



HAL
open science

Mise au point et validation de méthode du dosage de la N-acétylGlucosaminidase (NAGLU) sur leucocytes et sur goutte de sang séchée : diagnostic de la maladie de Sanfilippo type B

Judith Ducruet

► To cite this version:

Judith Ducruet. Mise au point et validation de méthode du dosage de la N-acétylGlucosaminidase (NAGLU) sur leucocytes et sur goutte de sang séchée : diagnostic de la maladie de Sanfilippo type B. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01799403

HAL Id: dumas-01799403

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01799403v1>

Submitted on 24 May 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2018

MISE AU POINT ET VALIDATION DE METHODE DU DOSAGE DE LA
N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE (NAGLU) SUR LEUCOCYTES ET SUR GOUTTE DE
SANG SECHEE : DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE SANFILIPPO TYPE B

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Judith DUCRUET

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 23/05/2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Le Professeur Patrice FAURE

Membres :

Mme. Le Docteur Sabrina VERGNAUD

Mme. Le Docteur Marie-Hélène PACLET

Mme. Le Docteur Alexa GARROS

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Michel SEVE

Vice-doyen et Directrice des Etudes : Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2017-2018

ENSEIGNANTS -CHERCHEURS

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE |
|--------------------|--------------------|-------------|----------------------------------|
| MCU | ALDEBERT | DELPHINE | LAPM-UMR CNRS 5163 |
| PU-PH | ALLENET | BENOIT | THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 |
| PU | BAKRI | ABDELAZIZ | TIMC-IMAG CNRS UMR 5525 |
| MAST | BARDET | JEAN-DIDIER | - |
| MCU | BATANDIER | CECILE | LBFA – INSERM U1055 |
| PU-PH | BEDOUC | PIERRICK | THEMAS TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525 |
| MCU | BELAIDI-CORSAT | ELISE | HP2 – INSERM U1042 |
| MAST | BELLET | BEATRICE | - |
| MCU | BOUCHERLE | BENJAMIN | DPM |
| DCE | BOULADE | MARINE | SyMMES |
| PU | BOUMENDJEL | AHCENE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | BOURGOIN | SANDRINE | IAB – CRI INSERM U823 |
| DCE | BOUVET | RAPHAEL | HP2 |
| MCU | BRETON | JEAN | LCIB – UMR E3 CEA |
| MCU | BRIANCON-MARJOLLET | ANNE | HP2 – INSERM U1042 |
| PU | BURMEISTER | WILHEM | UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS |
| MCU-PH | BUSSER | BENOIT | IAB – CRI INSERM U823 |
| MCU | CAVAILLES | PIERRE | LAPM – UMR 5163 CNRS |
| AHU | CHANOINE | SEBASTIEN | THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 |
| MCU | CHOISNARD | LUC | DPM – UMR 5063 CNRS |
| AHU | CHOVELON | BENOIT | DPM – UMR 5063 CNRS |
| PU-PH | CORNET | MURIEL | THEREX TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS |
| DCE | COUCHET | MORGANE | LBFA |
| Professeur Emérite | DANEL | VINCENT | - |
| PU | DECOUT | JEAN-LUC | DPM UMR 5063 CNRS |
| MCF | DEMEILLERS | CHRISTINE | TIMC-IMAG INSERM U1055 |
| PU-PH | DROUET | CHRISTIAN | GREPI |
| PU | DROUET | EMMANUEL | UVHCI UMI 3265 EMBL CNRS |
| MCU | DURMORT | CLAIRE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS |
| PU-PH | FAURE | PATRICE | HP2 – INSERM U1042 |
| MCU | FAURE-JOYEUX | MARIE | HP2- INSERM U1042 |

Mise à jour le 09/01/2018

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE |
|---------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|
| PRCE | FITE | ANDREE | - |
| AHU | GARNAUD | CECILE | THEREX TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS |
| PRAG | GAUCHARD | PIERRE-ALEXIS | - |
| MCU-PH | GERMI | RAPHAELLE | IBP-IBS UMI 3265 EMBL-CNRS |
| MCU | GEZE | ANNABELLE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | GILLY | CATHERINE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| PU | GODIN-RIBUOT | DIANE | HP2 INSERM U1042 |
| Professeure Emérite | GRILLOT | Renée | - |
| MCU | GROSSET | CATHERINE | DPM UMR 5063 CNRS |
| MCU | GUIEU | VALERIE | DPM UMR 5063 CNRS |
| AHU | HENNEBIQUE | AURELIE | TIMC-IMAG |
| MCU | HININGER-FAVIER | ISABELLE | LBFA |
| MCU | KHALEF | NAWEL | TIMC-IMAG CNRS UMR 5525 |
| MCU | KRIVOBOC | SERGE | LCBM IRTSV CEA |
| DCE | LE | CONG ANH KHANH | CERMA V |
| PU | LENORMAND | JEAN-LUC | THEREX TIMC-IMAG |
| PU | MARTIN | DONALD | TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS |
| PRCE | MATTHYS | LAURENCE | - |
| AHU | MAZET | ROSELINE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | MELO DI LIMA | CHRISTELLE | LECA – UMR CNRS 5553 |
| AHU | MINOVES | MELANIE | |
| PU | MOINARD | CHRISTOPHE | BFA INSERM U1055 |
| DCE | MONTEMAGNO | CHRISTOPHE R | LRB |
| DCE | MOULIN | SOPHIE | HP2 |
| PU-PH | MOSSUZ | PASCAL | |
| MCU | MOUHAMADOU | BELLO | LECA – UMR CNRS 5553 |
| MCU | NICOLLE | EDWIGE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | OUKACINE | FARID | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | PERES | BASILE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| MCU | PEUCHMAUR | MARINE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| PU | PEYRIN | ERIC | DPM – UMR 5063 CNRS |
| AHU | PLUCHART | HELENE | |
| MCU | RACHIDI | WALID | LCIB – UMR E3 CEA |
| MCU | RAVELET | CORINNE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| PU | RIBUOT | CHRISTOPHE | HP2 – INSERM U1042 |
| PAST | RIEU | ISABELLE | - |
| Professeure Emérite | ROUSSEL | ANNE-MARIE | - |
| PU-PH | SEVE | MICHEL | IAB-CR INSERM – U823 IAB |
| MCU | SOUARD | FLORENCE | DPM – UMR 5063 CNRS |

Mise à jour le 09/01/2018

| STATUT | NOM | PRENOM | LABORATOIRE |
|--------|--------------|---------|----------------------------|
| MCU | SPANO | MONIQUE | IBS – UMR 5075 CEA CNRS |
| DCE | TAHER | RALEB | IBS |
| MCU | TARBOURIECH | NICOLAS | UVHCI – UMR 3265 EMBL CNRS |
| MCU | VANHAVERBEKE | CECILE | DPM – UMR 5063 CNRS |
| DCE | VERNET | CELINE | CRI-IAB |
| DCE | VRAGNIAU | CHARLES | UVHCI |
| PU | WOUESSIDJEWE | DENIS | DPM – UMR 5063 CNRS |

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et
 de Cognition et Ontogenèse »
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institut Albert Bonniot,
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCU : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens
 Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la
 Santé
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR: Unité Mixte de Recherche
 UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 09/01/2018

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice Faure, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse. Je vous en suis très reconnaissante et vous témoigne ma profonde estime.

A Mesdames les directrices de thèse, le Docteur Sabrina Vergnaud et le Docteur Marie-Hélène Paclet, pour m'avoir confié ce projet et accompagné durant ce travail. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir la biochimie spécialisée et de m'avoir fait partager votre expertise et vos conseils.

A Madame le Docteur Alexa Garros, pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'apporter une vision clinique à ce travail.

A Madame le Docteur Lysiane Boulet-Le Gouar, pour m'avoir donné de précieux conseils et pour m'avoir encouragé durant ce travail et lors de la rédaction.

A Monsieur le Professeur Bertrand Toussaint, pour m'avoir accueillie dans votre service durant deux semestres au cours mon internat. Merci pour la confiance accordée.

Aux techniciennes du laboratoire d'Enzymopathies, Morgane, Delphine, Aurélie et Aline, pour m'avoir soutenue durant ce projet. Merci pour votre aide, votre disponibilité et ces agréables moments passés ensemble.

A tous les biologistes que j'ai côtoyé durant mes années d'internat à Grenoble, à Annecy et lors de mes remplacements, pour m'avoir transmis votre savoir, votre expérience et m'avoir fait confiance. C'est à vos côtés que j'ai mûri et que ma passion pour la biologie médicale s'est enrichie.

A Madame le Docteur Annie Molla (et aussi ma belle maman), pour tes conseils, ta disponibilité et ton aide précieuse lors de la relecture de ma thèse.

Plus personnellement, les personnes sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui...

A mon papa, c'est grâce à toi si je suis devenue « une grande ». Tu m'as toujours porté dans les moments difficiles, tu as su me relever lorsque je tombais. Malgré les sacrifices, tu as su me donner tout ce dont j'avais besoin. Je suis fière des valeurs et de l'éducation que tu m'as transmises. Cette réussite est aussi la tienne. J'espère te rendre fier aujourd'hui et demain...

A ma maman, toi qui est présente tous les jours, qui panse mes plaies avec amour. Tu as toujours cru en moi et m'as soutenu dans tous mes projets. C'est grâce à toi si j'en suis arrivée là. Tu m'as donné la force et le courage tout au long de ces longues études. Je te remercie de tout l'amour que tu m'as porté et que tu me porteras. J'espère t'en apporter autant chaque jour...

A mon petit frère, Jonas, toi que j'ai toujours protégé, même un peu trop parfois... Je te remercie tout simplement d'avoir été présent toutes ces années et de m'avoir fait rire lorsque j'en avais besoin. Merci pour tous ces moments passés ensemble et qui me manquent parfois. Ta grande sœur sera toujours là pour toi...

A mon amour, Julien, pour ces 8 belles années passées ensemble. Merci pour la tendresse, l'amour, la confiance et l'immense soutien que tu me portes chaque jour. Tu m'as porté durant toutes ces longues études, tu as séché mes larmes parfois et tu as toujours su trouver les mots pour me faire rebondir.

A notre nouvelle vie que nous construirons main dans la main et à nos projets futurs.

A mes grands-parents,

Denise et Roland, pour votre bonne humeur et votre amour. Merci pour les délicieux beignets que je n'oublierai jamais. Vous êtes mes rayons de soleil, je vous aime tant...

Thérèse et André, à qui je pense très souvent. La vie ne nous a pas laissé le temps de nous connaître mais vous êtes toujours dans mon cœur...

A mes arrières grands-mères,

Alice et Germaine, à tous ces délicieux souvenirs que je garde de vous. J'espère vous rendre fières...

A Marie-Jeanne et Jean-François, pour m'avoir accueillie à Lyon cette année et m'avoir préparé de bons petits plats. Merci pour l'attention que vous me portez.

A mes co-internes, et plus particulièrement Rezaoudou, Zélinou, Sinus, Benjamin, Claire et VTH pour tous ces bons moments passés ensemble au labo et ces fous rires... que de souvenirs... Merci pour votre soutien, votre bonne humeur et votre amitié.

A mon binôme d'audit, Vincent, pour le soutien que tu m'as apporté durant cette année.

A mes montagnes, ma Haute-Savoie et mes animaux, qui m'ont permis de me ressourcer et de me retrouver enfin...

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 4 |
| Table des matières | 7 |
| Liste des Figures | 11 |
| Liste des Tableaux | 12 |
| Liste des annexes | 14 |
| Liste des abréviations | 15 |
| INTRODUCTION | 17 |
| PARTIE 1 : REVUE GÉNÉRALE DE LA LITTÉRATURE SUR LA MALADIE DE SANFILIPPO | 19 |
| Chapitre 1 : Généralités sur le lysosome | 19 |
| Chapitre 2 : Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) | 20 |
| 1 Épidémiologie des MSL | 20 |
| 2 Définition et physiopathologie des Maladies de Surcharge Lysosomale ou MSL | 20 |
| 3 Classification des enzymopathies lysosomales | 21 |
| Chapitre 3 : Les mucopolysaccharidoses (MPS) | 23 |
| Chapitre 4 : La MPS III ou la maladie de Sanfilippo | 25 |
| 1 Épidémiologie de la maladie de Sanfilippo | 25 |
| 2 Physiopathologie de la maladie de Sanfilippo | 26 |
| 3 La clinique de la maladie de Sanfilippo | 31 |
| 3.1 Première phase : asymptomatique | 32 |
| 3.2 Seconde phase : troubles cognitifs, comportementaux et retard mental | 32 |
| 3.3 Troisième phase : Atteintes motrices et neurodégénératives | 33 |
| 3.4 Les signes cliniques généraux | 34 |
| 3.5 Hétérogénéité clinique | 35 |
| 4 Le diagnostic de la maladie de Sanfilippo | 37 |
| 4.1 Les éléments d'orientation et de dépistage | 37 |
| a) Les anomalies cytologiques | 37 |
| b) L'étude des glycosaminoglycanes urinaires | 38 |
| c) Les biomarqueurs | 40 |
| d) Dépistage sur goutte de sang séchée | 41 |
| 4.2 La mesure de l'activité enzymatique leucocytaire : le diagnostic de certitude | 44 |
| 4.3 L'analyse génétique | 45 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.4 | Algorithme diagnostic de la maladie de Sanfilippo type B au laboratoire d'Enzymopathies du CHUGA | 46 |
| 5 | Les traitements de la maladie de Sanfilippo | 47 |
| 5.1 | Les traitements symptomatiques..... | 47 |
| 5.2 | Les traitements spécifiques..... | 47 |
| a) | L'enzymothérapie substitutive..... | 48 |
| b) | La transplantation de cellules souches hématopoïétiques | 49 |
| c) | Les inhibiteurs de substrat | 50 |
| d) | La thérapie génique..... | 50 |
| e) | Les molécules chaperonnes..... | 51 |
| f) | Les essais cliniques et perspectives..... | 51 |
| PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | | 55 |
| Chapitre 1 : Matériel | | 55 |
| 1 | Equipement et petit matériel | 55 |
| 2 | Matériel biologique | 56 |
| 2.1 | Leucocytes | 56 |
| 2.2 | DBS..... | 56 |
| 3 | Réactifs | 56 |
| 3.1 | Réactifs nécessaires pour la préparation des échantillons | 56 |
| 3.2 | Réactifs nécessaires pour la préparation du substrat..... | 56 |
| 3.3 | Réactifs nécessaires pour la réalisation du tampon d'arrêt glycine..... | 57 |
| 3.4 | Réactifs nécessaires à la réalisation du tampon d'arrêt carbonate | 58 |
| 3.5 | Réactifs nécessaires à la préparation de la solution d'albumine sérique bovine (BSA) 0,2 % | 58 |
| 3.6 | Réactifs nécessaires à la réalisation de la gamme de 4-MU | 59 |
| 3.7 | Réactifs nécessaires pour le dosage des protéines totales | 59 |
| Chapitre 2 : Méthodes..... | | 60 |
| 1 | Préparation de l'échantillon | 60 |
| 1.1 | Le culot leucocytaire..... | 60 |
| 1.2 | Le DBS..... | 61 |
| 2 | Préparation des réactifs | 61 |
| 2.1 | Préparation du substrat..... | 61 |
| 2.2 | Préparation du tampon glycine (1 M, pH 10,5)..... | 63 |
| 2.3 | Préparation du tampon carbonate (Na ₂ CO ₃ 0,35 M ; NaHCO ₃ 0,15 M ; pH 10,7)..... | 63 |
| 2.4 | Préparation de la solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 0,2 % (p/v) | 64 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 2.5 | Préparation de la gamme de 4-MU | 64 |
| 3 | Le dosage des protéines totales | 65 |
| 4 | Réalisation des dosages d'activités enzymatiques | 65 |
| 4.1 | Dosage de l'activité enzymatique leucocytaire | 67 |
| 4.2 | Dosage d'activité enzymatique sur DBS | 67 |
| 4.3 | Expression de l'activité enzymatique déterminée sur leucocytes et sur DBS | 68 |
| PARTIE 3 : RESULTATS..... | | 70 |
| Chapitre 1 : Objectifs de l'étude..... | | 70 |
| Chapitre 2 : Mise au point des techniques..... | | 70 |
| 1 | Optimisation de la gamme de 4-MU | 70 |
| 2 | Optimisation de la mesure de l'activité enzymatique leucocytaire de la NAGLU..... | 75 |
| 2.1 | Choix du tampon d'arrêt | 75 |
| 2.2 | Choix du tampon substrat | 78 |
| 2.3 | Choix de la concentration en substrat..... | 80 |
| 2.4 | Choix du temps d'incubation..... | 83 |
| 2.5 | Synthèse : Mode opératoire de la mesure d'activité de la NAGLU leucocytaire | 83 |
| 3 | Mise au point de la technique de dosage de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS . | 86 |
| 3.1 | Choix du tampon d'arrêt | 87 |
| 3.2 | Choix du tampon substrat | 87 |
| 3.3 | Conditions d'élution du DBS..... | 89 |
| 3.4 | Choix de la concentration en substrat..... | 92 |
| 3.5 | Conditions de réalisation du DBS | 94 |
| 3.6 | Synthèse : Mode opératoire de la mesure d'activité de la NAGLU sur goutte de sang séchée | 95 |
| Chapitre 2 : Validation de méthode | | 97 |
| 1 | Validation de méthode du diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur leucocytes..... | 100 |
| 1.1 | Sous processus 1 : Dosage des protéines totales..... | 100 |
| 1.2 | Sous processus 2 : Gamme de 4-MU..... | 100 |
| | a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « gamme 4-MU » | 100 |
| | b) Validation de méthode | 101 |
| 1.3 | Sous processus 3 : Mesure de l'activité de la NAGLU leucocytaire..... | 110 |
| | a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire » | 110 |
| | b) Validation de méthode | 111 |

