JCGM 200:2012. International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM 3rd edition). BIPM. Disponible: https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html [consulté le 13 Avril 2020]
26. ISO. ISO/IEC Guide 99:2007 Vocabulaire international de métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). Disponible: https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/04/53/45324.html [consulté le 20 Octobre 2020]
27. COFRAC. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (SH GTA 14). Disponible : https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-14 [consulté le 21 Octobre 2020]
28. ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement (Part 3. Guide to the expression of uncertainty in measurement GUM:1995). 2010.
29. Beastall GH, Brouwer N, Quiroga S, Myers GL. Traceability in laboratory medicine: a global driver for accurate results for patient care. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). De Gruyter; 2017;55:1100–8.
30. JCTLM. JCTLM Database Newsletter. Disponible: https://www.bipm.org/utils/common/pdf/JCTLM/JCTLM-Newsletter-2019.pdf [consulté le 21 Octobre 2020]
31. Perich C, Ricós C, Alvarez V, Biosca C, Boned B, Cava F, et al. External quality assurance programs as a tool for verifying standardization of measurement procedures: Pilot collaboration in Europe. Clin Chim Acta. 2014;432:82–9.
32. ANSM. Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. 2012.
33. CLSI. Characterization and Quantification of COmmutable Reference MAterials for Laboratory Medecine; Approved Guideline (CLSI C53-A). Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
34. Nilsson G, Budd JR, Greenberg N, Delatour V, Rej R, Panteghini M, et al. IFCC Working Group Recommendations for Assessing Commutability Part 2: Using the Difference in Bias Between a Reference Material and Clinical Samples. Clin Chem. 2018;64:455–64.
35. Kroll MH, Chesler R, Elin RJ. Effect of lyophilization on results of five enzymatic methods for cholesterol. Clin Chem. 1989;35:1523–6.
36. Marcovina SM, Adolphson JL, Parlavecchia M, Albers JJ. Effects of lyophilization of serum on the measurement of apolipoproteins A-I and B. Clin Chem. 1990;36:366–9.
37. Libeer JC, Hamers N. Factitiously low urate recoveries in control sera with the Beckman Synchron Systems. Scand J Clin Lab Invest. 1994;54:485–6.
38. Jeffrey W. Importance of Basic Research to United States' Competitiveness. Disponible: https://www.nist.gov/speech-testimony/importance-basic-research-united-states-competitiveness [consulté le 21 Octobre 2020]

39. Cobbaert C, Smit N, Gillery P. Metrological traceability and harmonization of medical tests: a quantum leap forward is needed to keep pace with globalization and stringent IVD-regulations in the 21st century! Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). De Gruyter; 2018;56:1598–602.

40. ISO. ISO 17511:2020 In vitro diagnostic medical devices - Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples. DIsponible : https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/99/69984.html [consulté le 25 Octobre 2020]

41. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. SAGE Open Med. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429642/ [consulté le 29 Juin 2020]

42. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. Crit Care Clin. 2009;25:83–101, viii.

43. Gül F, Arslantaş MK, Cinel İ, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. Turk J Anaesthesiol Reanim. 2017;45:129–38.

44. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. Lancet. 2013;381:774–5.

45. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. Clin Microbiol Rev. 2012;25:609–34.

46. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101:1644–55.

47. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 2014;5:4–11.

48. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31:1250–6.

49. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. American Medical Association; 2016;315:801–10.

50. Freund Y, Lemachatti N, Krastinova E, Laer MV, Claessens Y-E, Avondo A, et al. Prognostic Accuracy of Sepsis-3 Criteria for In-Hospital Mortality Among Patients With Suspected Infection Presenting to the Emergency Department. JAMA. American Medical Association; 2017;317:301–8.

51. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. The Lancet. 2020;395:200–11.

52. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006;34:344–53.

53. Shankar-Hari M, Harrison DA, Rubenfeld GD, Rowan K. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. Br J Anaesth. 2017;119:626–36.

54. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med. 2007;35:1244–50.

55. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. JAMA. 2010;303:2495–503.

56. Kempker JA, Kramer MR, Waller LA, Martin GS. Risk Factors for Septicemia Deaths and Disparities in a Longitudinal US Cohort. Open Forum Infect Dis. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290783/ [consulté le 17 Octobre 2020]

57. De La Rica AS, Gilsanz F, Maseda E. Epidemiologic trends of sepsis in western countries. Annals of Translational Medicine. 2016;4:2.

58. Evans L. A Closer Look at Sepsis-Associated Mortality. JAMA Netw Open. 2019;2:e187565.

59. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16045.

60. Vincent J-L, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. Critical Care. 2019;23:196.

61. Torio CM, Moore BJ. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief. Disponible : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368492/ [consulté le 31 Mars 2020]

62. Liang L, Moore R, Soni A. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2017. Disponible : https://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb261-Most-Expensive-Hospital-Conditions-2017.jsp [consulté le 1 Novembre 2020]

63. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. Crit Care Med. 2018;46:1889–97.

64. Lin G-L, McGinley JP, Drysdale SB, Pollard AJ. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. Front Immunol. 2018;9:2147.

65. Heffner AC, Horton JM, Marchick MR, Jones AE. Etiology of Illness in Patients with Severe Sepsis Admitted to the Hospital from the Emergency Department. Clin Infect Dis. 2010;50:814–20.

66. Husebye A, Baxter C, Wesenberg E, Hansen G. 1007. Etiology of Sepsis; A Systematic Review of Emergency Department Sepsis. Open Forum Infect Dis. 2018;5:S300.

67. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. JAMA. American Medical Association; 2009;302:2323–9.

68. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. BMJ. 2016;353:i1585.

69. rjjaramillo. Sepsis [Internet]. Welcome to Jeremy Jaramillo's Blog. Disponible : https://rjjaramillo.wordpress.com/2012/11/09/sepsis/ [consulté le 3 Novembre 2020]

70. ASSIM : Collège des Enseignants d'Immunologie. Immunologie fondamentale et immunopathologie. 2nd ed. Elsevier Masson; 2018.

71. Delaloye JD, Baumgartner TC. Sepsis sévère et choc septique. Revue Médicale Suisse. 2006;2.

72. Netgen. Prise en charge initiale du sepsis sévère et du choc septique. Disponible : https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-438/Prise-en-charge-initiale-du-sepsis-severe-et-du-choc-septique [consulté le 21 Octobre 2020]

73. Bossi P, Grimaldi D, Caille V, Vieillard-Baron A. Diagnostic du sepsis, du sepsis sévère et du choc septique. La Presse Médicale. 2004;33:262–4.

74. Calderari B, Liaudet L. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction d'organes au cours du sepsis. Revue Médicale Suisse. 2010;6:2406–9.

75. Wiel E, Lebuffe G, Vallet B. Activation de la coagulation dans le sepsis sévère - Place de la protéine C activée. Thérapeutique. 2002;16:5.

76. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA. 1995;273:934–41.

77. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of Septic Shock with the Tumor Necrosis Factor Receptor:Fc Fusion Protein. New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society; 1996;334:1697–702.

78. Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. Swiss Med Wkly. 2008;138:629–34.

79. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. Lancet. 2004;364:545–8.

80. Cuche A, Rutz P, Trueb L. Prise en charge initiale du sepsis sévère et du choc septique. Revue Médicale Suisse. 2014;10:1490–4.

81. Bates DW, Sands K, Miller E, Lanken PN, Hibberd PL, Graman PS, et al. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. J Infect Dis. 1997;176:1538–51.

82. Douglas RG (Robert G. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015.

83. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69:89–95.

84. Abadie JM. Henry Bence Jones: The Father of Clinical Chemistry? Laboratory Medicine. 2009;3:181–2.

85. Nikulina D, Terentyev A, Galimzyanov K, Jurisic V. Fifty years of discovery of alpha-fetoprotein as the first tumor marker. Srp Arh Celok Lek. 2015;143:100–4.

86. Maisel A. Biomonitoring and biomarker-guided therapy: the next step in heart failure and biomarker research. J Am Coll Cardiol. 2011;58:1890–2.

87. Simpkins AN, Janowski M, Oz HS, Roberts J, Bix G, Doré S, et al. Biomarker Application for Precision Medicine in Stroke. Transl Stroke Res. 2020;11:615–27.

88. Lemarié J, Gibot S. Combinaison de biomarqueurs pour le diagnostic du sepsis en réanimation. Réanimation. 2013;22:306–13.

89. Marshall JC, Reinhart K, International Sepsis Forum. Biomarkers of sepsis. Crit Care Med. 2009;37:2290–8.

90. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care. 2010;14:R15.

91. Liu Y, Hou J, Li Q, Chen K, Wang S-N, Wang J. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. SpringerPlus. 2016;5:2091.

92. Teggert A, Datta H, Ali Z. Biomarkers for Point-of-Care Diagnosis of Sepsis. Micromachines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020;11:286.

93. Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J, et al. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. Critical Care. 2007;11:R38.

94. Gibot S, Béné MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:65–71.

95. Gluck E, Nguyen HB, Yalamanchili K, McCusker M, Madala J, Corvino FA, et al. Real-world use of procalcitonin and other biomarkers among sepsis hospitalizations in the United States: A retrospective, observational study. PLoS One. 2018;13:e0205924.

96. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital Deaths in Patients With Sepsis From 2 Independent Cohorts. JAMA. American Medical Association; 2014;312:90–2.

97. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med. 2006;34:1589–96.

98. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med. 2017;43:304–77.

99. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. Clinical Infectious Diseases. 2007;44:S27–72.

100. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. Critical Care Medicine. 2013;41:580–637.

101. Rabechault F, Bart F. Le remplissage vasculaire. Disponible : https://www.sfmu.org/upload/70_formation/02_eformation/02_congres/Urgences/urgences 2015/donnees/pdf/124.pdf [consulté le 18 Octobre 2020]

102. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. J Antibiot. 2017;70:3–24.

103. Årdal C, Balasegaram M, Laxminarayan R, McAdams D, Outterson K, Rex JH, et al. Antibiotic development - economic, regulatory and societal challenges. Nat Rev Microbiol. 2020;18:267–74.

104. WHO. Antibacterial products in clinical development for priority pathogens. Disponible : http://www.who.int/research-observatory/monitoring/processes/antibacterial_products/en/ [consulté le 18 Octobre 2020]

105. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. Disponible: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02928/full [consulté le 1 Novembre 2020]

106. Académie nationale de médecine. La résistance aux β-lactamines les plus récentes : les mécanismes d'apparition et de diffusion de la résistance chez les entérobactéries. Disponible : http://www.academie-medecine.fr/la-resistance-aux-%ce%b2-lactamines-les-plus-recentes-les-mecanismes-dapparition-et-de-diffusion-de-la-resistance-chez-les-enterobacteries/ [consulté le 18 Octobre 2020]

107. De Angelis G, Del Giacomo P, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β-Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. Int J Mol Sci. 2020;21.

108. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115:E3463–70.

109. Fridkin, Baggs, Fagan, Magill, Pollack. Morbidity and Mortality Weekly Report - Vital Signs: Improving Antibiotic Use Among Hospitalized Patients. Disponible : https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6309a4.htm [consulté le 25 Juin 2020]

110. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. P T. 2015;40:277–83.

111. Bartoletti M, Antonelli M, Blasi FAB, Casagranda I, Chieregato A, Fumagalli R, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: an expert consensus. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). De Gruyter; 2018;56:1223–9.

112. Klein EY, Milkowska-Shibata M, Tseng KK, Sharland M, Gandra S, Pulcini C, et al. Assessment of WHO antibiotic consumption and access targets in 76 countries, 2000–15: an analysis of pharmaceutical sales data. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309920303327 [consulté le 12 Septembre 2020]

113. World Health Organization. Antimicrobial resistance: a priority for global health action. Disponible : https://www.who.int/bulletin/volumes/93/7/15-158998/en/ [consulté le 30 Avril 2020]

114. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. Lancet Infect Dis. 2019;19:56–66.

115. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. The State of the World's Antibiotics. Disponible : https://cddep.org/publications/state_worlds_antibiotics_2015/ [consulté le 18 Octobre 2020]

116. Laxminarayan R, Van Boeckel T, Frost I, Kariuki S, Khan EA, Limmathurotsakul D, et al. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. Lancet Infect Dis. 2020;20:e51–60.