| | | |
|-----|---|------------|
| 2 | Validation de méthode du diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur DBS..... | 121 |
| 2.1 | Sous processus 1 : Gamme de 4-MU..... | 121 |
| 2.2 | Sous processus 2 : Mesure de l'activité de la NAGLU sur DBS | 122 |
| | a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS »..... | 122 |
| | b) Validation de méthode | 123 |
| | CONCLUSION..... | 136 |
| | Bibliographie..... | 138 |
| | Annexes | 142 |
| | Serment de Galien..... | 169 |

Liste des Figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Incidence des 4 sous types de MPS III dans 7 pays | 25 |
| Figure 2 : La cascade enzymatique du catabolisme de l'Héparane Sulfate | 29 |
| Figure 3 : Présentation clinique et évolution de la maladie de Sanfilippo..... | 31 |
| Figure 4 : Age cognitif de patients atteints par maladie de Sanfilippo en fonction de l'âge | 33 |
| Figure 5 : Régression et survie de patients atteints par différents phénotypes de la maladie de Sanfilippo..... | 36 |
| Figure 6 : Algorithme des pratiques grenobloises pour le diagnostic de la maladie de Sanfilippo B ... | 46 |
| Figure 7 : Stratégies thérapeutiques actuelles et futures des mucopolysaccharidoses | 48 |
| Figure 8 : Principe de mesure de l'activité enzymatique appliqué à la N-acétylGlucosaminidase, enzyme impliquée dans le MPS III B..... | 66 |
| Figure 9 : Graphique présentant la détermination de la limite de linéarité de la gamme 4-MU | 72 |
| Figure 10 : Graphique présentant la nouvelle gamme de calibration de 4-MU | 73 |
| Figure 11 : Graphique montrant la comparaison des 3 gammes de 4-MU..... | 74 |
| Figure 12 : Effet du tampon d'arrêt sur l'activité enzymatique de la NAGLU de 2 échantillons | 76 |
| Figure 13 : Graphique comparant une gamme de 4-MU en tampon glycine et en tampon carbonate | 77 |
| Figure 14 : Effet du pH du tampon citrate-phosphate sur l'activité de la NAGLU en leucocytes | 79 |
| Figure 15 : Effet du pH du tampon acétate sur l'activité de la NAGLU sur leucocytes | 79 |
| Figure 16 : Détermination expérimentale K_m de la NAGLU pour son substrat pour la technique leucocytaire | 81 |
| Figure 17 : Représentation de Lineweaver-Burk de la technique leucocytaire | 82 |
| Figure 18 : Effet du pH du tampon citrate-phosphate sur l'activité de la NAGLU en DBS..... | 88 |
| Figure 19 : Effet du pH du tampon acétate sur l'activité de la NAGLU en DBS..... | 88 |
| Figure 20 : Les résultats d'activité de la NAGLU dans 4 conditions d'éluion différentes | 91 |
| Figure 21 : Détermination expérimentale du K_m de la NAGLU pour son substrat pour la technique en DBS | 92 |
| Figure 22 : Représentation de Lineweaver-Burk pour la technique DBS..... | 93 |
| Figure 23 : Test des différentes conditions pré analytiques du DBS..... | 94 |
| Figure 24 : Composition des processus de mesure d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire et sur DBS | 97 |
| Figure 25 : Etude de l'effet de bord de plaque | 105 |
| Figure 26 : Etude de stabilité de la solution mère de 4-MU | 107 |
| Figure 27 : Etude de la stabilité du tampon glycine | 108 |
| Figure 28 : Test de contamination inter-échantillons de la sonde à ultrasons | 116 |
| Figure 29 : Etude de la stabilité des réactifs de la technique leucocytaire et du culot leucocytaire .. | 118 |
| Figure 30 : Courbe de Gauss de l'activité leucocytaire de la NAGLU et interprétation des résultats. | 120 |
| Figure 31 : Test de contamination inter-échantillons de la pince..... | 127 |
| Figure 32 : Etude de la stabilité des réactifs de la technique DBS et de l'échantillon DBS..... | 129 |
| Figure 33 : Etude de la stabilité de l'échantillon DBS à température ambiante | 130 |
| Figure 34 : Courbe de Gauss de l'activité de la NAGLU sur DBS et interprétation des résultats..... | 132 |
| Figure 35 : Comparaison de méthode DBS (dépistage) et leucocytes (diagnostic) | 134 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Classification des enzymopathies lysosomales diagnostiquées au laboratoire du CHUGA | 22 |
| Tableau 2 : Les 7 types de MPS, les enzymes déficitaires et leurs incidences | 24 |
| Tableau 3 : Fréquence des signes cliniques chez des patients atteints de MPS III | 35 |
| Tableau 4 : Age médian du diagnostic de la MPS III A, B et C | 37 |
| Tableau 5 : Nature et quantification des GAG accumulés selon le type de MPS..... | 40 |
| Tableau 6 : Comparaison technique sur culot leucocytaire et sur DBS..... | 43 |
| Tableau 7 : Etudes cliniques en cours ou terminées sur le traitement de la maladie de Sanfilippo | 52 |
| Tableau 8 : Liste du petit matériel..... | 55 |
| Tableau 9 : Réactifs nécessaires pour la préparation du culot leucocytaire et du DBS | 56 |
| Tableau 10 : Substrat utilisé pour la réaction enzymatique..... | 57 |
| Tableau 11 : Réactifs nécessaires pour la préparation du tampon citrate-phosphate et acétate de sodium | 57 |
| Tableau 12 : Réactifs nécessaire pour la réalisation du tampon d'arrêt glycine (1 M, pH 10,5) | 57 |
| Tableau 13 : Réactifs nécessaires à la réalisation du tampon d'arrêt carbonate (Na_2HCO_3 0,35 M ; NaHCO_3 0,15 M ; pH 10,7) | 58 |
| Tableau 14 : Réactifs nécessaires à la préparation de la BSA | 58 |
| Tableau 15 : Réactifs nécessaires à la réalisation de la gamme 4-MU..... | 59 |
| Tableau 16 : Réactifs nécessaires au dosage des protéines totales..... | 59 |
| Tableau 17 : Préparation du tampon citrate-phosphate | 62 |
| Tableau 18 : Préparation du tampon acétate de sodium | 62 |
| Tableau 19 : Préparation du tampon glycine (1 M, pH 10,5) | 63 |
| Tableau 20 : Préparation du tampon carbonate (Na_2CO_3 0,35 M ; NaHCO_3 0,15 M ; pH 10,7) | 63 |
| Tableau 21 : Préparation de la solution de BSA à 0,2 %..... | 64 |
| Tableau 22 : Préparation de la solution mère de 4-MU à 1 mM..... | 64 |
| Tableau 23 : Composition du dosage enzymatique leucocytaire..... | 67 |
| Tableau 24 : Composition du dosage enzymatique sur DBS..... | 68 |
| Tableau 25 : Expression de l'activité enzymatique par technique leucocytaire et DBS..... | 69 |
| Tableau 26 : Gammes de 4-MU en vigueur au laboratoire..... | 70 |
| Tableau 27 : Nouvelle gamme de 4-MU..... | 72 |
| Tableau 28 : Réactifs nécessaires pour le protocole Moscerdam..... | 75 |
| Tableau 29 : Déroulement du protocole Moscerdam..... | 75 |
| Tableau 30 : Dosage de la NAGLU leucocytaire d'un échantillon à deux temps d'incubation différents | 83 |
| Tableau 31 : Mode opératoire du dosage optimisé de la NAGLU leucocytaire | 84 |
| Tableau 32 : Tableau récapitulatif des contrôles pour le dosage de l'activité NAGLU sur culot leucocytaire | 85 |
| Tableau 33 : Réactifs nécessaires pour le protocole de dosage de la NAGLU sur DBS proposé par Civallero et al..... | 86 |
| Tableau 34 : Déroulement du protocole de dosage de la NAGLU sur DBS de Civallero et al | 87 |
| Tableau 35 : Test de différentes conditions d'élution du DBS avant l'ajout du substrat..... | 90 |
| Tableau 36 : Mode opératoire du dosage optimisé de la NAGLU sur goutte de sang séchée..... | 95 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 37 : Tableau récapitulatif des contrôles de la réaction sur goutte de sang séchée | 96 |
| Tableau 38 : Résumé des performances à évaluer lors d'une validation de méthode de portée B quantitative (selon le SH GTA 04 Rev 01)..... | 98 |
| Tableau 39 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « gamme de 4-MU »..... | 100 |
| Tableau 40 : Répétabilité de l'ancienne et de la nouvelle gamme de 4-MU | 101 |
| Tableau 41 : Reproductibilité de l'ancienne et de la nouvelle gamme de 4-MU..... | 102 |
| Tableau 42 : Variabilité inter-opérateur de la gamme 4-MU..... | 104 |
| Tableau 43 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire » | 110 |
| Tableau 44 : Répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire | 111 |
| Tableau 45 : Reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire | 112 |
| Tableau 46 : Variabilité inter-opérateur de la mesure d'activité enzymatique NAGLU sur leucocytes | 114 |
| Tableau 47 : Intervalle de référence de la technique leucocytaire..... | 119 |
| Tableau 48 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS »..... | 122 |
| Tableau 49 : Répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS..... | 123 |
| Tableau 50 : Reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU DBS | 124 |
| Tableau 51 : Intervalle de référence pour l'activité NAGLU dosée par la technique DBS | 131 |

Liste des annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1 : SH FORM 43 – Diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur culot leucocytaire..... | 142 |
| Annexe 2 : SH FORM 43 – Dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS..... | 159 |

Liste des abréviations

COFRAC : Comité Français d'Acréditation

MSL : Maladie de surcharge lysosomale

MPS : Mucopolysaccharidose

GM : Gangliosidose

GAG : Glycosaminoglycanes

HS : Héparane sulfate

MEC : Matrice extracellulaire

KS : Keratane sulfate

DS : Dermatane sulfate

CS : Chondroïtine sulfate

TDAH : Troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité

CPC : Chlorure de cétypyridinium

DMB : Diméthylméthylène

DPP IV : Dipeptidylpeptidase IV

Apo CI : Apolipoprotéine CI

HCII-T : Complexe héparine cofacteur II/Thrombine

MIP 1 α : *Macrophage inflammatory Protein 1*

TIMP-1 : *Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1*

DBS : *Dried Blood Spot*

CETMPS : Comité d'Evaluation Thérapeutique des Mucopolysaccharidoses

AAV9 : *Adeno-associated virus 9*

BHE : Barrière hématoencéphatique

IGF-2 : *Insulin-like Growth Factor 2*

NAGLU : N-acétylglucosaminidase

EFS : Etablissement Français du Sang

BSA : Albumine sérique bovine

4-MU : 4-méthylumbelliférone

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

K_m : Constante de Michaelis-Menten

Vmax : Vitesse maximale

Eau PPI : eau pour préparation injectable

BR : Blanc réactif

BE : Blanc échantillon

CV : Coefficient de Variation

ET : Ecart type

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

NA : Non Applicable

INTRODUCTION

Le lysosome est un organite intracellulaire considéré comme l'usine de retraitement des déchets de la cellule. Il permet d'éliminer ou de recycler certains composés et ainsi, participe au renouvellement cellulaire constant. Les maladies lysosomales sont des pathologies héréditaires causées par une altération de ce métabolisme. Cette famille comprend plus de 70 maladies monogéniques (1). Elles apparaissent comme rares lorsqu'elles sont considérées individuellement, mais elles touchent, toutes maladies confondues, un nouveau-né sur 5 000 dans le monde (1).

Ce travail est ciblé sur la maladie de Sanfilippo, une des maladies lysosomales, également appelée mucopolysaccharidose de type III ou MPS III. Il existe 4 sous types nommés A, B, C et D très proches cliniquement et correspondant chacun à l'atteinte d'une enzyme lysosomale différente. Chacun de ses déficits enzymatiques conduit à l'accumulation au sein des lysosomes, d'un déchet cellulaire appelé l'héparane sulfate. Les enfants atteints de cette pathologie peuvent présenter à partir de l'âge de 3 ans des troubles cognitifs et comportementaux caractérisés par la perte des acquis, des troubles du langage, une hyperactivité ou encore des troubles du sommeil. Par la suite, le tableau clinique s'aggrave avec un déclin des fonctions intellectuelles et des atteintes neurodégénératives pouvant se solder dans les cas sévères par un décès. Aujourd'hui apparaissent de nouveaux traitements de la MPS III, cependant ceux-ci ne sauraient trouver leur pleine efficacité sans l'amélioration des outils diagnostics permettant d'instaurer un traitement avant l'apparition de troubles neurologiques irréversibles. L'errance diagnostic reste importante dans cette pathologie, des études néerlandaises ont montré que le délai diagnostic entre les premiers signes cliniques et le diagnostic correct varie entre 1,5 et 9 ans selon les sous types (2). Le diagnostic de certitude repose sur la mesure de l'activité enzymatique leucocytaire.

Le but de ce travail est d'optimiser la technique de diagnostic de la MPS III de type B sur les leucocytes pour le diagnostic de certitude et de développer une technique de

dépistage sur goutte de sang séchée ou DBS (*Dried Blood Spot* ou Guthrie ou buvard) permettant un *screening* plus facile des patients ayant une clinique évocatrice. En vue de l'accréditation de ces examens, ces méthodes ont été validées selon les recommandations COFRAC relatives à la norme NF EN ISO 15189 des examens de biologie médicale (3).

Après quelques rappels bibliographiques sur le lysosome, son métabolisme et sur la maladie de Sanfilippo, le matériel et les méthodes utilisés pour la mise en place des techniques sera abordé. Puis les résultats, les modes opératoires ainsi que la validation des méthodes selon les recommandations COFRAC relatives à la norme NF EN ISO 15189 des examens de biologie médicale seront présentés. Enfin, les conclusions et perspectives seront exposés.