117. O'Neill J. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final report and recommendations - The Review on antimicrobial resistance. Disponible : https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf [consulté le 21 Octobre 2020]

118. OECD. Antimicrobial resistance-Tackling the burden in the European Union. Disponible : https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf [consulté le 21 Octobre 2020]

119. Luyt C-E, Bréchot N, Trouillet J-L, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. Critical Care. 2014;18:480.

120. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 2003;111:1265–73.

121. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa and alternative therapeutic options. Int J Med Microbiol. 2016;306:48–58.

122. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18:318–27.

123. Schuetz P, Bretscher C, Bernasconi L, Mueller B. Overview of procalcitonin assays and procalcitonin-guided protocols for the management of patients with infections and sepsis. Expert Rev Mol Diagn. 2017;17:593–601.

124. Moya F, Nieto A, R-Candela JL. Calcitonin biosynthesis: evidence for a precursor. Eur J Biochem. 1975;55:407–13.

125. Maruna P, Nedelníková K, Gürlich R. Physiology and genetics of procalcitonin. Physiol Res. 2000;49 Suppl 1:S57-61.

126. Broad PM, Symes AJ, Thakker RV, Craig RK. Structure and methylation of the human calcitonin/alpha-CGRP gene. Nucleic Acids Res. 1989;17:6999–7011.

127. Becker KL, Nylén ES, White JC, Müller B, Snider RH. Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:1512–25.

128. Nishikura T. Procalcitonin (PCT) production in a thyroidectomized patient. Intensive Care Med. 1999;25:1031.

129. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1999;134:49–55.

130. Müller B, White JC, Nylén ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:396–404.

131. Weglöhner W, Struck J, Fischer-Schulz C, Morgenthaler NG, Otto A, Bohuon C, et al. Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. Peptides. 2001;22:2099–103.

132. Wrenger S, Kähne T, Bohuon C, Weglöhner W, Ansorge S, Reinhold D. Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV). FEBS Lett. 2000;466:155–9.

133. Christ-Crain M, Müller B. Procalcitonin in bacterial infections - hype, hope, more or less? SWISS MED WKLY. 2005;135:451–60.

134. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79:1605–8.

135. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. Cytokine. 2015;74:27–34.

136. Kuribayashi T. Elimination half-lives of interleukin-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 synthesized in response to inflammatory stimulation in rats. Lab Anim Res. 2018;34:80–3.

137. Clinical Utilities of Procalcitonin (PCT). Disponible : https://www.procalcitonin.com/clinical-utilities/ [consulté le 6 Décembre 2020]

138. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D, Roche-Campo F, Ara Somohano C, Fartoukh M, et al. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. Intensive Care Med. 2011;37:796–800.

139. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? Crit Care Clin. 2006;22:503–19.

140. Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, et al. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. Crit Care Med. 2000;28:977–83.

141. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2004;39:206–17.

142. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2013;13:426–35.

143. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:396–402.

144. Vincent J-L, Beumier M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:265–75.

145. Meisner M. Update on Procalcitonin Measurements. Ann Lab Med. 2014;34:263–73.

146. Schuetz P, Birkhahn R, Sherwin R, Jones AE, Singer A, Kline JA, et al. Serial Procalcitonin Predicts Mortality in Severe Sepsis Patients: Results From the Multicenter Procalcitonin MOnitoring SEpsis (MOSES) Study. Critical Care Medicine. 2017;45:781–789.

147. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, Greenwald JL. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. Arch Intern Med. 2011;171:1322–31.

148. Bouadma L, Luyt C-E, Tubach F, Cracco C, Alvarez A, Schwebel C, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. Lancet. 2010;375:463–74.

149. Goldberg B. Clinical considerrations for Procalcitonin-Guided Evaluation and Management of Lower Respiratory Tract Infections and Sepsis. Disponible : https://www.fda.gov/media/101233/download [consulté le 21 Octobre 2020]

150. AHRQ. Procalcitonin-guided antibiotic therapy. 2012. Disponible : Procalcitonin-Guided Antibiotic Therapy - Comparative Effectiveness Review Summary Guides for Clinicians - NCBI Bookshelf (nih.gov) [consulté le 21 Octobre 2020]

151. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. Clin Infect Dis. 2016;62:e51–77.

152. NICE. Sepsis: recognition, diagnosis and early management. 2016;52.

153. Nobre V, Harbarth S, Graf J-D, Rohner P, Pugin J. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177:498–505.

154. Jong E de, Oers JA van, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. The Lancet Infectious Diseases. Elsevier; 2016;16:819–27.

155. Albrich WC, Dusemund F, Bucher B, Meyer S, Thomann R, Kühn F, et al. Effectiveness and safety of procalcitonin-guided antibiotic therapy in lower respiratory tract infections in "real life": an international, multicenter poststudy survey (ProREAL). Arch Intern Med. 2012;172:715–22.

156. Schuetz P, Müller B, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. Cochrane Database Syst Rev. 2012;CD007498.

157. Luong Ba K, Carballo S, Harbarth S. Procalcitonine : doser ou ne pas doser ? Revue Médicale Suisse. 2013;9:1881–5.

158. Huang DT, Yealy DM, Filbin MR, Brown AM, Chang C-CH, Doi Y, et al. Procalcitonin-Guided Use of Antibiotics for Lower Respiratory Tract Infection. New England Journal of Medicine. 2018;379:236–49.

159. Balk RA, Kadri SS, Cao Z, Robinson SB, Lipkin C, Bozzette SA. Effect of Procalcitonin Testing on Health-care Utilization and Costs in Critically Ill Patients in the United States. Chest. 2017;151:23–33.

160. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. Lancet. 2004;363:600–7.

161. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, Müller C, Miedinger D, Huber PR, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:84–93.

162. Kip MMA, van Oers JA, Shajiei A, Beishuizen A, Berghuis AMS, Girbes AR, et al. Cost-effectiveness of procalcitonin testing to guide antibiotic treatment duration in critically ill patients: results from a randomised controlled multicentre trial in the Netherlands. Critical Care. 2018;22:293.

163. Voermans AM, Mewes JC, Broyles MR, Steuten LMG. Cost-Effectiveness Analysis of a Procalcitonin-Guided Decision Algorithm for Antibiotic Stewardship Using Real-World U.S. Hospital Data. OMICS. 2019;23:508–15.

164. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Uris J, Leiva-Salinas C, Pilot Group of the Appropriate Utilization of Laboratory Tests (REDCONLAB) working group. Procalcitonin in the Emergency Department: A potential expensive over-request that can be modulated through institutional protocols. Am J Emerg Med. 2018;36:158–60.

165. Hügle T, Schuetz P, Mueller B, Laifer G, Tyndall A, Regenass S, et al. Serum procalcitonin for discrimination between septic and non-septic arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2008;26:453–6.

166. Hausfater P. Procalcitonine ou CRP : quelle utilisation rationnelle en médecine d'urgence de deux biomarqueurs de l'inflammation et de l'infection ? 2009;10.

167. Demir NA, Sumer S, Celik G, Afsar RE, Demir LS, Ural O. How should procalcitonin and C-reactive protein levels be interpreted in haemodialysis patients? Internal Medicine Journal. 2018;48:1222–8.

168. Trimboli P, Giovanella L. Procalcitonin as Marker of Recurrent Medullary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. Endocrinol Metab (Seoul). 2018;33:204–10.

169. Stocker M, Hop WC, van Rossum AM. Neonatal Procalcitonin Intervention Study (NeoPInS): Effect of Procalcitonin-guided decision making on Duration of antibiotic Therapy in suspected neonatal early-onset Sepsis: A multi-centre randomized superiority and non-inferiority Intervention Study. BMC Pediatr. 2010;10:89.

170. Gowin E, Wysocki J. Limited diagnostic value of procalcitonin in early diagnosis of adult onset Still's disease. Reumatologia. 2016;54:207–11.

171. Meisner M, Adina H, Schmidt J. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. Crit Care. 2006;10:R1.

172. Okada Y, Minakami H, Tomomasa T, Kato M, Inoue Y, Kozawa K, et al. Serum procalcitonin concentration in patients with Kawasaki disease. J Infect. 2004;48:199–205.

173. Abramowicz D, Schandene L, Goldman M, Crusiaux A, Vereerstraeten P, De Pauw L, et al. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. Transplantation. 1989;47:606–8.

174. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. Clin Chim Acta. 2020;505:190–1.

175. Wheeler MJ. Automated immunoassay analysers. Ann Clin Biochem. 2001;38:217–29.

176. Ceriotti F, Marino I, Motta A, Carobene A. Analytical evaluation of the performances of Diazyme and BRAHMS procalcitonin applied to Roche Cobas in comparison with BRAHMS PCT-sensitive Kryptor. Clin Chem Lab Med. 2017;56:162–9.

177. Prod'hom G, Bille J. Diagnostic des maladies infectieuses : place des "Point of care tests" (POCT). Rev med Suisse. 2008;4:908–13.

178. Ghrera AS. Quantum dot modified interface for electrochemical immunosensing of procalcitonin for the detection of urinary tract infection. Anal Chim Acta. 2019;1056:26–33.

179. Gruteser N, Kohlhas V, Balfanz S, Franzen A, Günther A, Offenhäusser A, et al. Establishing a sensitive fluorescence-based quantification method for cyclic nucleotides. BMC Biotechnol. 2020;20:47.

180. Jing W, Wang Y, Yang Y, Wang Y, Ma G, Wang S, et al. Time-Resolved Digital Immunoassay for Rapid and Sensitive Quantitation of Procalcitonin with Plasmonic Imaging. ACS Nano. 2019;13:8609–17.

181. Molinero-Fernández Á, López MÁ, Escarpa A. An on-chip microfluidic-based electrochemical magneto-immunoassay for the determination of procalcitonin in plasma obtained from sepsis diagnosed preterm neonates. Analyst. 2020;145:5004–10.

182. Vashist SK, Schneider EM, Barth E, Luong JHT. Surface plasmon resonance-based immunoassay for procalcitonin. Anal Chim Acta. 2016;938:129–36.

183. Krastins B, Prakash A, Sarracino DA, Nedelkov D, Niederkofler EE, Kiernan UA, et al. Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum. Clin Biochem. 2013;46:399–410.

184. Dubois C. Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides. [Thèse doctorale] Université Paris-Saclay; 2019.

185. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. Molecular Systems Biology. 2017;13:942.

186. van den Broek I, Niessen WMA, van Dongen WD. Bioanalytical LC–MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. Journal of Chromatography B. 2013;929:161–79.

187. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. Experimental Neurology. 2015;273:57–68.

188. Leeman M, Choi J, Hansson S, Storm MU, Nilsson L. Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood—size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). Anal Bioanal Chem. 2018;410:4867–73.

189. Hortin GL, Sviridov D. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. Journal of Proteomics. 2010;73:629–36.

190. Végvári A, Welinder C, Lindberg H, Fehniger TE, Marko-Varga G. Biobank resources for future patient care: developments, principles and concepts. J Clin Bioinforma. 2011;1:24.

191. Lathrop JT, Hayes TK, Carrick K, Hammond DJ. Rarity gives a charm: evaluation of trace proteins in plasma and serum. Expert Rev Proteomics. 2005;2:393–406.

192. Schwenk JM, Omenn GS, Sun Z, Campbell DS, Baker MS, Overall CM, et al. The Human Plasma Proteome Draft of 2017: Building on the Human Plasma PeptideAtlas from Mass Spectrometry and Complementary Assays. J Proteome Res. American Chemical Society; 2017;16:4299–310.

193. Ignjatovic V, Geyer PE, Palaniappan KK, Chaaban JE, Omenn GS, Baker MS, et al. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. J Proteome Res. 2019;18:4085–97.

194. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. Proteomics. 2005;5:3226–45.

195. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics. 2002;1:845–67.

196. Porter JJ, Wildsmith J, Melm CD, Schuchard MD, Ray KM, Chen DE, et al. Absolute Quantification of the Lower Abundance Proteome through Immunoaffinity Depletion of the twenty most abundant proteins in human serum. Disponible : https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/mass-spectrometry/protein-aqua/absolute-quantification-of-serum-proteome.html [consulté le 2 Novembre 2020]

197. Hsieh S-Y, Chen R-K, Pan Y-H, Lee H-L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. Proteomics. 2006;6:3189–98.

198. Plebani M, Banfi G, Bernardini S, Bondanini F, Conti L, Dorizzi R, et al. Serum or plasma? An old question looking for new answers. Clin Chem Lab Med. 2020;58:178–87.

199. Rosenberg-Hasson Y, Hansmann L, Liedtke M, Herschmann I, Maecker HT. Effects of serum and plasma matrices on multiplex immunoassays. Immunol Res. 2014;58:224–33.

200. Dupin M, Fortin T, Larue-Triolet A, Surault I, Beaulieu C, Gouel-Chéron A, et al. Impact of Serum and Plasma Matrices on the Titration of Human Inflammatory Biomarkers Using Analytically Validated SRM Assays. J Proteome Res. 2016;15:2366–78.

201. Zimmermann M, Traxler D, Simader E, Bekos C, Dieplinger B, Lainscak M, et al. In vitro Stability of Heat Shock Protein 27 in Serum and Plasma Under Different Pre-analytical Conditions: Implications for Large-Scale Clinical Studies. Ann Lab Med. 2016;36:353–7.

202. Lippi G, Salvagno GL, Danese E, Lima-Oliveira G, Brocco G, Guidi GC. Inversion of lithium heparin gel tubes after centrifugation is a significant source of bias in clinical chemistry testing. Clin Chim Acta. 2014;436:183–7.

203. Zhu Y, Zhao R, Piehowski PD, Moore RJ, Lim S, Orphan VJ, et al. Subnanogram proteomics: Impact of LC column selection, MS instrumentation and data analysis strategy on proteome coverage for trace samples. International Journal of Mass Spectrometry. 2018;427:4–10.

204. Wilffert D, Reis CR, Hermans J, Govorukhina N, Tomar T, de Jong S, et al. Antibody-free LC-MS/MS quantification of rhTRAIL in human and mouse serum. Anal Chem. 2013;85:10754–60.

205. Wilffert D, Donzelli R, Asselman A, Hermans J, Govorukhina N, Ten Hacken NH, et al. Quantitative antibody-free LC-MS/MS analysis of sTRAIL in sputum and saliva at the sub-ng/mL level. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2016;1032:205–10.

206. Neubert H, Muirhead D, Kabir M, Grace C, Cleton A, Arends R. Sequential protein and peptide immunoaffinity capture for mass spectrometry-based quantification of total human β-nerve growth factor. Anal Chem. 2013;85:1719–26.

207. Al Ali A. Le dosage des cytochromes P450 (CYPs) humains par spectrométrie de masse : application en toxicologie. [Thèse doctorale] Université Paris Descartes. 2015.

208. Mass Spectrometry Facility | Quadrupole. Disponible : http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml [consulté le 3 Novembre 2020]

209. Snow J. The environmental, elemental and proteomic plasticity of Trichodesmium in the (sub) tropical atlantic. [Thèse doctorale] University of Southampton Ocean and Earth Science. 2014.

210. Gallien S, Duriez E, Crone C, Kellmann M, Moehring T, Domon B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Molecular & Cellular Proteomics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2012;11:1709–23.

211. Rauniyar N. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. Int J Mol Sci. 2015;16:28566–81.

212. Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, Westphall MS, Coon JJ. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. Mol Cell Proteomics. 2012;11:1475–88.

213. Kim YJ, Gallien S, van Oostrum J, Domon B. Targeted proteomics strategy applied to biomarker evaluation. Proteomics Clin Appl. 2013;7:739–47.

214. Liu S. Analyse protéomique ciblée à haute résolution : un outile puissant pour le diagnostic clinique à partir de prélèvements de tissus amyloïdes bruts. [Thèse doctorale] ESPCI - Université PSL2016.

215. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. American Association for the Advancement of Science; 1989;246:64–71.

216. Smith LM, Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. Nat Methods. 2013;10:186–7.

217. Smith LM, Kelleher NL. Proteoforms as the next proteomics currency. Science. 2018;359:1106–7.

218. Bronsema KJ, Bischoff R, van de Merbel NC. High-sensitivity LC-MS/MS quantification of peptides and proteins in complex biological samples: the impact of enzymatic digestion and internal standard selection on method performance. Anal Chem. 2013;85:9528–35.

219. Tanna NN, Lame ME, Wrona M. Development of an UPLC/MS–MS method for quantification of intact IGF-I from human serum. Bioanalysis. 2020;12:53–65.

220. Scherl A. Clinical protein mass spectrometry. Methods. 2015;81:3–14.

221. Nesvizhskii AI, Aebersold R. Interpretation of Shotgun Proteomic Data: The Protein Inference Problem. Mol Cell Proteomics. 2005;4:1419–40.

222. Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top Down Proteomics: Facts and Perspectives. Biochem Biophys Res Commun. 2014;445:683–93.

223. Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, et al. Isotope-labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. Mol Cell Proteomics. 2007;6:2139–49.

224. Kuhn E, Whiteaker JR, Mani DR, Jackson AM, Zhao L, Pope ME, et al. Interlaboratory evaluation of automated, multiplexed peptide immunoaffinity enrichment coupled to multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantifying proteins in plasma. Mol Cell Proteomics. 2012;11:M111.013854.

225. Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A. Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. Journal of Proteomics. 2009;72:740–9.

226. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and 13C-labeled peptide standards. Proteomics. 2004;4:1175–86.

227. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, Multiplexed Assays for Low Abundance Proteins in Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. Mol Cell Proteomics. 2007;6:2212–29.

228. Adrait A, Lebert D, Trauchessec M, Dupuis A, Louwagie M, Masselon C, et al. Development of a Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) assay for the quantification of Staphylococcus aureus enterotoxin A in serum. J Proteomics. 2012;75:3041–9.

229. Fu Y, Li W, Flarakos J. Highly selective and sensitive LC-MS/MS quantification of a therapeutic protein in human serum using immunoaffinity capture enrichment. Journal of Chromatography B. 2018;1100–1101:83–90.

230. Domanski D, Percy AJ, Yang J, Chambers AG, Hill JS, Freue GVC, et al. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. Proteomics. 2012;12:1222–43.

231. Biarc J, Simon R, Fonbonne C, Léonard J-F, Gautier J-C, Pasquier O, et al. Absolute quantification of podocalyxin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A. 2015;1397:81–5.

232. Simpson DM, Beynon RJ. QconCATs: design and expression of concatenated protein standards for multiplexed protein quantification. Anal Bioanal Chem. 2012;404:977–89.