PARTIE 1 : REVUE GÉNÉRALE DE LA LITTÉRATURE SUR LA MALADIE DE SANFILIPPO

Chapitre 1 : Généralités sur le lysosome

Le lysosome est un organite intra-cytoplasmique qui mesure en général moins d'un micromètre (4). Il est présent dans toutes les cellules de mammifères excepté les hématies et est surtout retrouvé en grand nombre dans les cellules de défenses (leucocytes, macrophages...) ou les cellules à fort renouvellement cellulaire. Cet organite dérive des saccules de l'appareil de Golgi et est délimité par une membrane lipidique (4).

L'existence et le fonctionnement du lysosome ont été décrits, pour la première fois, dans les cellules hépatiques en 1955 par Christian De Duve, Albert Claude et Georges Palade. Cette découverte leur a valu le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1974 (5). Ils ont observé que l'activité de certaines enzymes augmentaient après l'action de détergents ou un fractionnement cellulaire (6,7). Ils ont donc interprété ces résultats par l'existence d'un compartiment cellulaire délimité par une membrane contenant des enzymes capables d'exercer une action lytique d'où le nom donné de lysosome. Ces enzymes sont des hydrolases acides (phosphatases, glycosidases, lipases, sulfatases, nucléases et protéases). Elles se situent dans la lumière du lysosome et leur activité est optimale en milieu acide. Le pH intra-luminal du lysosome est aux alentours de 5, il est constamment maintenu grâce à des pompes à protons enchâssées dans la membrane du lysosome. La membrane est protégée de l'action de ces hydrolases grâce à des protéines enchâssées fortement glycosylées (4).

Le lysosome est considéré comme l'usine de retraitement des déchets, il est le point central d'un système vacuolaire nommé le système endosome/lysosome. C'est un réseau composé d'endosomes (des vésicules formées à partir de la membrane plasmique) qui

permettent le transport de macromolécules vers le lysosome, lieu de la dégradation (8). Les macromolécules dégradées par le lysosome peuvent être extracellulaires (bactéries, virus) après endocytose ou phagocytose, soit intracellulaires (acides gras, protéines, organites sénescents...). Les produits obtenus après l'action des hydrolases acides lysosomales sont soit excrétés de la cellule soit recyclés sous forme de nutriments cellulaires (sucres, acides gras...).

Chapitre 2 : Les maladies de surcharge lysosomale (MSL)

Le lysosome tient un rôle central et essentiel au sein d'un processus fin permettant à la cellule un renouvellement permanent. Un dysfonctionnement dans cet équilibre peut engendrer de multiples pathologies ayant des expressions cliniques hétérogènes. Actuellement il a été identifié plus de 70 maladies lysosomales (1).

1 Épidémiologie des MSL

Les maladies lysosomales sont des pathologies rares individuellement, mais toutes confondues, elles touchent 1 nouveau-né sur 5 000 (1). La distribution de ces pathologies peut varier en fonction des régions géographiques et des ethnies. La prévalence est également majorée par la consanguinité.

2 Définition et physiopathologie des Maladies de Surcharge Lysosomale ou MSL

Les MSL sont des pathologies métaboliques rares qui touchent les voies de dégradation lysosomale. Elles se caractérisent par un déficit partiel ou complet d'une ou de plusieurs protéines lysosomales (enzyme, transporteur ou activateur enzymatique). Cela a pour

conséquence l'accumulation, au sein du lysosome, de macromolécules non dégradées sous forme de corps résiduels, entraînant l'augmentation de la taille et du nombre de lysosomes, puis un dysfonctionnement cellulaire progressif voire une destruction cellulaire.

L'origine des MSL est génétique. Une altération génique peut conduire soit à la perte de la synthèse de la protéine, soit à la synthèse d'une protéine anormale donc moins ou non fonctionnelle. La transmission est majoritairement autosomique récessive. Pour qu'un enfant soit atteint, il faut que ses deux parents soient hétérozygotes (un allèle sain et un allèle porteur de la maladie) et qu'ils transmettent chacun leur allèle pathologique à leur descendance. Il existe néanmoins quelques MSL liées au chromosome X comme la maladie de Fabry, la maladie de Hunter (ou mucopolysaccharidose II) et la maladie de Danon.

Les MSL sont hétérogènes dans leur expression clinique, leur sévérité, leur évolution, leur diagnostic ainsi que dans leur prise en charge. Elles présentent néanmoins toutes une clinique progressive de par l'accumulation de substrats toxiques au cours de la vie.

3 Classification des enzymopathies lysosomales

Il existe différentes classifications des MSL, elles peuvent être soit fondées sur la nature du substrat accumulé soit sur la fonction de la protéine déficitaire (enzyme, transporteurs...) (4).

Le Tableau 1 présente une classification des enzymopathies lysosomales diagnostiquées au laboratoire. Le laboratoire est spécialisé essentiellement dans la mise en évidence de déficits enzymatiques partiels ou totaux touchant les familles des lipidoses, des mucopolysaccharidoses (MPS), des gangliosidoses (GM) et des oligosaccharidoses.

Chaque pathologie correspond en général à un déficit enzymatique distinct, mais il existe le cas particulier de la MPS III ou maladie de Sanfilippo pour laquelle il y a quatre

déficits enzymatiques différents correspondant chacun à un sous type de la maladie ainsi que le cas de la maladie de Morquio avec deux sous-types A et B selon l'enzyme atteinte.

Tableau 1 : Classification des enzymopathies lysosomales diagnostiquées au laboratoire du CHUGA

| Classification | Maladie | Enzyme déficitaire | |
|--|--|---------------------------------|--|
| Lipidoses ou sphingolipidoses | Maladie de Fabry | alpha-Galactosidase A | |
| | Maladie de Gaucher | bêta-Glucocérébrosidase | |
| | Niemann-Pick A/B | Sphingomyélinase | |
| | Maladie de Krabbe | Galactocérébrosidase | |
| | Leucodystrophie métachromatique | Arylsulfatase A | |
| Mucopolysaccharidoses | MPS I ou maladie de Hurler-Scheie | alpha-L-Iduronidase | |
| | MPS II ou maladie de Hunter | Iduronate 2-Sulfatase | |
| | MPS III ou maladie de Sanfilippo | Type A | Héparane N-Sulfatase |
| | | Type B | alpha-N-acétylGlucosaminidase |
| | | Type C | acétyl-CoA-alpha-Glucosaminide acétyltransférase |
| | | Type D | N-acétylGlucosamine-6-Sulfatase |
| | MPS IV ou maladie de Morquio | Type A | Galactosamine-6-Sulfatase |
| | | Type B | beta-Galactosidase |
| | MPS VI ou maladie de Maroteaux-Lamy | arylsulfatase B | |
| | MPS VII ou maladie de Sly | bêta-Glucuronidase | |
| Gangliosidoses | GM1 ou maladie de Landing | bêta-Galactosidase | |
| | GM2 Var 0 ou maladie de Sandoff | Hexosaminidases A et B | |
| | GM2 Var B, B1, AB ou maladie de Tay-Sachs | Hexosaminidase A | |
| Oligosaccharidoses ou glycoprotéinoses | Fucosidose | Alpha-Fucosidase | |
| | Mannosidose | alpha-Mannosidase | |
| | Maladie de Schindler | alpha-N-acétylGalactosaminidase | |

Chapitre 3 : Les mucopolysaccharidoses (MPS)

Les MPS représentent environ 1/3 des MSL. Elles résultent de déficits totaux ou partiels en l'activité d'enzymes lysosomales impliquées dans le catabolisme de molécules complexes appelées glycosaminoglycanes (GAG). Considérées comme des maladies rares, elles ont une incidence cumulée de 3,3 à 4 naissances en France sur 100 000 (9).

On compte 7 types de MPS pour lesquels il existe 11 déficits enzymatiques différents. Le Tableau 2 présente les différentes MPS, leur incidence en France, les enzymes déficitaires ainsi que les gènes impliqués (9, 10). Chaque MPS est liée à une enzyme, à l'exception des MPS III et IV qui présentent plusieurs sous types associés chacun à une enzyme distincte. Ces déficits enzymatiques sont dus à des altérations géniques. Les MPS sont des pathologies héréditaires qui se transmettent le plus souvent selon un mode autosomique récessif à l'exception de la MPS II qui est lié au chromosome X : les hommes sont atteints et les femmes porteuses de la maladie.

Les altérations géniques sont très nombreuses et polymorphes. De plus, de nouvelles atteintes géniques sont fréquemment découvertes dont la pathogénicité n'est pas démontrée. L'étude génétique n'est pas recommandée dans un but diagnostique, dans certains cas, elle peut aider à prédire la sévérité du phénotype et peut permettre le diagnostic anténatal dans la fratrie à venir (9).

Tableau 2 : Les 7 types de MPS, les enzymes déficitaires et leurs incidences

(d'après (9))

| MPS | Incidence | Sous types | Enzyme déficiente | Nom du gène impliqué |
|--|---|------------|--|----------------------|
| MPS I ou maladie de Hurler-Scheie | 1 : 100 000 naissances | | alpha-Iduronidase | <i>IDUA</i> |
| MPS II ou maladie de Hunter | 1,25 : 100 000 garçons | | Iduronate-2-sulfatase | <i>IDS</i> |
| MPS III ou maladie de Sanfilippo | 0,68 : 100 000 naissances Le sous type A est le plus fréquent | A | Héparane N-Sulfatase | <i>SGSH</i> |
| | | B | alpha-N- acétylGlucosaminidase | <i>NAGLU</i> |
| | | C | acétyl-CoA-alpha- Glucosaminide acétylTransférase | <i>HGSNAT</i> |
| | | D | N-acétylGlucosamine-6- Sulfatase | <i>GNS</i> |
| MPS IV ou maladie de Morquio | Type A (le plus fréquent) : 0,33 : 100 000 naissances | A | N-acétylGalactosamine-6- Sulfatase | <i>GALNS</i> |
| | | B | bêta-D-Galactosidase | <i>GLB1</i> |
| MPS VI ou maladie de Maroteaux-Lamy | 0,17 : 100 000 naissances | | Arylsulfatase B | <i>ARSB</i> |
| MPS VII ou maladie de Sly | Affection très rare, la plupart du temps elle est diagnostiquée avant la naissance | | bêta-Glucuronidase | <i>GUS</i> |
| MPS IX | Exceptionnel, un seul cas décrit | | Hyaluronidase | <i>HYAL1</i> |

Chapitre 4 : La MPS III ou la maladie de Sanfilippo

1 Épidémiologie de la maladie de Sanfilippo

Quatre sous types de MPS III sont connus, nommés A, B, C et D. Chacun se caractérise par un déficit enzymatique singulier. L'incidence globale de la maladie de Sanfilippo en France est de 0,68 pour 100 000 naissances (11).

Du fait du caractère héréditaire, la distribution des différents sous types varie selon la localisation géographique et l'ethnie.

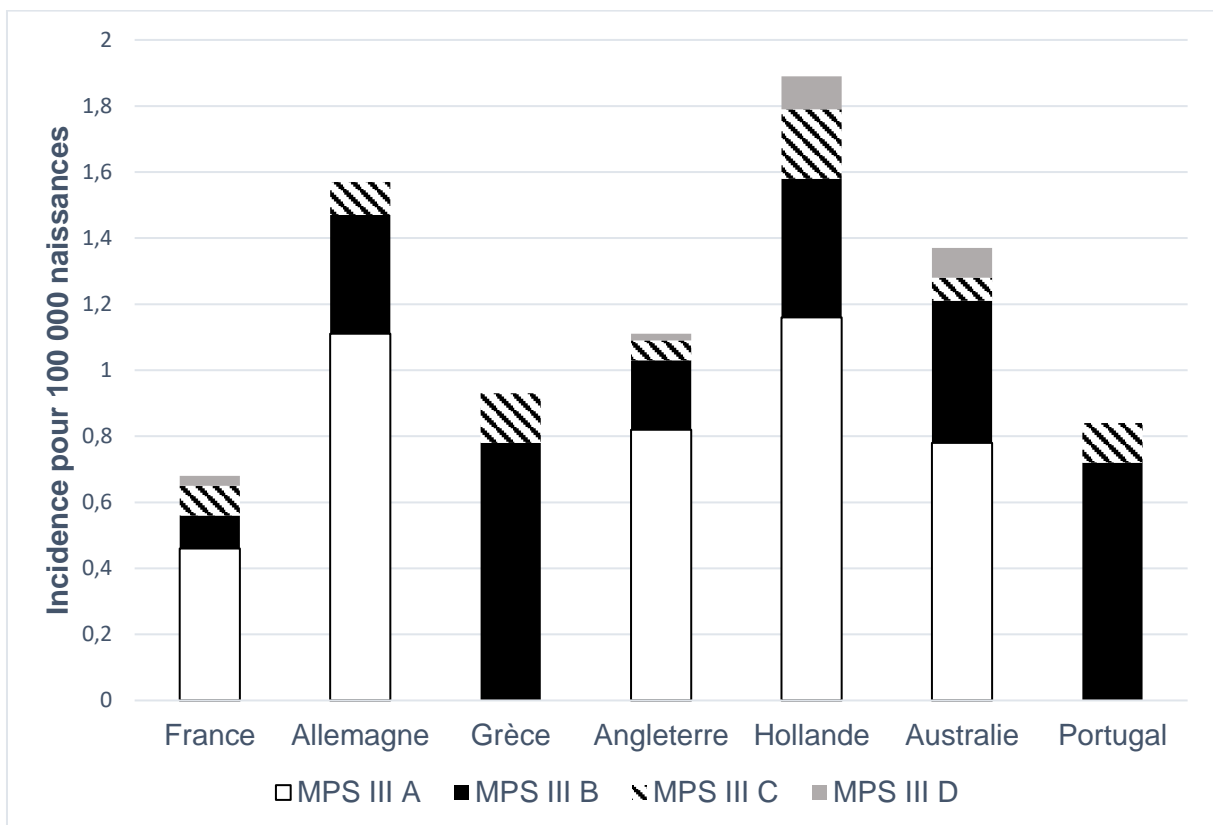


Figure 1 : Incidence des 4 sous types de MPS III dans 7 pays

(d'après (12))

La Figure 1 présente les incidences des 4 sous types de MPS III dans 7 pays. La Hollande, l'Allemagne, l'Australie et l'Angleterre sont les pays où l'incidence globale est la plus élevée.

On remarque que la MPS III A est la plus fréquente en Allemagne, en France et en Angleterre alors que la MPS III B est plus fréquente au Portugal et en Grèce. Les sous types C et D étant plus rares, aucune répartition géographique n'a été observée.

2 Physiopathologie de la maladie de Sanfilippo

La maladie de Sanfilippo a été décrite pour la première fois en 1961 par le pédiatre américain Sylvester Sanfilippo. Le premier cas fut une petite fille présentant une hépatosplénomégalie et ayant une excrétion urinaire importante d'un glycosaminoglycane (GAG) appelé héparane sulfate (HS) (13). Deux ans plus tard, le Dr Sanfilippo décrit 8 autres cas d'enfants avec la même présentation clinico-biologique associée à un retard mental (14). Ce n'est que quelques années plus tard entre 1972 et 1980 qu'a été identifiée la physiopathologie des quatre types de MPS III.

Pour bien appréhender la physiopathologie de la maladie de Sanfilippo, il faut s'intéresser aux composants de la matrice extracellulaire (MEC). C'est une structure complexe qui comble les espaces intercellulaires et qui est le composant principal du tissu conjonctif. Celui-ci assure de nombreuses fonctions au sein des tissus : soutien pour les cellules, interaction intercellulaire, et cohésion des tissus.

La MEC est constituée en grande majorité de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de protéines fibreuses (collagène, élastine, fibronectine). Les protéoglycanes sont composés d'un corps protéique sur lequel vient se greffer des glycosaminoglycanes par une liaison O-glycosidique.