233. Arsene CG, Ohlendorf R, Burkitt W, Pritchard C, Henrion A, Gavin O'Connor, et al. Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy. Anal Chem. 2008;80:4154–60.

234. Buscher B a. P, Gerritsen H, van Schöll I, Cnubben NHP, Brüll LP. Quantitative analysis of Tenecteplase in rat plasma samples using LC-MS/MS as an alternative for ELISA. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;852:631–4.

235. Kumar V, Barnidge DR, Chen L-S, Twentyman JM, Cradic KW, Grebe SK, et al. Quantification of serum 1-84 parathyroid hormone in patients with hyperparathyroidism by immunocapture in situ digestion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2010;56:306–13.

236. Winther B, Moi P, Nordlund MS, Lunder N, Paus E, Reubsaet JLE. Absolute ProGRP quantification in a clinical relevant concentration range using LC-MS/MS and a comprehensive internal standard. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009;877:1359–65.

237. Faria M, Halquist MS, Yuan M, Mylott W, Jenkins RG, Karnes HT. Comparison of a stable isotope labeled (SIL) peptide and an extended SIL peptide as internal standards to track digestion variability of an unstable signature peptide during quantification of a cancer biomarker, human osteopontin, from plasma using capillary microflow LC–MS/MS. Journal of Chromatography B. 2015;1001:156–68.

238. Klont F, Joosten MR, Ten Hacken NHT, Horvatovich P, Bischoff R. Quantification of the soluble Receptor of Advanced Glycation End-Products (sRAGE) by LC-MS after enrichment by strong cation exchange (SCX) solid-phase extraction (SPE) at the protein level. Analytica Chimica Acta. 2018;1043:45–51.

239. Klont F, Pouwels SD, Hermans J, van de Merbel NC, Horvatovich P, ten Hacken NHT, et al. A fully validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of the soluble receptor of advanced glycation end-products (sRAGE) in serum using immunopurification in a 96-well plate format. Talanta. 2018;182:414–21.

240. Such-Sanmartín G, Bache N, Bosch J, Gutiérrez-Gallego R, Segura J, Jensen ON. Detection and differentiation of 22 kDa and 20 kDa Growth Hormone proteoforms in human plasma by LC-MS/MS. Biochim Biophys Acta. 2015;1854:284–90.

241. Kuhn E, Addona T, Keshishian H, Burgess M, Mani DR, Lee RT, et al. Developing Multiplexed Assays for Troponin I and Interleukin-33 in Plasma by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. Clin Chem. 2009;55:1108–17.

242. Whiteaker JR, Zhao L, Anderson L, Paulovich AG. An Automated and Multiplexed Method for High Throughput Peptide Immunoaffinity Enrichment and Multiple Reaction Monitoring Mass

Spectrometry-based Quantification of Protein Biomarkers. Mol Cell Proteomics. 2010;9:184–96.

243. Kuhn E, Whiteaker JR, Mani DR, Jackson AM, Zhao L, Pope ME, et al. Interlaboratory Evaluation of Automated, Multiplexed Peptide Immunoaffinity Enrichment Coupled to Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for Quantifying Proteins in Plasma. Mol Cell Proteomics. 2012;11:M111.013854

244. Gilquin B, Louwagie M, Jaquinod M, Cez A, Picard G, El Kholy L, et al. Multiplex and accurate quantification of acute kidney injury biomarker candidates in urine using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and targeted proteomics. Talanta. 2017;164:77–84.

245. Fortin T, Salvador A, Charrier JP, Lenz C, Lacoux X, Morla A, et al. Clinical Quantitation of Prostate-specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/Milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests. Mol Cell Proteomics. 2009;8:1006–15.

246. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Mani DR, Shi X, Kuhn E, et al. Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Patient Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. Mol Cell Proteomics. 2009;8:2339–49.

247. Bailly-Chouriberry L, Cormant F, Garcia P, Kind A, Popot M-A, Bonnaire Y. Identification of α-Cobratoxin in Equine Plasma by LC-MS/MS for Doping Control. Anal Chem. 2013;85:5219–25.

248. Zhang H, Xiao Q, Xin B, Trigona W, Tymiak AA, Dongre AR, et al. Development of a highly sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to quantify total and free levels of a target protein, interferon-gamma-inducible protein-10, at picomolar levels in human serum. Rapid Commun Mass Spectrom. 2014;28:1535–43.

249. Such-Sanmartín G, Bache N, Callesen AK, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. Targeted mass spectrometry analysis of the proteins IGF1, IGF2, IBP2, IBP3 and A2GL by blood protein precipitation. Journal of Proteomics. 2015;113:29–37.

250. Yang Z, Ke J, Hayes M, Bryant M, Tse FLS. A sensitive and high-throughput LC–MS/MS method for the quantification of pegylated-interferon-α2a in human serum using monolithic C18 solid phase extraction for enrichment. Journal of Chromatography B. 2009;877:1737–42.

251. Szapacs ME, Urbanski JJ, Kehler JR, Wilson R, Boram SL, Hottenstein CS, et al. Absolute quantification of a therapeutic domain antibody using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry and immunoassay. Bioanalysis. 2010;2:1597–608.

252. Wilffert D, Asselman A, Donzelli R, Hermans J, Govorukhina N, Quax WJ, et al. Highly sensitive antibody-free µLC-MS/MS quantification of rhTRAIL in serum. Bioanalysis. 2016;8:881–90.

253. Proc JL, Kuzyk MA, Hardie DB, Yang J, Smith DS, Jackson AM, et al. A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. J Proteome Res. 2010;9:5422–37.

254. Lin Y, Zhou J, Bi D, Chen P, Wang X, Liang S. Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. Analytical Biochemistry. 2008;377:259–66.

255. Lau BYC, Othman A. Evaluation of sodium deoxycholate as solubilization buffer for oil palm proteomics analysis. PLoS One. 2019;14:e0221052.

256. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J Proteome Res. 2008;7:731–40.

257. Shahinuzzaman ADA, Chakrabarty JK, Fang Z, Smith D, Kamal AHM, Chowdhury SM. Improved in-solution trypsin digestion method for methanol–chloroform precipitated cellular proteomics sample. Journal of Separation Science. 2020;43:2125–32.

258. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2003;785:263–75.

259. Wiśniewski JR, Wegler C, Artursson P. Subcellular fractionation of human liver reveals limits in global proteomic quantification from isolated fractions. Analytical Biochemistry. 2016;509:82–8.

260. Humbert L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. Ann Toxicol Anal. 2010;22:61–8.

261. Shi T, Sun X, Gao Y, Fillmore TL, Schepmoes AA, Zhao R, et al. Targeted quantification of low ng/mL level proteins in human serum without immunoaffinity depletion. J Proteome Res. 2013;12:3353–61.

262. Qian W-J, Kaleta DT, Petritis BO, Jiang H, Liu T, Zhang X, et al. Enhanced Detection of Low Abundance Human Plasma Proteins Using a Tandem IgY12-SuperMix Immunoaffinity Separation Strategy. Mol Cell Proteomics. 2008;7:1963–73.

263. Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, Cheek KL, Stein SE, Slebos RJC, et al. Depletion of Abundant Plasma Proteins and Limitations of Plasma Proteomics. J Proteome Res. 2010;9:4982–91.

264. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, Hardie DB, Olafson RW, Pearson TW. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). J Proteome Res. 2004;3:235–44.

265. Whiteaker JR, Zhao L, Anderson L, Paulovich AG. An Automated and Multiplexed Method for High Throughput Peptide Immunoaffinity Enrichment and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry-based Quantification of Protein Biomarkers. Mol Cell Proteomics. 2010;9:184–96.

266. Ippoliti PJ, Kuhn E, Mani DR, Fagbami L, Keshishian H, Burgess MW, et al. Automated Microchromatography Enables Multiplexing of Immunoaffinity Enrichment of Peptides to Greater than 150 for Targeted MS-Based Assays. Anal Chem. 2016;88:7548–55.

267. Bouadma L, Luyt C-E, Tubach F, Cracco C, Alvarez A, Schwebel C, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. Lancet. 2010;375:463–74.

268. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. Lancet Infect Dis. 2016;16:819–27.

269. Fisher KA, Landyn V, Lindenauer PK, Walkey AJ. Procalcitonin Test Availability: A Survey of Acute Care Hospitals in Massachusetts. AnnalsAmerican Thoracic Society. 2017;14:1489–91.

270. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. Biochem Med (Zagreb). 2015;25:141–51.

271. Lippi G, Salvagno GL, Gelati M, Pucci M, Lo Cascio C, Demonte D, et al. Two-center comparison of 10 fully-automated commercial procalcitonin (PCT) immunoassays. Clin Chem Lab Med. 2019;58:77–84.

272. IFCC. Fédération Internationale de Biologie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC) 2015-2017. DIsponible : https://www.ifcc.org/media/292556/French_IFCC_Brochure.pdf [consulté le 20 Novembre 2020]

273. Josephs RD, Martos G, Li M, Wu L, Melanson JE, Quaglia M, et al. Establishment of measurement traceability for peptide and protein quantification through rigorous purity assessment—a review. Metrologia. 2019;56:044006.

274. Stocks BB, Thibeault M-P, Meija J, Melanson JE. Assessing MS-based quantitation strategies for low-level impurities in peptide reference materials: application to angiotensin II. Anal Bioanal Chem. 2018;410:6963–72.

275. Josephs RD, Stoppacher N, Daireaux A, Choteau T, Lippa KA, Phinney KW, et al. State-of-the-art and trends for the SI traceable value assignment of the purity of peptides using the model compound angiotensin I. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2018;101:108–19.

276. Hovasse A. Protéomique: maitrise de l'instrumentation, application et étude des glycosylations. [Thèse doctorale] Université de Strasbourg. 2010.

277. Giorgianni F, Cappiello A, Beranova-Giorgianni S, Palma P, Trufelli H, Desiderio DM. LC−MS/MS Analysis of Peptides with Methanol as Organic Modifier: Improved Limits of Detection. Anal Chem. American Chemical Society; 2004;76:7028–38.

278. Gangnus T, Burckhardt BB. Improving sensitivity for the targeted LC-MS/MS analysis of the peptide bradykinin using a design of experiments approach. Talanta. 2020;218:121134.

279. Shi T, Fillmore TL, Gao Y, Zhao R, He J, Schepmoes AA, et al. Long-gradient separations coupled with selected reaction monitoring for highly sensitive, large scale targeted protein quantification in a single analysis. Anal Chem. 2013; 85:9196-203

280. Nguyen TTTN, Mistarz UH, Costa N, Herbet A, Boquet D, Becher F, et al. Investigating the utility of minimized sample preparation and high-resolution mass spectrometry for quantification of monoclonal antibody drugs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018;159:384–92.

281. Nshanian M, Lakshmanan R, Chen H, Ogorzalek Loo RR, Loo JA. Enhancing Sensitivity of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry of Peptides and Proteins Using Supercharging Agents. Int J Mass Spectrom. 2018;427:157–64.

282. Lenčo J, Vajrychová M, Pimková K, Prokšová M, Benková M, Klimentová J, et al. Conventional-Flow Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Exploratory Bottom-Up Proteomic Analyses. Anal Chem. American Chemical Society; 2018;90:5381–9.

283. Bian Y, Zheng R, Bayer FP, Wong C, Chang Y-C, Meng C, et al. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS. Nature Communications. 2020;11:157.

284. Porter C. Comparison of commercial LC MS/MS compatible detergents with sodium deoxycholate for shorgun proteomics. Journal of Proteins and Proteomics. 2014;5:151–61.

285. Wang J, Lee YM, Li C, Li P, Li Z, Lim TK, et al. Dramatic Improvement of Proteomic Analysis of Zebrafish Liver Tumor by Effective Protein Extraction with Sodium Deoxycholate and Heat Denaturation. Int J Anal Chem. 2015:763969

286. Barthélemy NR, Fenaille F, Hirtz C, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Vialaret J, et al. Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. J Proteome Res. 2016;15:667–76.

287. Al Riyami S, Tang J, Galitzer H, Fraser W. LC-MS/MS measurement of parathyroid hormone PTH (1-34): Use in studying oral PTH (1-34) administration and possible diagnostic application in pseudohypoparathyroidism. [Poster] Society for Endocrinology BES 2017.