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides non ramifiés constitués d'un enchaînement de disaccharides associés à des groupes sulfates (pour la majorité des GAG). La sous-unité disaccharidique associe généralement une hexosamine N-acétylée (N-

acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et une molécule d'acide hexuronique (acide L-iduronique ou acide D-glucuronique ou de galactose), sulfatée ou non (10).

Différents types de GAG peuvent constituer les protéoglycanes : les kératanes sulfates (KS), les dermatanes sulfates (DS), les chondroïtines sulfates (CS) et les héparanes sulfates (HS). Chacun présente une répartition particulière dans les tissus. Les protéoglycanes à DS constituent un des composants principaux du tissu conjonctif et de la peau. Les protéoglycanes à CS et à KS sont surtout présents dans la cornée, les os et le cartilage. Les protéoglycanes à HS sont des constituants de la membrane cellulaire (9) et présentent une localisation surtout neuronale d'où leur rôle important dans le fonctionnement cérébrale.

La maladie de Sanfilippo résulte d'un déficit en une des 4 enzymes lysosomales impliquées dans le catabolisme de l'HS.

L'HS est constitué par la répétition d'une unité disaccharidique formée d'une N-acétyl-D-Glucosamine et d'un acide glucuronique ou de son isomère en C5. Les protéoglycanes à HS jouent de nombreux rôles au sein de la cellule. Leur principale fonction est de maintenir la structure de la membrane basale de la MEC et d'assurer la migration des cellules. Ils coopèrent également avec les intégrines, ils permettent l'interaction entre cellules et ainsi la mobilité cellulaire. Leur présence dans les vésicules sécrétoires leur confère un rôle dans le conditionnement du contenu granulaire et le maintien des protéases sous leur forme active. L'HS a la capacité de se lier aux cytokines, aux chimiokines et aux facteurs de croissance, les protégeant ainsi de la protéolyse (15).

La première étape du catabolisme du protéoglycane à HS est l'endocytose de celui-ci puis l'action d'une endoglycosidase qui va libérer l'HS de sa structure protéique. Après fusion de l'endosome avec le lysosome, la dégradation de l'HS en monosaccharides a lieu grâce à l'action de plusieurs hydrolases acides. La Figure 2 présente la cascade enzymatique lysosomale permettant le catabolisme de l'HS. Les 8 enzymes présentées sont

des hydrolases acides localisées dans la lumière du lysosome à l'exception de l'acétyl-CoA : acétyltransférase qui est enchâssée dans la membrane lysosomale. Lorsque l'une de ces hydrolases est déficiente, il y a blocage dans la dégradation de l'HS et donc il résulte une accumulation du substrat de l'enzyme. Chacune de ces enzymes est associée à un type de MPS lorsqu'elle est déficiente. La maladie de Sanfilippo présente 4 sous types, chacun associé au déficit d'une hydrolase acide de cette cascade (Tableau 2 et Figure 2).

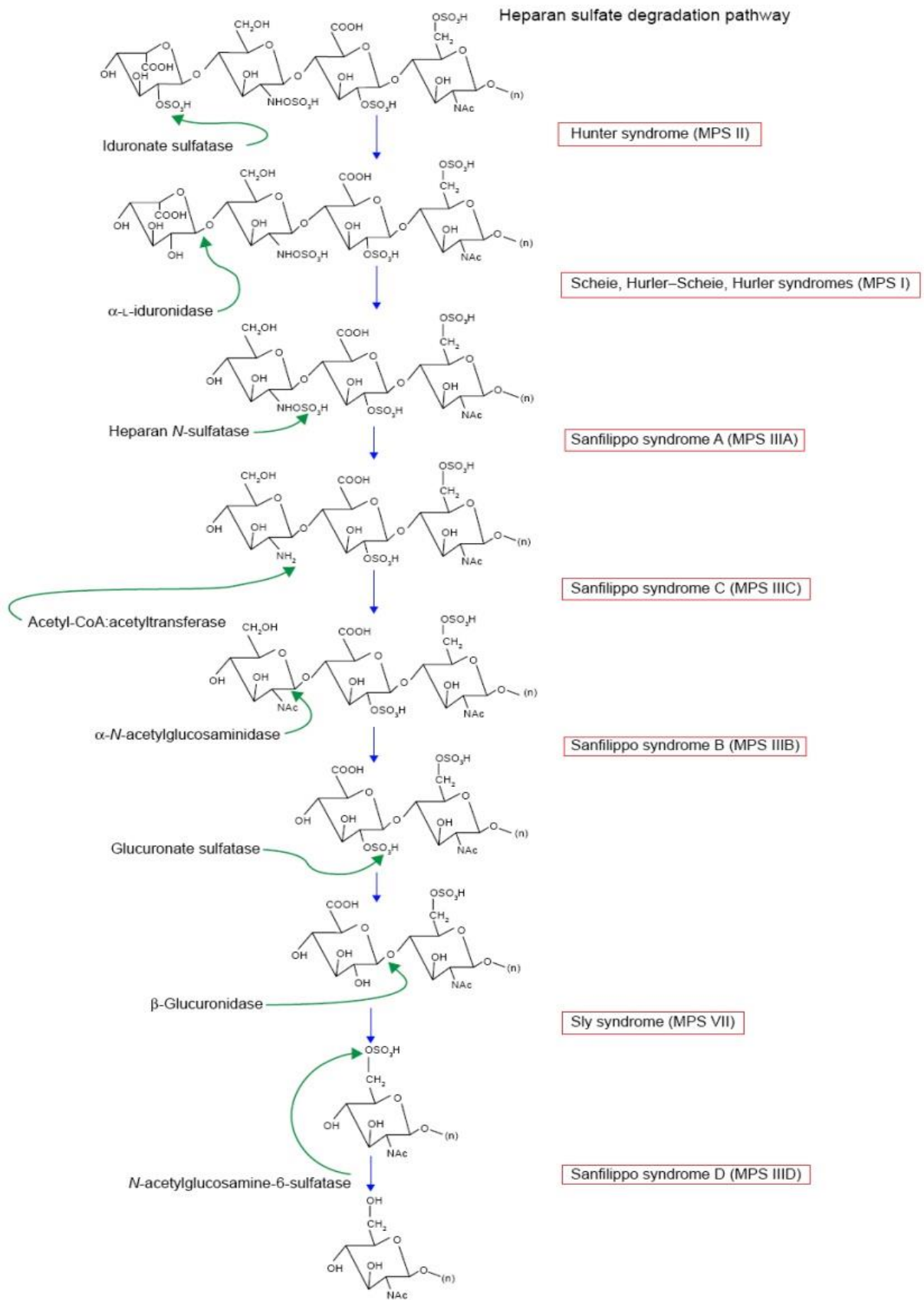
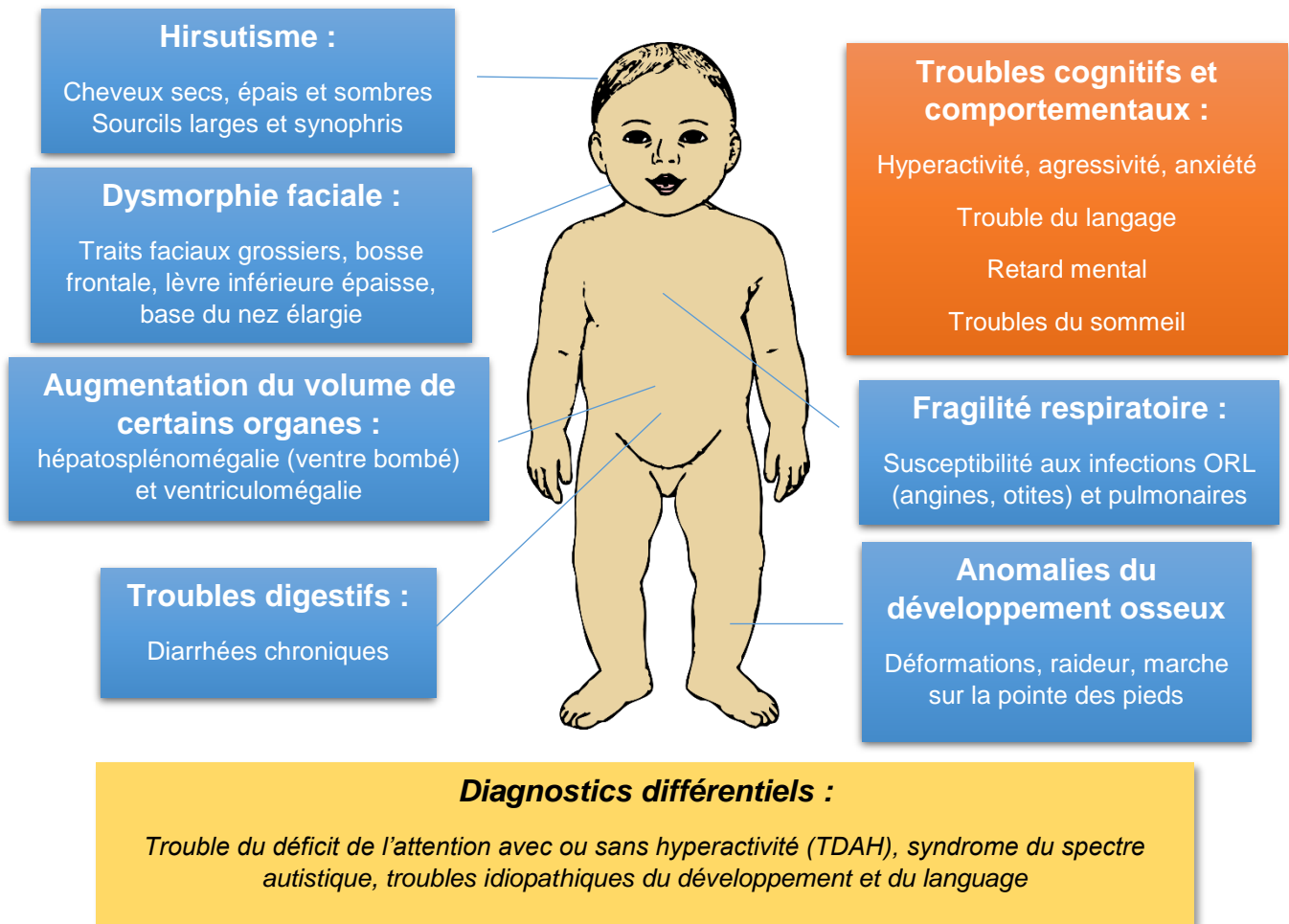


Figure 2 : La cascade enzymatique du catabolisme de l'Héparane Sulfate
(d'après (16))

Les protéoglycanes à HS étant surtout localisés au niveau du système nerveux central, une accumulation d'HS perturbe l'équilibre cellulaire et provoque une dérégulation de la migration cellulaire, de la synthèse de nouvelles synapses et de la structure neuronale (17). La physiopathologie explique les troubles neurologiques et cognitifs importants observés chez les patients souffrant de MPS III.

3 La clinique de la maladie de Sanfilippo

Présentation clinique de la maladie de Sanfilippo



Evolution clinique de la maladie de Sanfilippo

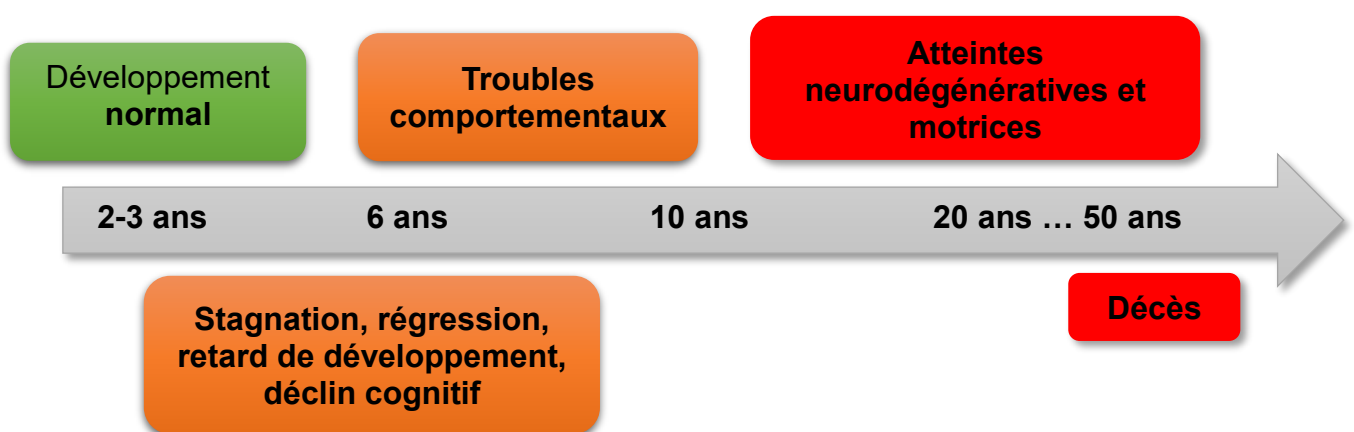


Figure 3 : Présentation clinique et évolution de la maladie de Sanfilippo

Vert : développement normal ; Orange : début des symptômes ; Rouge : aggravation de la maladie ; Bleu : signes cliniques communs au MPS en général ; Jaune : diagnostics différentiels

3.1 Première phase : asymptomatique

Les enfants atteints de la maladie de Sanfilippo connaissent une première phase de développement normal jusqu'à l'âge de 3 ans en moyenne. Chez certains enfants, on peut néanmoins observer un développement cognitif plus lent que la moyenne. Dans les formes sévères de la maladie, cette première phase est inexistante et les nourrissons présentent, dès les premiers mois de vie, les signes cliniques de la seconde phase de la maladie (17).

3.2 Seconde phase : troubles cognitifs, comportementaux et retard mental

Les troubles cognitifs et comportementaux apparaissent vers l'âge de 3-4 ans (18) et représentent un des principaux symptômes de la maladie de Sanfilippo. Les malades présentent un comportement hyperactif, destructeur, et parfois agressif avec de nombreuses crises de colère. L'enfant est considéré comme « provoquant » et « désinhibé ». Parallèlement, une autre facette de la maladie est une anxiété et une grande angoisse avec des accès de panique pouvant mettre en danger l'enfant (17). Dans les formes sévères, cette atteinte peut débuter dès le 1^{er} mois de vie avec des accès de cris et des pleurs inexplicables (9). Durant cette seconde phase, le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies comme des troubles du spectre autistique ou des troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) peut être complexe.

Au cours de cette seconde période, une cassure dans l'apprentissage est observée avec la stagnation des acquisitions notamment de la parole, de la marche et du contrôle sphinctérien. Progressivement, les capacités intellectuelles régressent et un retard mental s'installe. La Figure 4 montre que la majorité des patients de l'étude n'atteignent pas les capacités cognitives d'un enfant de 5 ans. Il y a néanmoins quelques patients dont le développement intellectuel peut être qualifié de normal.

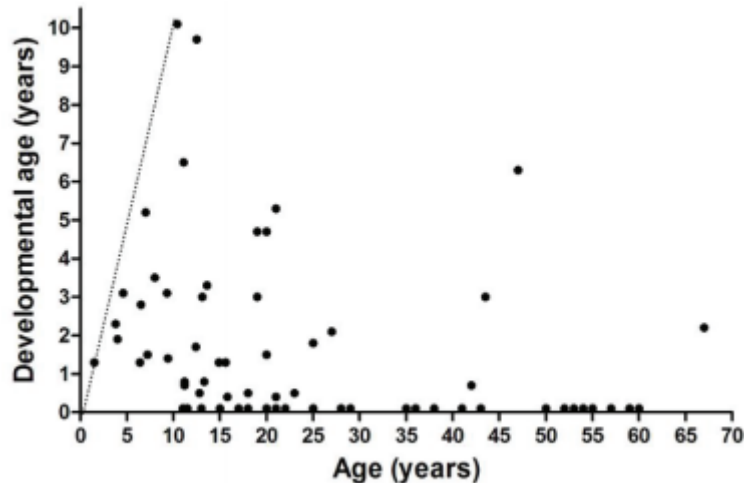


Figure 4 : Age cognitif de patients atteints par maladie de Sanfilippo en fonction de l'âge
(d'après (19))

La ligne droite en pointillé indique le développement cognitif normal en fonction de l'âge.

Les troubles du sommeil sont très fréquents dans la MPS III et sont même une caractéristique importante, avec une incidence de 80 à 90 %. Ils se caractérisent par des difficultés d'endormissement, de nombreux réveils, une agitation nocturne et un levé précoce. Il existe même dans les cas sévères une inversion du cycle nyctéméral (18).

3.3 Troisième phase : Atteintes motrices et neurodégénératives

Le dernier stade de la maladie apparaît en moyenne vers l'âge de 10 ans dans les formes sévères. L'enfant présente une démence sévère, ses capacités motrices déclinent avec une perte totale de la motricité. Le patient perd la marche, la station assise, et une dysphagie apparaît. Il présente progressivement un état grabataire conduisant à une perte totale d'autonomie. Une atteinte extrapyramidale apparaît durant cette phase avec une akinésie, une rigidité plastique et des tremblements (17). L'état végétatif et la tétraplégie spastique conduisent au décès.

Le décès apparaît dans la seconde ou la troisième phase (entre 10 et 20 ans) pour les cas les plus sévères, qui sont souvent des patients atteints de MPS III de type A. Pour

les autres formes plus atténuées, le décès survient plus tardivement. Une étude sur 20 malades atteints de la maladie de Sanfilippo B a montré que l'âge moyen du décès est de 56 ans (20).

3.4 Les signes cliniques généraux

La plupart des patients atteints du syndrome de Sanfilippo présentent une dysmorphie faciale dont le degré est variable. Contrairement à d'autres MPS (notamment la MPS IV), cette dysmorphie est peu marquée dans la MPS III. Elle se caractérise par des traits faciaux grossiers et un hirsutisme parfois très marqué chez les enfants : des cheveux secs, épais et sombres, des sourcils larges avec un évasement médian et un synophris (convergence des sourcils au niveau de la racine du nez). La lèvre inférieure est souvent évasée et épaisse. La lèvre supérieure est retournée avec un phyltrum (fossette entre le nez et la lèvre supérieure) en saillie. La pointe du nez semble épaisse et la base du nez est élargie. Le crâne est allongé et le front est court (18). Une macrocéphalie est observée en général chez les enfants (21). Le degré de dysmorphie faciale est très hétérogène entre les patients, et est corrélé à la sévérité de la pathologie. En effet, les patients atteints de MPS III A, la forme la plus sévère de la maladie de Sanfilippo, présentent une dysmorphie plus marquée et dès l'enfance. Dans les phénotypes atténués, en revanche, la dysmorphie est presque inapparente.

Les enfants souffrant de la maladie de Sanfilippo sont plus fragiles et sensibles aux infections, notamment ORL (otites, angines) et pulmonaires. Une hypertrophie des végétations adénoïdes et des amygdales a été observée chez certains individus (17). Des épisodes de diarrhées chroniques sont parfois décrits également (18). Certains troubles auditifs et visuels ont été observés chez certains patients, mais restent difficiles à explorer du fait du retard mental (18).

Les manifestations viscérales sont moins visibles dans l'enfance et sont surtout présentes dans les stades tardifs de la maladie. Elles peuvent se caractériser par une

ventriculomégalie aortique ou mitrale, mais qui ne conduit que tardivement à un dysfonctionnement cardiaque (22). Une hépatosplénomégalie ainsi qu'une amyotrophie des extrémités des membres peuvent apparaître dans les formes tardives.

Les atteintes squelettiques ne sont pas caractéristiques de la maladie de Sanfilippo, mais elles peuvent être présentes. Une anomalie du développement de l'os peut être assez discrète et se manifester que par un simple fessum de l'articulation du coude ou des genoux. Des raideurs articulaires peuvent apparaître dans les phases tardives. Ces atteintes conduisent le patient à marcher sur la pointe des pieds.

Au total, la fréquence de ces signes cliniques a été étudiée chez 55 patients atteints de MPS III (23) :

*Tableau 3 : Fréquence des signes cliniques chez des patients atteints de MPS III
(d'après (23))*

| Signes cliniques | Fréquence |
|-----------------------------------|------------------|
| Retard de parole | 85 % |
| Traits grossiers du visage | 78 % |
| Hyperactivité | 65 % |
| Diarrhée récurrente | 50 % |
| Otites à répétition | 46 % |

3.5 Hétérogénéité clinique

Il existe une grande hétérogénéité phénotypique dans cette pathologie. Certains individus sont atteints d'une forme sévère alors que d'autres présentent une clinique atténuée. La Figure 5 montre la différence de l'évolution clinique (perte de la parole et de la marche) et de la survie chez des patients atteints par un phénotype sévère et atténué de la MPS III B.

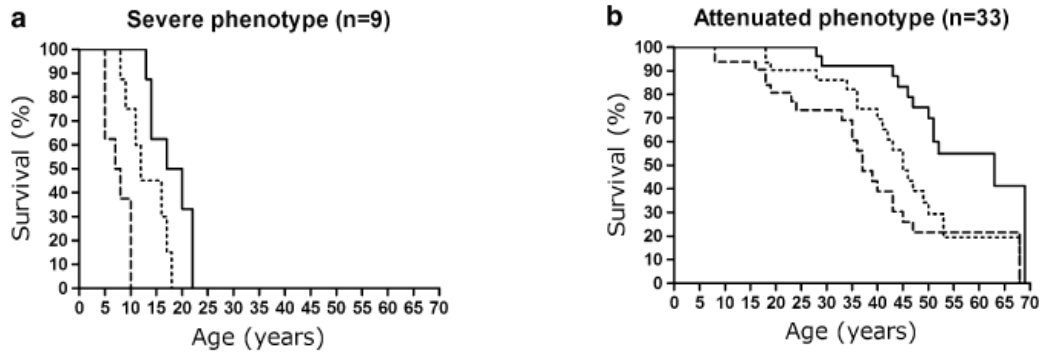


Figure 5 : Régression et survie de patients atteints par différents phénotypes de la maladie de Sanfilippo

(d'après (24))

- Survie
- Perte de la marche
- Perte de la parole

Ces deux graphiques montrent la différence dans l'évolution de la maladie en fonction du phénotype. Les phénotypes sévères présentent un tableau clinique plus sévère et l'aggravation est plus rapide. Certains patients atteints d'une forme atténuée peuvent arriver sans handicap jusqu'à l'âge adulte.

Cette hétérogénéité clinique conduit à une forte errance diagnostic pouvant aller jusqu'à plusieurs années. Une étude espagnole a déterminé l'âge médian du diagnostic de la MPS III A, B et C (le sous type D étant très rare) (Tableau 4). Dans les formes atténuées, le diagnostic est fait plus tardivement que dans les formes sévères et peut être prononcé après l'âge de 20 ans.

Tableau 4 : Age médian du diagnostic de la MPS III A, B et C

(d'après (23))

| | Age médian du diagnostic |
|------------------|--------------------------|
| MPS III A | 4,4 ans (1,2 à 16 ans) |
| MPS III B | 3,1 ans (1 à 29 ans) |
| MPS III C | 6,3 ans (3,4 à 22 ans) |

Aujourd'hui apparaissent de nouveaux traitements de la MPS III, cependant ceux-ci ne trouvent leur pleine efficacité que lorsqu'ils sont instaurés avant l'apparition des troubles neurologiques irréversibles. L'amélioration des outils diagnostics et la sensibilisation des professionnels de santé sont essentielles pour diminuer cette errance diagnostic et ainsi permettre une efficacité thérapeutique.

4 Le diagnostic de la maladie de Sanfilippo

Les MSL dont la maladie de Sanfilippo présentent un diagnostic complexe. Il est important de combiner les signes cliniques, avec les éléments d'orientation et les biomarqueurs afin d'axer la recherche vers des méthodes diagnostiques spécifiques.

4.1 Les éléments d'orientation et de dépistage

Certains éléments peuvent orienter le diagnostic. Ils ne sont pas spécifiques, mais lorsqu'ils sont interprétés en regard des signes cliniques, ils peuvent pousser à faire des investigations approfondies.

a) Les anomalies cytologiques

Des anomalies cytologiques en rapport avec la maladie de surcharge peuvent parfois être visibles sur un frottis sanguin ou médullaire. Dans la maladie de Sanfilippo, il est

possible de retrouver des lymphocytes présentant des granulations anormales, de grande taille et regroupées à un pôle de la cellule. Ces anomalies sont toutefois très rares et ne sont ni spécifiques ni constantes.

b) L'étude des glycosaminoglycanes urinaires

Les MPS sont définies par un blocage dans la voie de dégradation des GAG. Ils sont excrétés en excès dans les liquides biologiques comme l'urine, le sang ou le liquide céphalo-rachidien (10). Une analyse quantitative des GAG urinaires permet d'orienter vers une MPS, mais ne permet pas de définir son sous-type. Une analyse qualitative permettra ensuite de définir le type de MPS en fonction de la nature du GAG accumulé.

- *Le dosage quantitatif des GAG urinaires :*

Il existe deux méthodes pour le dosage quantitatif des GAG urinaires. La technique la plus anciennement utilisée est une méthode colorimétrique à l'harmine après précipitation des GAG au chlorure de cetylpyridinium (CPC). L'acide hexuronique des GAG réagit avec le CPC et forme un précipité. A un pH de 4,8, les GAG se complexent à l'harmine et une coloration rouge apparaît. Une mesure spectrophotométrique est réalisée à 680 nm et l'absorbance est proportionnelle à la concentration en GAG. Le KS n'est pas composé d'acide hexuronique et une augmentation de ce GAG n'est donc pas visible grâce à cette technique. La MPS IV, qui n'accumule que du KS, ne peut être détectée grâce à cette technique.

Une autre méthode pour le dosage quantitatif des GAG est une technique sans précipitation préalable, c'est la méthode au bleu de diméthylméthylène (DMB). Le complexe formé DMB-GAG absorbe à 535 nm. Cette technique est automatisable et elle présente une bonne sensibilité et spécificité (> 90 %) (25). Cette technique permet de détecter l'accumulation de KS et est donc utile pour le dépistage des sujets atteints de la maladie de Morquio (MPS IV).

Pour ces deux techniques, les résultats sont rapportés à la créatinine urinaire, afin de prendre en compte la concentration des urines et les valeurs de référence varient en fonction de l'âge du patient (l'excrétion urinaire des GAG diminuant avec l'âge).

Ces techniques nécessitent un volume important d'urine (environ 30 mL), la quantification des GAG urinaires peut également être réalisée sur goutte d'urine séchée.

Dans certaines formes cliniques modérées de l'adulte et de l'enfant, les taux de GAG urinaires peuvent être peu augmentés ou normaux (9). Le dosage des GAG urinaires n'est donc qu'un élément d'orientation vers une MPS et un dosage négatif n'exclut pas le diagnostic.

- *Le dosage qualitatif des GAG urinaires*

A la différence de l'étude quantitative des GAG urinaires, l'étude qualitative permet de distinguer les différents types de MPS. En effet, suivant le point de blocage dans la voie de dégradation des GAG, la nature des GAG accumulés est différente. La technique utilise une électrophorèse sur acétate de cellulose permettant la séparation des différents GAG. Le résultat est ensuite révélé par l'addition d'un colorant, le DMB.

Le Tableau 5 présente le profil de GAG accumulés en fonction du type de MPS. Les malades souffrant de la maladie de Sanfilippo n'excrètent que de l'HS en quantité anormalement élevée.

Tableau 5 : Nature et quantification des GAG accumulés selon le type de MPS

(d'après (10))

| Type de MPS | GAG accumulé | Excrétion |
|-------------|--------------|---------------------------------|
| I | DS + HS | Très augmentée |
| II | DS + HS | Très augmentée |
| III | HS | Très augmentée ou peu augmentée |
| IV | KS + CS | Souvent normal |
| VI | DS | Très augmentée ou peu augmentée |
| VII | CS + DS + HS | Très augmentée |

Les GAG sont des éléments d'orientation précieux lorsque les tests sont positifs. Ils permettent d'approfondir les recherches de façon plus ciblée et spécifique. Il faut néanmoins savoir qu'un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic de MPS, des cas de faux négatifs, mais également de faux positifs, ont été décrits (26). Il est donc important d'associer l'exploration qualitative et quantitative des GAG urinaires à la mesure de l'activité enzymatique qui permettra de poser le diagnostic (2).

c) Les biomarqueurs

Un biomarqueur est une entité biologique mesurable qui accompagne un processus pathologique. Il ne permet pas le diagnostic, mais il oriente les recherches.

Le biomarqueur utilisé à l'heure actuelle en routine pour les MPS est la dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). C'est une glycoprotéine de surface également appelée CD26 (27). Elle catalyse le clivage de l'Apolipoprotéine CI (ApoCI) en Apolipoprotéine CI' (tronquée en N-terminale). Il a été observé que le rapport ApoCI/ApoCI' est diminué chez les patients atteints de MPS en comparaison avec des individus sains. En parallèle, l'étude de l'activité de la DPP IV, a montré son augmentation chez ces malades. Cette élévation a été décrite dans toutes les MPS avec une médiane 3 fois plus élevée que chez le groupe témoin

(28). La même étude a été menée sur d'autres maladies de surcharge lysosomales (Pompe, Gaucher, Fabry) mais l'élévation d'activité de la DPP IV n'a pas été démontrée pour ces pathologies.

L'augmentation d'activité de la DPP IV est spécifique de tous les types de MPS excepté la MPS VII. Ce biomarqueur permet donc d'orienter les recherches vers une MPS. Il serait également un bon outil pour le suivi thérapeutique. Une étude a montré une diminution des DPP IV après traitement par enzymothérapie substitutive (28).

Ce dosage enzymatique a été développé au laboratoire des enzymopathies du CHUGA, il est réalisé devant toute suspicion de MPS en comparaison des GAG urinaires.

D'autres biomarqueurs ont été décrits, mais ils sont peu probants et ne sont pas utilisés en routine. Parmi ceux-ci, on peut citer le complexe Héparine cofacteur II/Thrombine (HCII-T) (29), l'hexosamine-N-sulfate-acide hexuronique (30), la *Macrophage Inflammatory Protein 1-alpha* (MIP 1 α) (31) ou certains inhibiteurs de métalloprotéases comme le *Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1* (TIMP-1) (10).

d) Dépistage sur goutte de sang séchée


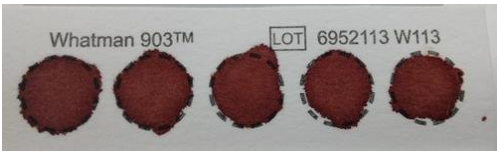
L'analyse sur goutte de sang séchée ou « *dried blood spot* » (DBS) est une technique en plein essor dans de nombreux secteurs d'activité de la biologie médicale notamment dans le domaine des maladies métaboliques. C'est le Dr Guthrie qui utilisa cette technique pour la première fois dans les années 1960 pour dépister la phénylcétonurie chez les nouveaux nés.

Le dépistage de la MPS III est actuellement réalisé sur un culot leucocytaire préalablement purifié. L'un des buts de ce travail est de mettre en place la mesure de l'activité enzymatique sur goutte de sang séchée ou DBS. De manière générale, les techniques sur DBS en enzymologie ne permettent en aucun cas de poser le diagnostic de certitude, ce sont des techniques uniquement de dépistage ou *screening*. La technique de référence pour le diagnostic est la mesure de l'activité enzymatique sur culot leucocytaire.