288. Bros P, Vialaret J, Barthelemy N, Delatour V, Gabelle A, Lehmann S, et al. Antibody-free quantification of seven tau peptides in human CSF using targeted mass spectrometry. Front Neurosci. 2015;9:302.

289. Viodé A, Epelbaum S, Benyounes I, Verny M, Dubois B, Junot C, et al. Simultaneous quantification of tau and α-synuclein in cerebrospinal fluid by high-resolution mass spectrometry for differentiation of Lewy Body Dementia from Alzheimer's Disease and controls. Analyst. 2019;144:6342–51.

290. Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, Heck AJR. Six alternative proteases for mass spectrometry–based proteomics beyond trypsin. Nature Protocols. Nature Publishing Group; 2016;11:993–1006.

291. Johnson M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. Disponible : https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html [consulté le 10 Avril 2020]

292. Feng M, Morales AB, Poot A, Beugeling T, Bantjes A. Effects of Tween 20 on the desorption of proteins from polymer surfaces. J Biomater Sci Polym Ed. 1995;7:415–24.

293. Erde J, Loo RRO, Loo JA. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. J Proteome Res. American Chemical Society; 2014;13:1885–95.

294. Olinares PDB, Dunn AD, Padovan JC, Fernandez-Martinez J, Rout MP, Chait BT. A robust workflow for native mass spectrometric analysis of affinity-isolated endogenous protein assemblies. Anal Chem. 2016;88:2799–807.

295. Mandal MK, Chen LC, Yu Z, Nonami H, Erra-Balsells R, Hiraoka K. Detection of protein from detergent solutions by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). J Mass Spectrom. 2011;46:967–75.

296. Walter J-G, Stahl F, Scheper T. Aptamers as affinity ligands for downstream processing. Engineering in Life Sciences. 2012;12:496–506.

297. Gupta V, Lassman ME, McAvoy T, Lee AY, Chappell DL, Laterza OF. An evaluation of an aptamer for use as an affinity reagent with MS: PCSK9 as an example protein. Bioanalysis. 2016;8:1557–64.

298. Richards SL, Cawley AT, Cavicchioli R, Suann CJ, Pickford R, Raftery MJ. Aptamer based peptide enrichment for quantitative analysis of gonadotropin-releasing hormone by LC-MS/MS. Talanta. 2016;150:671–80.

299. Klont F, Hadderingh M, Horvatovich P, ten Hacken NHT, Bischoff R. Affimers as an Alternative to Antibodies in an Affinity LC–MS Assay for Quantification of the Soluble Receptor of Advanced Glycation End-Products (sRAGE) in Human Serum. J Proteome Res. 2018;17:2892–9.

RÉSUMÉ

Le dosage de la procalcitonine (PCT) est un outil de choix pour le diagnostic précoce du sepsis et la gestion du traitement antibiotique. Comme les prises de décision médicales et la stratégie de prise en charge thérapeutique des patients reposent en général sur des valeurs seuil de concentration de PCT, il apparaît primordial de disposer de résultats de mesure fiables et comparables, quelle que soit la méthode de dosage employée, dans le temps, et dans l'espace. Or, de nombreuses méthodes de dosage de la PCT de type immunoessai sont actuellement disponibles et les résultats fournis par celles-ci ne sont pas toujours comparables. Cette situation peut s'expliquer en partie par l'absence de méthode de référence et de matériaux de référence certifiés d'ordre supérieur.

Ces travaux ont consisté dans un premier temps à documenter l'état actuel de la comparabilité des mesures de la PCT entres les méthodes de routine afin d'évaluer la nécessité d'établir la traçabilité métrologie des résultats aux unités SI. L'analyse de l'ensemble des études de corrélation publiées et des résultats de contrôles externes de qualité a montré qu'il est difficile d'évaluer correctement la comparabilité des résultats et de comprendre l'origine de leur variabilité à partir de matériaux dont la commutabilité n'a pas été démontrée. Aussi, parait-il indispensable de mener des campagnes d'évaluation externe de qualité utilisant des matériaux de contrôle commutables. Par ailleurs, afin de répondre aux exigences réglementaires relatives au raccordement métrologique des résultats de mesure et afin de pouvoir évaluer la justesse des méthodes de routine, une méthode de référence candidate pour la quantification absolue de la PCT dans le sérum humain par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a été développée et validée avec une limite de quantification de 0,25 ng/mL. Le raccordement des résultats aux unités SI a été établi par l'utilisation d'étalons primaires dont la pureté a été préalablement caractérisée par analyse des acides aminés avec correction de la contribution des impuretés identifiées par spectrométrie de masse haute résolution.

MOTS CLÉS

Procalcitonine, sepsis, antibiorésistance, méthode de référence, dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplé à la spectrométrie de masse, traçabilité métrologique

ABSTRACT

Procalcitonin measurement is a usefully tool to aid the early diagnosis and antibiotic stewardship for patients with sepsis. As sepsis diagnosis and antibiotic stewardship rely on fixed clinical cutoffs (threshold concentration values), ensuring accuracy and comparability of PCT results over time and space is essential to ensure an appropriate diagnostic and therapeutic management. Multiple immunoassays have been developed and commercialized. However, comparability of results remains questionable. There is no metrological traceability to the international system of units (SI) for PCT measurement due to the lack of higher order reference method and certified reference materials.

This work initially consisted in documenting the current state for results' comparability between the different commercially available immunoassays for PCT in order to evaluate the need to establish metrological traceability to the SI. The evaluation of correlation studies and external quality assessment schemes results indicate that properly evaluating the current state of result's comparability and discriminating the origin of result's discrepancies is made difficult because studies were conducted in non-harmonized conditions and commutability of the materials was not characterized. Thus, it seems essential to conduct quality external evaluation using commutable control materials. In order to evaluate accuracy of commercially available immunoassays for PCT and to meet the regulatory requirements for the metrological traceability of results, a candidate reference method based on isotopic dilution liquid chromatography coupled to mass spectrometry was developed and validated for an absolute quantification of PCT in human serum with a limit of quantification of 0.25 ng/mL. Results traceability to the SI units could be established thanks to a thorough purity assessment of the primary calibrators by amino acid analysis and correction of impurities contribution.

KEYWORDS

Procalcitonin, sepsis, reference method, isotope dilution liquid chromatography coupled to mass spectrometry, metrological traceability