Le DBS présente de nombreux avantages, ils concernent aussi bien les patients que les cliniciens et les laboratoires. Le prélèvement consiste à déposer une goutte de sang à partir du doigt ou du talon pour les nourrissons sur un papier buvard. Il est donc non invasif à la différence d'un prélèvement veineux qui peut s'avérer difficile chez les enfants. Le faible volume de sang prélevé est un autre avantage surtout pour les jeunes enfants : 40 μ L par spot pour la mesure d'une activité enzymatique alors que pour réaliser un culot leucocytaire, il faut 5 mL de sang prélevé sur EDTA. Le prélèvement sur Guthrie peut être réalisé au cabinet médical grâce à une lancette lors de la consultation.

La gestion de ce type d'échantillon est très simple pour les laboratoires autant sur le plan préanalytique qu'analytique. Sa bonne conservation permet de réaliser des bibliothèques et de rajouter des analyses sans reprélever le patient.

Tableau 6 : Comparaison technique sur culot leucocytaire et sur DBS

| | Leucocytes | Goutte de sang séchée |
|---------------------------------------|---|---|
| Echantillon |  <p>Prélèvement invasif parfois difficile chez le jeune enfant</p> |  <p>Facilité de prélèvement</p> |
| Volume de sang | <p>Tube EDTA</p> <p>5 mL de sang</p> | <p>Carton DBS de 5 spots</p> <p>40 µL de sang par spot</p> |
| Pré analytique | <p>Préparation d'un culot leucocytaire (temps technique ++)</p> | <p>Préanalytique simple (Dépôt des spots + séchage)</p> |
| Interprétation du résultat | <p>Diagnostic de certitude</p> <p>Si positif : doit être confirmé sur un 2^{ème} prélèvement</p> | <p>Dépistage</p> <p>Si positif : doit être confirmé sur leucocytes</p> |
| Nombre de test par échantillon | <p>Un tube = 3 à 4 enzymes</p> | <p>Un spot = un test</p> <p>Perspective du multiplexage :</p> <p>Un spot = plusieurs tests</p> <p>Possibilité d'automatisation</p> |

La technique sur DBS permet de réaliser plusieurs dosages enzymatiques à partir d'un papier buvard (un test par spot). Dans les cas cliniques complexes, il est envisageable de faire un dépistage de plusieurs pathologies à partir d'un seul papier buvard (32). L'avenir du DBS est dans le multiplexage (33) qui consisterait à mesurer l'activité de plusieurs enzymes simultanément à partir d'un punch de sang. A l'heure actuelle, ce n'est qu'à l'état de projet.

Aujourd'hui apparaissent de nouveaux traitements dans le domaine des maladies lysosomales, cependant, ceux-ci ne sauraient trouver leur pleine efficacité sans l'amélioration des outils diagnostics. Le dépistage courant par DBS lors d'un tableau clinique évocateur est un outil qui permet de réduire l'errance diagnostic. Sa facilité de réalisation et la possibilité de réaliser l'analyse directe de plusieurs activités enzymatique sur un même carton sont des avantages certains de cette technique. Cela permet d'envisager la perspective de batteries de tests en fonction de la symptomatologie du patient.

4.2 La mesure de l'activité enzymatique leucocytaire : le diagnostic de certitude

La méthode de référence pour poser un diagnostic de MPS est la mesure de l'activité enzymatique leucocytaire. De façon plus exceptionnelle, le diagnostic peut également être posé par mesure de l'activité enzymatique dans les fibroblastes, les amniocytes en culture ou les villosités chorales (9).

Deux techniques peuvent être utilisées pour mesurer l'activité enzymatique. La fluorimétrie utilise la capacité de l'enzyme à cliver un substrat synthétique libérant de la fluorescence. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse utilise la capacité de l'enzyme à cliver un substrat synthétique marqué dont le spectre des molécules filles sera révélateur de l'activité enzymatique (34). Ces techniques peuvent également être utilisées pour le dépistage sur goutte de sang séchée.

Lorsque l'activité enzymatique leucocytaire est abaissée sur un premier prélèvement, un contrôle sur un 2^{ème} prélèvement de contrôle est nécessaire pour confirmer le résultat.

L'activité effondrée d'une enzyme de la famille des sulfatases (exemple dans la MPS II, IIIA, IIID, VI et la leucodystrophie métachromatique) peut être associée à un déficit d'une ou de plusieurs autres sulfatases, c'est la maladie d'Austin. Elle correspond à un déficit multiple en sulfatases et est due à un défaut en amont dans la synthèse de ces enzymes (blocage de la transformation de la cystéine en α -formylglycine) (10). Devant la diminution

d'une activité enzymatique d'une sulfatase abaissée, il faut toujours contrôler l'activité d'au moins une autre sulfatase pour éliminer la maladie d'Austin.

4.3 L'analyse génétique

Au vu du grand polymorphisme des altérations géniques de la MPS III, la recherche génétique ne peut pas être utilisée à but diagnostique, elle peut néanmoins être utile pour prédire la sévérité du phénotype (9) ou dans les études familiales, lorsque l'atteinte génique est connue et recherchée spécifiquement.

Le diagnostic prénatal reste exceptionnel, il ne peut être effectué que dans le cas d'un ou de plusieurs enfants malades dans la famille et lorsque l'anomalie génétique familiale a été clairement identifiée. Les parents doivent avoir été informés, lors d'une consultation génétique des risques encourus lors de l'amniocentèse et donner leur consentement.

4.4 Algorithme diagnostique de la maladie de Sanfilippo type B au laboratoire d'Enzymopathies du CHUGA

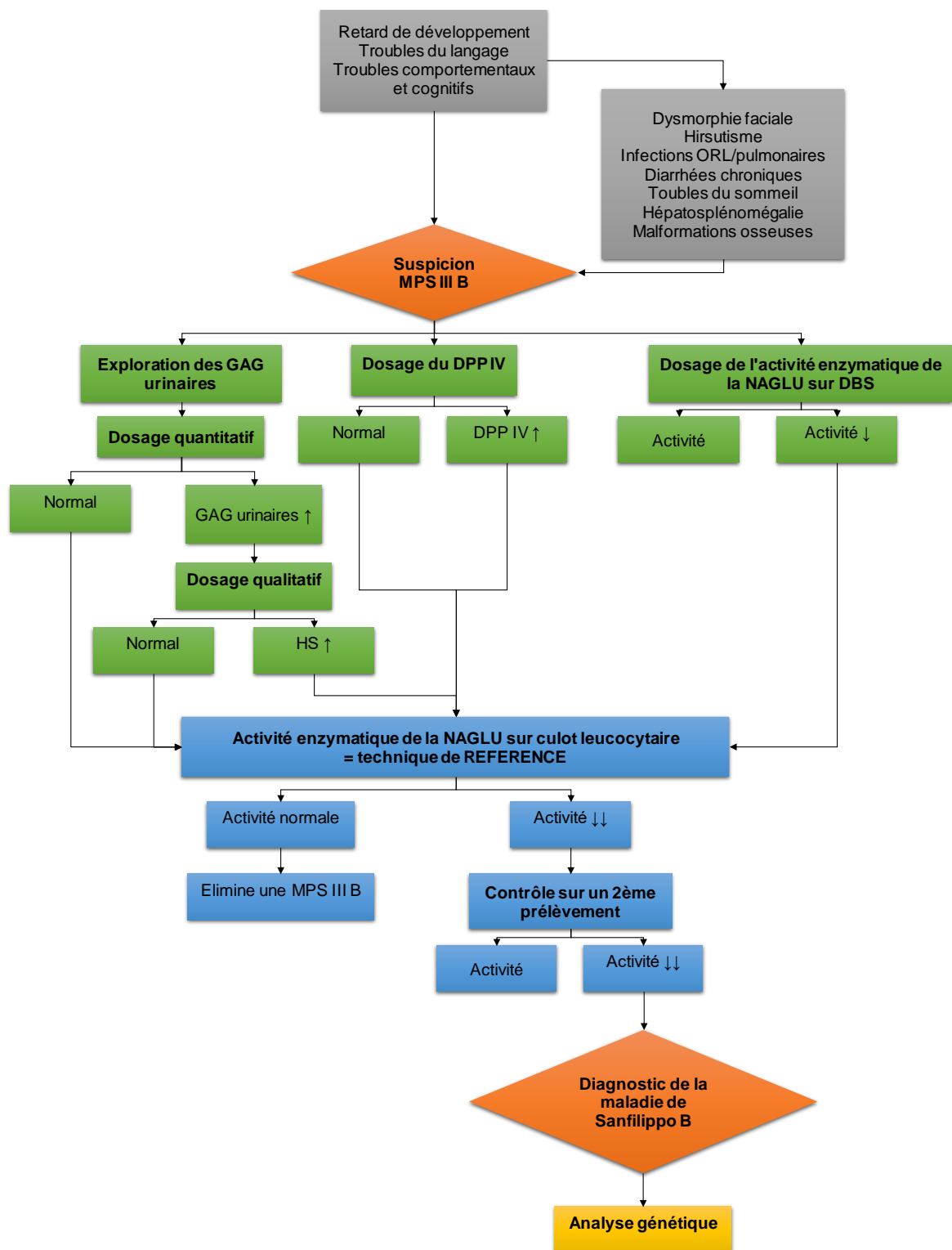


Figure 6 : Algorithme des pratiques grenobloises pour le diagnostic de la maladie de Sanfilippo B

5 Les traitements de la maladie de Sanfilippo

5.1 Les traitements symptomatiques

La prise en charge de la maladie de Sanfilippo repose en premier lieu sur des traitements symptomatiques permettant de soulager l'atteinte multisystémique. Une équipe pluridisciplinaire est nécessaire pour encadrer le patient et une coopération entre tous les acteurs médicaux et paramédicaux est importante (neurologie, orthopédie, chirurgie, cardiologie, ORL, kinésithérapie, etc). L'idéal pour ces patients est une prise en charge annuelle dans un centre de référence ou de compétence dédié aux maladies héréditaires du métabolisme ou aux maladies lysosomales, associée à un suivi plus fréquent dans un centre plus proche du domicile. La prise en charge doit être coordonnée par un médecin référent permettant une interaction entre tous les intervenants auprès du malade.

5.2 Les traitements spécifiques

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique commercialisé pour les MPS III. Néanmoins de nombreuses molécules sont en développement et certaines sont sur le point d'être commercialisable.

Différentes stratégies thérapeutiques ont été étudiées pour le traitement des MPS III (Figure 7). Il est possible d'agir sur différents points de la cascade métabolique afin de restaurer la voie de dégradation des GAG ou de diminuer leur accumulation. A l'heure actuelle, les deux seuls traitements spécifiques utilisés sont l'enzymothérapie substitutive et la transplantation de cellules souches hématopoïétique. Les indications de traitement sont discutées au sein du CETMPS (Comité d'Evaluation Thérapeutique des Mucopolysaccharidoses).

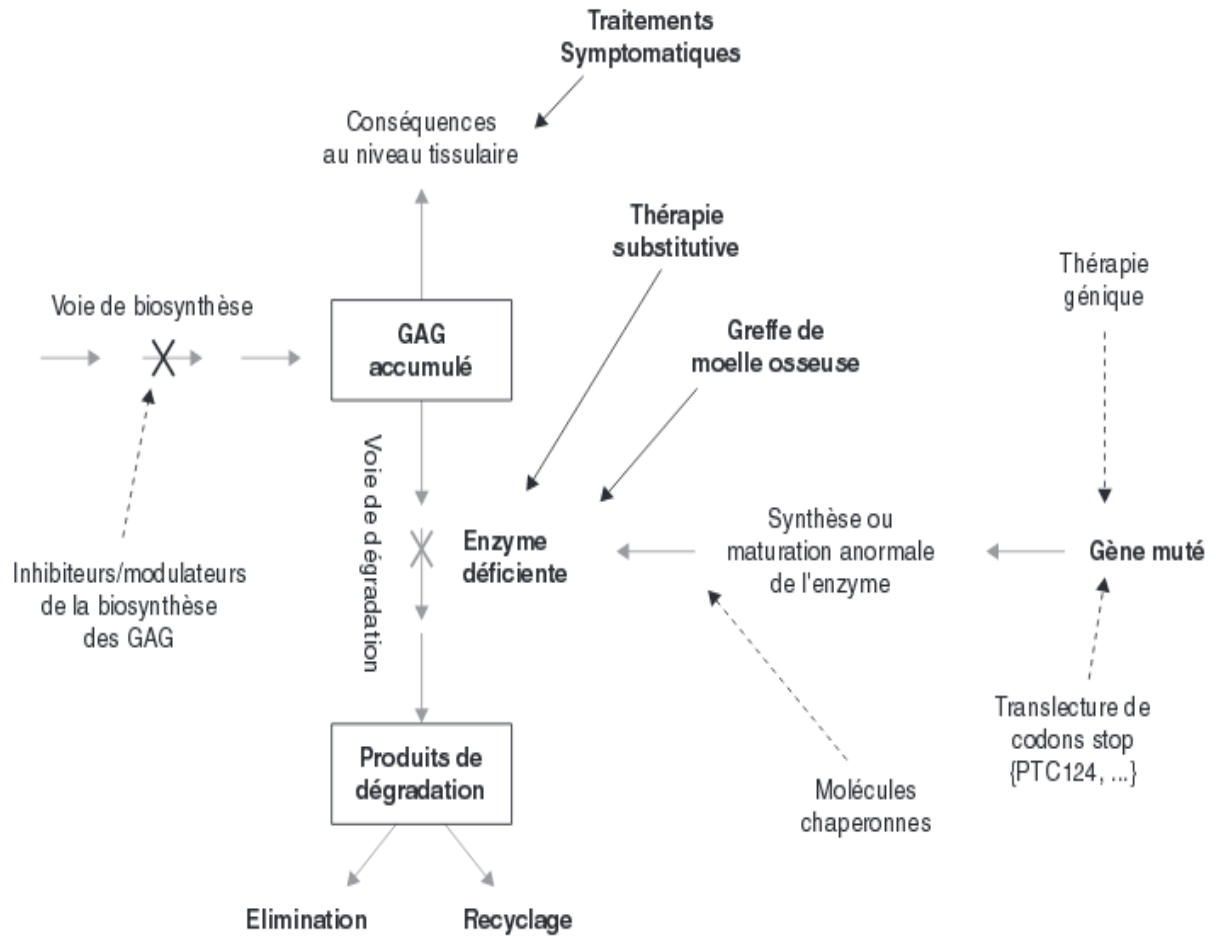


Figure 7 : Stratégies thérapeutiques actuelles et futures des mucopolysaccharidoses

(d'après (35))

Les flèches pleines correspondent à des traitements déjà utilisés à l'heure actuelle, les flèches en pointillés correspondent aux traitements encore en développement. La croix grise correspond au blocage dans le catabolisme des GAG liée au déficit enzymatique et la croix noire représente le blocage de la synthèse des GAG due aux inhibiteurs de substrat.

a) L'enzymothérapie substitutive

L'enzymothérapie substitutive consiste à apporter l'enzyme manquante afin de restaurer la voie de dégradation des GAG. Cette enzyme est produite sous forme recombinante par des cellules de la lignée CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectées avec un vecteur d'expression codant pour l'enzyme souhaitée. Le traitement du patient consiste en l'administration intraveineuse de l'enzyme recombinante une à deux fois par semaine et à vie. L'obstacle majeur de cette thérapie est le passage de la barrière hématoencéphalique.

Des expérimentations sur la souris par des injections intrathécales d'enzyme recombinante ont montré une meilleure efficacité par rapport à l'injection intraveineuse. Le coût, la voie d'administration intraveineuse, les réactions d'hypersensibilité à l'administration ainsi que le faible passage à des sites clés (cerveau, os) sont des facteurs limitants au développement de ces traitements substitutifs (1).

La thérapie substitutive est disponible actuellement pour la MPS I, II, IV et VI (9). De nombreuses études sont en cours pour le développement d'enzymothérapie substitutive pour le traitement de la MPS III A et III B (Tableau 7 page 51).

b) La transplantation de cellules souches hématopoïétiques

Il s'agit d'une administration intraveineuse de cellules souches hématopoïétiques histocompatibles chez un patient qui a subi préalablement une myélosuppression. Les nouvelles cellules saines s'implantent dans la moelle osseuse et synthétisent l'enzyme dont le patient est déficitaire. Cette thérapeutique peut être utilisée dans la MPS I, II, IV voire VI (9). Elle n'a été que peu pratiquée chez les patients atteints de la maladie de Sanfillipo.

De nombreux inconvénients incombent à cette greffe de cellules souches hématopoïétiques. Tout d'abord, sur le plan hématologique, avec le risque infectieux durant la phase d'aplasie médullaire pré-greffe et sur le plan immunologique avec la réaction de rejet du greffon contre l'hôte ou GVHD caractérisée par une atteinte d'un ou de plusieurs organes. Un suivi rapproché du patient est réalisé afin de mesurer la prise de greffe (installation des cellules du donneur de façon permanente dans la moelle du receveur). Dans le cas d'une greffe parfaitement réussie, la prise de greffe est totale (autour de 100 % de cellules du donneur dans la moelle osseuse). Chez certains patients, on observe une prise de greffe partielle avec un chimérisme (association des cellules du donneur et du receveur dans la moelle). Ce chimérisme est un facteur de risque d'échec de la greffe car les cellules du receveur peuvent reprendre le dessus sur les cellules du donneur.

c) Les inhibiteurs de substrat

Certaines molécules peuvent inhiber la voie de synthèse des GAG et ainsi rétablir un équilibre entre leur production et leur dégradation.

Les deux molécules développées et commercialisées sont le miglustat et l'éliglustat. Elles miment une molécule de céramide et inhibe la glucosylcéramide synthase. Le miglustat a été approuvé comme traitement de 2^{ème} ligne de la maladie de Gaucher de type I et pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick type C. L'éliglustat a été approuvé pour le traitement de 1^{ère} ligne de la maladie de Gaucher type I. Ces traitements sont administrés par voie orale et offrent une facilité de traitement par rapport à d'autres thérapeutiques dont l'administration est plus invasive et contraignante.

La génistéine est une isoflavone abondante dans le soja. Cette molécule fonctionne comme un inhibiteur de la protéine tyrosine kinase associée aux récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) et du facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF). Ces récepteurs régulent la biosynthèse des GAG (1). Une administration chez des souris atteintes de MPS IIIB montre une diminution de la synthèse des GAG, une diminution des troubles comportementaux et une diminution de la neuroinflammation (36). Une étude de phase III testant la génistéine contre placebo chez des enfants et adolescents de moins de 18 ans atteints de MPS III A, B ou C est en train d'être menée. La molécule de rhodamine B inhibe l'élongation des GAG et semble également montrer une efficacité chez des souris MPS IIIA (37).

d) La thérapie génique

Les MPS sont des maladies liées à des anomalies génétiques monogéniques. Les gènes impliqués dans les MPS III ont été identifiés. La thérapie génique permet de modifier un gène anormal afin de le remplacer par le même gène non altéré.

Il est possible de modifier ce gène *in vitro* par l'action d'un rétrovirus sur les cellules du patient puis de les lui réinjecter. La découverte de la capacité des AAV 9 (*adeno-*

associated virus 9), lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse, à corriger *in vivo* le gène anormal des cellules en périphérie ainsi qu'au niveau central en franchissant la barrière hématoencéphalique (BHE) présente une perspective majeure pour le traitement des MPS (1).

La difficulté pour le traitement de la maladie de Sanfilippo est de cibler les cellules du SNC, néanmoins, la voie d'administration intracérébrale peut être une piste (38). Des essais cliniques sont en cours chez l'homme pour la maladie de Sanfilippo A et B (35).

e) *Les molécules chaperonnes*

Les déficits enzymatiques dans les MSL peuvent être dus à une dégradation d'une enzyme mal conformée avant son arrivée au niveau de son site d'action, le lysosome. La stratégie serait de développer de petites molécules se fixant à l'enzyme juste après sa synthèse afin de la protéger de la dégradation et lui permettre d'accéder au lysosome. Cette thérapeutique s'adresse aux patients ayant une activité enzymatique résiduelle, le site actif de l'enzyme doit être intacte et donc toutes les altérations géniques ne sont pas éligibles à cette approche (1). Il n'existe à l'heure actuelle aucune molécule chaperonne pour le traitement de la maladie de Sanfilippo.

f) *Les essais cliniques et perspectives*

Des essais cliniques se développent autour de la maladie de Sanfilippo notamment pour les sous types A et B (Tableau 7).

Tableau 7 : Etudes cliniques en cours ou terminées sur le traitement de la maladie de Sanfilippo

(d'après (39))

| Référence/ identificateur et commanditaire du registre des essais cliniques | MPS III | Molécule | Phase |
|--|---------------|---|--------|
| Guffon et al. 2011 (40) Hospices civiles de Lyon | A, B, C, D | Miglustat oral | II/III |
| Tardieu et al. 2014 (41) <i>Lysogene</i> TM | A | Administration intracérébrale d'un vecteur viral adéno-associé serotype rh 10 transportant les gènes SGSH et SUMF1 humains | I/II |
| Jones et al. 2016 (42) <i>Shire</i> TM | A | Administration intrathécale d'une héparane-N-sulfatase (rhHNS) | I/II |
| NCT0129972 (Clinicaltrials.gov) <i>Shire</i> TM | A | Administration intrathécale d'une héparane-N-sulfatase (rhHNS) | I/II |
| NCT02060526 (Clinicaltrials.gov) <i>Shire</i> TM | A | Administration intrathécale d'une héparane-N-sulfatase (rhHNS) | II |
| 2013-001479_18 EudraCT Centre hospitalo-universitaire de Manchester | A, B, C | Administration orale de fortes doses de génistéine aglycone | III |
| NCT02324049 (Clinicaltrials.gov) <i>Alexion</i> TM | B | Administration intraveineuse d'une alpha-N-acétylglucosaminidase recombinante humaine | I/II |
| NCT02618512 (Clinicaltrials.gov) <i>Alexion</i> TM | B | Administration intraveineuse d'une alpha-N-acétylglucosaminidase recombinante humaine | I/II |
| NCT02754076 (Clinicaltrials.gov) <i>Biomarin</i> TM | B | Administration intracérébroventriculaire d'alpha-N-acétylglucosaminidase recombinante humaine associée à l'IGF2 tronquée (rhNAGLU-IGF2) | I/II |
| NCT02716246 (Clinicaltrials.gov) Kevin Flanigan <i>Abeona Therapeutics</i> TM | A | Administration intraveineuse du vecteur viral scAAV9.U1a.hSGSH | I/II |

SGSH : gène impliqué dans la MPS IIIA ; SUMF1 : facteur activant les sulfatases notamment l'héparane-N-sulfatase ; IGF2 : *Insulin-like Growth Factor 2*

Plusieurs pistes thérapeutiques des MPS III sont actuellement explorées. Parmi les stratégies, l'enzymothérapie substitutive est la plus développée. Les laboratoires pharmaceutiques tentent de pallier l'obstacle majeur de ce traitement, le ciblage de sites clés (le SNC dans la MPS III). Le laboratoire *Biomarin*TM a développé la molécule BMN 250[®] qui est un recombinant chimérique de fusion de l'alpha-N-acétylGlucosaminidase humaine et de l'IGF 2 humaine. Cette fusion permet à l'enzyme recombinante de cibler plus facilement les neurones, lieu d'action privilégiée pour le traitement de la MPS IIIB. L'administration se fait par voie intra-cérébroventriculaire. Une étude préclinique chez le chien atteint de MPS IIIB a montré une amélioration des capacités cognitives et une réduction de la perte de la substance blanche. Chez la souris MPS IIIB, on a montré une clairance plus élevée de l'HS grâce à cette molécule (43). L'essai clinique de phase I/II est en cours chez l'homme (NCT02754076).

Le laboratoire *Alexion*TM mène également une étude clinique (NCT02618512) sur un recombinant de l'alpha-N-acétylGlucosaminidase, administré en intraveineux, pour le traitement de la MPS IIIB.

Le laboratoire *Shire*TM a développé une héparane-N-Sulfatase recombinante pour le traitement de la MPS IIIA (NCT01299727).

La thérapie génique semble attirer d'autres laboratoires pharmaceutiques, la société *Lysogene*TM utilise un vecteur viral de type adénovirus pour transfecter, dans les cellules du malade, le gène fonctionnel de la N-acétylGlucosaminidase (NAGLU). Les résultats d'une étude sur des enfants atteints de MPS III à 30 mois montrent une amélioration clinique. Les patients continuent à acquérir des compétences cognitives à la différence des patients non traités (41).

Une étude clinique a testé le miglustat chez des patients MPS III et n'a montré aucune efficacité clinique et biologique sur cette pathologie (40).

Au vu du nombre d'essais cliniques en cours et de leurs premiers résultats encourageants, le diagnostic précoce sera un point essentiel pour que ces traitements puissent exercer pleinement leur efficacité. En effet, l'instauration des traitements avant l'installation irréversible des signes cliniques est primordiale. Une sensibilisation des professionnels médicaux à cette pathologie et à leur diagnostic est indispensable.

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1 : Matériel

1 Equipement et petit matériel

Tableau 8 : Liste du petit matériel

| Matériel | Fournisseur | Référence |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------|
| Sonde à ultrasons | Bandelin™ | HD 2200 |
| Centrifugeuse | Heraeus™ | Biofuge Pico 40194611 |
| Bain-marie | Julabo™ | EC-PA/KU |
| Fluorimètre | Berthold™ | LB940 Multicode Reader Mithras |
| Spectrophotomètre | Thermo Scientific™ | Multiskan spectrum 237105 |
| Plaques noires | Thermo Scientific™ | 055214 |
| Plaques transparentes | Thermo Scientific™ | 055140 |
| Microtubes | Eppendorf™ | 500µL Réf 0030121.023 |
| pH mètre | Hanna™ | Cyberscan 510 Ion HI 1144B |

2 Matériel biologique

2.1 Leucocytes

Les culots leucocytaires sont obtenus à partir de tube de sang EDTA de 5 ou de 7 mL. Ces tubes proviennent de don de sang de sujets sains de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Grenoble.

2.2 DBS

Les DBS sont réalisés à partir de tubes EDTA provenant également de sujets sains adultes issus du don de sang de l'EFS de Grenoble.

3 Réactifs

3.1 Réactifs nécessaires pour la préparation des échantillons

Tableau 9 : Réactifs nécessaires pour la préparation du culot leucocytaire et du DBS

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|--|---------------------------------------|--|------------------|
| Préparation du culot leucocytaire | Dextran T500 | Sigma™ | 31392-50G |
| | NaCl | Carlo erba™ | 479687 |
| | Eau physiologique | Versylene Fresenius™ | B230551 |
| Préparation du DBS | Papier buvard calibré Whatman 903® | GE Healthcare Bio-Sciences Corp™ | 10531018 |

3.2 Réactifs nécessaires pour la préparation du substrat

Le substrat sera reconstitué dans un tampon citrate-phosphate ou dans un tampon acétate à la concentration souhaitée. La concentration de cette solution et le pH du tampon utilisé seront déterminés dans la partie « Résultats ».

Tableau 10 : Substrat utilisé pour la réaction enzymatique

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|-----------------|---|-------------|-----------|
| Substrat | 4-Méthylumbelliferyl N-acétyl-alpha-D-Glucosamine | Carbosynth™ | EM06426 |

Tableau 11 : Réactifs nécessaires pour la préparation du tampon citrate-phosphate et acétate de sodium

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|---------------------------------|--|----------------------|--------------|
| Tampon citrate-phosphate | Di-sodium hydrogénophosphate dodécahydrate anhydre | Emsure™ | 7558-79-4 |
| | Acide citrique monohydrate | Emsure™ | 5949-29-1 |
| | Eau ultrapure Distributeur Milli-Q Plus® | Merck Millipore™ | |
| Tampon acétate de sodium | Acide acétique glacial | Carbo erba reagents™ | 607-002-00-6 |
| | Acétate de sodium anhydre | Carbo erba reagents™ | 127-09-03 |
| | Eau ultrapure Distributeur Milli-Q Plus® | Merck Millipore™ | |

3.3 Réactifs nécessaires pour la réalisation du tampon d'arrêt glycine

Tableau 12 : Réactifs nécessaire pour la réalisation du tampon d'arrêt glycine (1 M, pH 10,5)

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------|------------|
| Tampon glycine (1M, pH 10,5) | Glycine | Sigma™ | 50046-250G |
| | Pastilles de d'hydroxyde de sodium | VWR Chemicals™ | 28244.295 |

3.4 Réactifs nécessaires à la réalisation du tampon d'arrêt carbonate

Tableau 13 : Réactifs nécessaires à la réalisation du tampon d'arrêt carbonate (Na_2HCO_3 0,35 M ; NaHCO_3 0,15 M ; pH 10,7)

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|--|--|------------------|-----------|
| Tampon carbonate (Na_2HCO_3 0,35 M ; NaHCO_3 0,15 M ; pH 10,7) | Carbonate de sodium anhydre | Carlo erba™ | 479307 |
| | Bicarbonate de sodium | Carlo erba™ | 478536 |
| | Triton X-100 | Sigma™ | T9284 |
| | Eau ultrapure Distributeur Milli-Q Plus® | Merck Millipore™ | |

3.5 Réactifs nécessaires à la préparation de la solution d'albumine sérique bovine (BSA) 0,2 %

Tableau 14 : Réactifs nécessaires à la préparation de la BSA

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|---|--|------------------|------------|
| Solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 0,2 % | Albumine sérique bovine (BSA) poudre | Sigma™ | A4503 |
| | Eau ultrapure Distributeur Milli-Q Plus® | Merck Millipore™ | |
| | Hydroxyde de sodium | VWR™ | 28 244.295 |
| | Acide chlorhydrique | VWR™ | 450021Y |
| | Azide de sodium | VWR™ | 27.967.150 |

3.6 Réactifs nécessaires à la réalisation de la gamme de 4-MU

Tableau 15 : Réactifs nécessaires à la réalisation de la gamme 4-MU

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|------------------|
| Gamme 4-MU | 4-méthylumbelliféron (4-MU) | Sigma™ | M1381-25G |
| | Tampon glycine (1M, pH 10,5) | | |

3.7 Réactifs nécessaires pour le dosage des protéines totales

Tableau 16 : Réactifs nécessaires au dosage des protéines totales

| | Produit | Fournisseur | Référence |
|-----------------------------|--|--------------------|------------------|
| Dosage des protéines | Kit Quick Start Bradford Protein Assay® | Biorad™ | #500-0207 |
| | Solution Quick Start Bradford Dye Reagent® | Biorad™ | #500-0205 |

Chapitre 2 : Méthodes

1 Préparation de l'échantillon

1.1 Le culot leucocytaire

La préparation d'un culot leucocytaire est une étape pré-analytique qui consiste à séparer les leucocytes des globules rouges du sang total. Nous utilisons pour cela une technique de sédimentation en présence de Dextran. Du fait de leur membrane riche en lectines, les globules rouges sédimentent plus rapidement au travers du Dextran que les autres cellules.

Le Dextran est chauffé dans un bain-marie à 37 °C. Un volume de sang total est mélangé à deux volumes de Dextran. Le mélange est ensuite incubé 30 min, à 37 °C pour la sédimentation. Une fois que les hématies ont sédimenté au fond du tube et que le surnageant est bien clair, il est récupéré et centrifugé 20 minutes, à 1000 g et à 20 °C. Le culot leucocytaire se retrouve au fond du tube. Une lyse hypotonique permet ensuite d'éliminer les globules rouges résiduels. Pour cela, le surnageant est aspiré grâce à une pompe à vide et le culot leucocytaire obtenu est resuspendu dans 3 mL d'eau ultra pure glacée au vortex doux pendant 30 secondes maximum. Afin de rétablir l'iso-tonicité et ne pas altérer les leucocytes, 1 mL de NaCl hypertonique (3,5 %) est ajouté. Une nouvelle centrifugation de 20 minutes, à 1000 g et à 20°C est nécessaire pour obtenir le culot leucocytaire. Il faut 2 à 3 lavages de ce type pour obtenir un culot exempt d'hématies (le culot doit être bien blanc). Après le dernier lavage, bien éliminer tout le liquide et le culot sec leucocytaire sera conservé à -80°C jusqu'à son utilisation ultérieure. Pour la réalisation du dosage enzymatique, il suffira de remettre en suspension le culot leucocytaire dans de l'eau physiologique et d'effectuer une lyse par ultrasons.

1.2 Le DBS

Les DBS sont réalisés au laboratoire par dépôt de 40 μL de sang total sur chaque spot du papier buvard. Un temps de séchage d'au moins 4 heures est nécessaire. Les papiers buvards sont ensuite conservés, à 4°C, dans un sachet plastique contenant un dessiccant.

Pour la réalisation du dosage enzymatique, les DBS sont « *punchés* » grâce à une pince emporte-pièce réalisant des disques de 3 mm de diamètre. Le papier buvard est calibré de telle sorte que chaque punch de 3 mm de diamètre contient de 3,6 μL de sang total.

2 Préparation des réactifs

2.1 Préparation du substrat

Le substrat en poudre est reconstitué dans du tampon. Au cours de notre étude, nous avons testé deux tampons : un tampon citrate-phosphate et un tampon acétate. Pour chacun, différents pH ont été testés.

- *Préparation du tampon citrate-phosphate*

Le tampon citrate-phosphate est préparé à partir d'une solution d'acide citrique 0,1 M et d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium 0,2 M.

Tableau 17 : Préparation du tampon citrate-phosphate

| | Produit | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Poids |
|---|--|------------------|-----------------------|-------|
| Préparation de la solution d'acide citrique 0,1 M | Acide citrique monohydrate | $C_6H_{10}O_8$ | 210,14 | 2,1 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 100 mL | | |
| Préparation de la solution d'hydrogénophosphate de sodium 0,2 M | Di-sodium hydrogénophosphate dodécahydrate anhydre | Na_2HPO_4 | 141,96 | 1,4 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 50 mL | | |

Ajuster 20 mL de la solution d'hydrogénophosphate de sodium à 0,2 M avec la solution d'acide citrique à 0,1 M jusqu'à obtention du pH souhaité.

- Préparation du tampon acétate de sodium

Le tampon acétate de sodium est préparé à partir d'une solution d'acétate de sodium 0,2 M et d'une solution d'acide acétique glaciale 0,1 M.

Tableau 18 : Préparation du tampon acétate de sodium

| | | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Poids |
|--|-------------------------|------------------|-----------------------|---------|
| Préparation de la solution d'acétate de sodium 0,2 M | Acétate de sodium | $C_2H_3NaO_2$ | 82,03 | 2,1 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 40 mL | | |
| Acide acétique glaciale pur | Acide acétique glaciale | CH_3CO_2H | 60,05 | 1,15 mL |

Ajuster la solution d'acétate de sodium 0,2 M avec l'acide acétique glaciale pur jusqu'à l'obtention du pH souhaité puis compléter avec de l'eau ultrapure jusqu'à 100 mL.

2.2 Préparation du tampon glycine (1 M, pH 10,5)

Tableau 19 : Préparation du tampon glycine (1 M, pH 10,5)

| | | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Poids |
|--|----------------------------------|---|------------------------------|--------------|
| Préparation d'une solution de glycine | Glycine | C ₂ H ₅ NO ₂ | 75,07 | 75,07 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 800 mL | | |
| Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium 10 N | Hydroxyde de sodium en pastilles | NaOH | 40 | 400 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 1 L | | |

Ajuster le pH de la solution de glycine jusqu'à pH 10,5 avec la solution de NaOH 10 N. Compléter jusqu'à 1 L avec de l'eau ultra pure.

2.3 Préparation du tampon carbonate (Na₂CO₃ 0,35 M ; NaHCO₃ 0,15 M ; pH 10,7)

Tableau 20 : Préparation du tampon carbonate (Na₂CO₃ 0,35 M ; NaHCO₃ 0,15 M ; pH 10,7)

| | | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Poids |
|---|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------|
| Préparation de la solution 1 à 0,5 M | Carbonate de sodium anhydre | Na ₂ CO ₃ | 105,99 | 53 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 700 mL | | |
| Préparation de la solution 2 à 0,5 M | Bicarbonate de sodium | NaHCO ₃ | 84,01 | 4,2 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 100 mL | | |

Ajuster la solution 1 à pH 10,7 grâce à la solution 2 (environ 60 mL).

2.4 Préparation de la solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 0,2 % (p/v)

Tableau 21 : Préparation de la solution de BSA à 0,2 %

| | | Poids |
|---|----------------------------------|-----------|
| Préparation de la solution mère de BSA à 5 % (p/v) | Albumine sérique bovine (poudre) | 2,5 g |
| | Eau ultra pure | Qsp 50 mL |

Laisser la solution reposer durant une nuit à 4°C. Le lendemain, ramener la solution à température ambiante puis ajuster le pH à 10 avec une solution de NaOH 6 M. Chauffer à 50°C au bain-marie durant 4 heures et laisser refroidir. Ajuster le pH à 7 avec de l'HCl 1 M puis centrifuger à 3000 rpm, durant 10 min, récupérer le surnageant et éliminer l'éventuel culot.

Pour la préparation de la solution de BSA à 0,2 %, diluer la solution de BSA (5%) au 1/25^{ème} dans de l'eau ultra pure contenant de l'azide de sodium à 0,02 % (20 mg pour 100 mL d'eau).

2.5 Préparation de la gamme de 4-MU

Tableau 22 : Préparation de la solution mère de 4-MU à 1 mM

| | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Poids |
|--------------------------------------|---|-----------------------|--------|
| 4-méthylumbelliférone | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 176,17 | 8,8 mg |
| Tampon glycine (1 M, pH 10,5) | Qsp 50 mL | | |

La gamme de 4-MU est réalisée en diluant la solution mère de 4-MU à 1 mM dans du tampon glycine (1 M pH 10,5) afin d'obtenir les différentes concentrations de 4-MU.

Les différents points de la gamme seront déterminés dans la partie « Résultats ». Chaque point de la gamme est déposé dans une plaque de 96 puits. La fluorescence de la gamme sera mesurée en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 365 nm et une longueur d'onde d'émission à 450 nm. L'intensité de fluorescence de chaque point de la gamme est reportée dans un tableur permettant de tracer la droite de calibration, de calculer le coefficient de corrélation R^2 et le coefficient directeur.

3 Le dosage des protéines totales

Une étape de dosage des protéines est nécessaire pour le dosage d'activité enzymatique leucocytaire. La quantification des protéines dans le culot leucocytaire permet de rapporter l'activité enzymatique à la quantité de leucocytes dans le culot.

Le dosage des protéines est réalisé par la technique Bradford qui utilise la propriété du bleu de Coomassie-G 250 à former, avec les groupements amines libres des protéines, un complexe bleu possédant un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration du milieu et donc la mesure d'absorbance est proportionnelle à la concentration protéique. Le kit de dosage Quick Start Bradford Protein Assay® (Biorad™) comporte 5 standards pour la réalisation d'une gamme et un contrôle de qualité permettant de valider le dosage. La réaction colorimétrique est déclenchée grâce à la solution Quick Start Bradford Dye Reagent® (Biorad™).

4 Réalisation des dosages d'activités enzymatiques

Le laboratoire d'enzymopathies du CHUGA utilise la méthode fluorimétrique pour les mesures d'activités enzymatiques. La technique consiste à mesurer la quantité de substrat consommé par l'enzyme présente dans l'échantillon biologique. Le substrat est un substrat

synthétique proche du substrat naturel de l'enzyme et qui est couplé à une molécule de 4-MU. La molécule de 4MU n'est pas fluorescente lorsqu'elle est liée au substrat, mais dès que l'enzyme coupe cette liaison, la molécule de 4-MU ainsi libérée émet une fluorescence. La fluorescence émise est quantifiée par un fluorimètre (excitation 365 nm et émission 450 nm). Ainsi, plus l'enzyme est active dans l'échantillon, plus elle va couper de liaisons entre le substrat et la 4-MU et plus la fluorescence sera importante.

La Figure 8 présente le principe de la mesure d'activité enzymatique appliquée à la N-acétylGlucosaminidase (NAGLU) dans le cadre du diagnostic de la MPS IIIB.

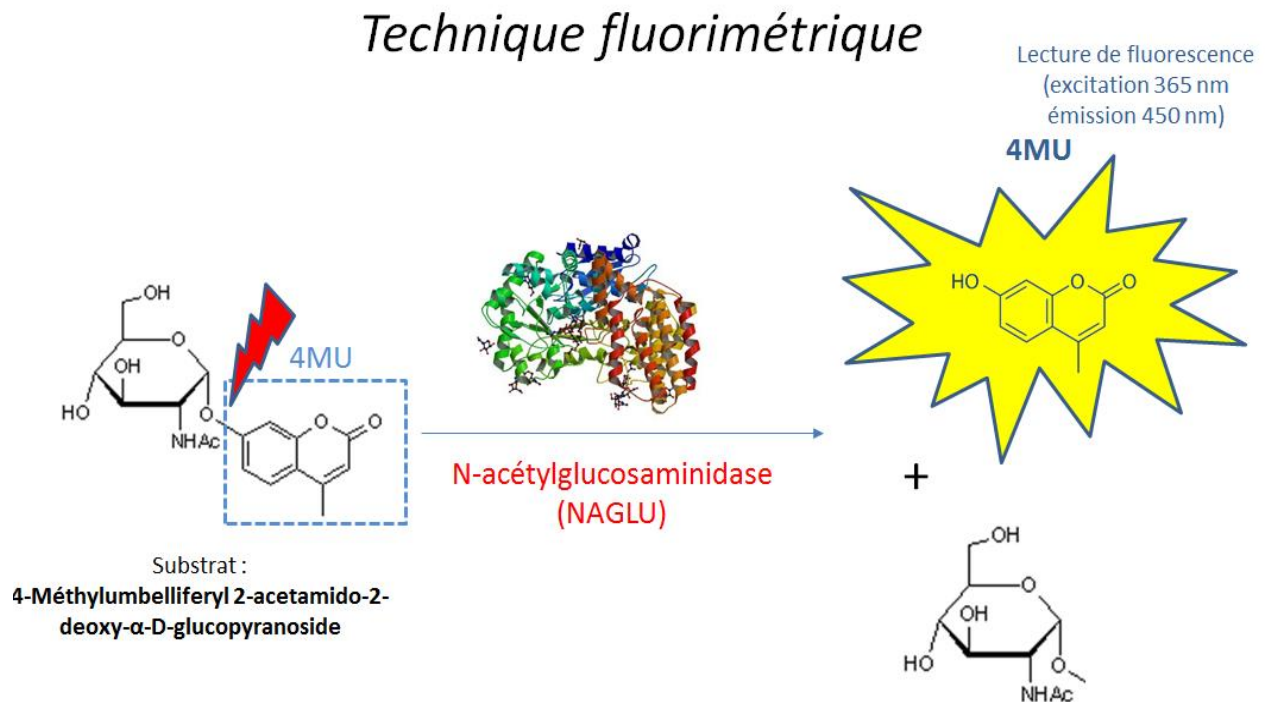


Figure 8 : Principe de mesure de l'activité enzymatique appliquée à la N-acétylGlucosaminidase, enzyme impliquée dans le MPS III B

L'encadré en pointillé bleu correspond à la molécule de 4-MU liée au substrat naturel de l'enzyme. La flèche rouge représente la cassure effectuée par l'enzyme et libérant la molécule de 4-MU fluorescente.

L'intensité de fluorescence mesurée est reportée sur la gamme de calibration de 4-MU et permet de déterminer la quantité de 4-MU libérée au cours de la réaction.

4.1 Dosage de l'activité enzymatique leucocytaire

Lors du dosage d'activité enzymatique leucocytaire, un dosage « blanc réactif » est réalisé dans les mêmes conditions qu'un dosage classique mis à part que l'échantillon biologique « patient » est remplacé par la solution de BSA (0,2 %). Ce dosage permettra de soustraire la fluorescence parasite due aux réactifs (ou bruit de fond) de la fluorescence correspondant à l'activité enzymatique. Les dosages de patients sont toujours réalisés en triplicata afin d'obtenir un résultat fiable et répétable.

Tableau 23 : Composition du dosage enzymatique leucocytaire

| | Dosage « blanc réactif » | Dosage patient |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | X1 | X3 |
| Leucocytes | non | oui |
| BSA | oui | non |
| Substrat | oui | oui |

Les conditions précises du dosage seront déterminées dans la partie « Résultats ».

4.2 Dosage d'activité enzymatique sur DBS

Lors du dosage d'activité enzymatique sur DBS, un dosage « blanc réactif » et un dosage « blanc échantillon » par patient sont analysés dans la même série. Le « blanc réactif » correspond à un punch vierge analysé dans les mêmes conditions que l'échantillon du patient. Le « blanc réactif » permet de soustraire la fluorescence parasite due aux réactifs (ou bruit de fond) de la fluorescence correspondant à l'activité enzymatique. Le « blanc échantillon » correspond à un dosage d'un punch de sang du patient dans lequel le substrat est remplacé par de l'eau PPI. Il permet d'éliminer une auto-fluorescence de l'échantillon. L'intensité de fluorescence de ces blancs correspond au bruit de fond de la réaction et sont soustraites à la fluorescence du dosage du patient.

Nous réalisons également les dosages en triplicata.

Tableau 24 : Composition du dosage enzymatique sur DBS

| | Dosage « blanc réactif » X1 | Dosage « blanc échantillon » X1 | Dosage patient X3 |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| 1 punch | Vierge | Patient | Patient |
| Substrat | oui | non | oui |

Les conditions précises du dosage seront déterminées dans la partie « Résultats ».

4.3 Expression de l'activité enzymatique déterminée sur leucocytes et sur DBS

L'expression de l'activité enzymatique sur leucocytes et sur DBS est différente de par la nature de l'échantillon. Sur DBS, les résultats sont exprimés en nmol/h/**mL de sang total** alors que pour les leucocytes, les résultats sont exprimés en nmol/5h/**mg de protéines** (Tableau 25). En effet, la technique sur leucocytes comporte une étape préalable : le dosage des protéines dans le culot leucocytaire. Cela permet de tenir compte du nombre de leucocytes dans le culot, et de pouvoir comparer les résultats de différents échantillons entre eux.

Sur goutte de sang séchée, il est impossible de doser les protéines. L'activité enzymatique est donc rapportée au volume de sang total contenu dans le punch de 3 mm correspondant à 3,6 µL de sang total. On sait que les enzymes lysosomales sont surtout présentes dans les leucocytes. Le résultat du DBS est donc influencé par le nombre de leucocytes dans le sang. Les résultats DBS ne sont donc pas comparables entre eux car, pour un même volume de sang total, le nombre de leucocytes diffère d'un échantillon à l'autre. C'est la raison pour laquelle, la technique DBS n'est qu'une technique de dépistage ou *screening*. Son résultat est à interpréter en parallèle d'un hémogramme et doit être confronté à la clinique. Un résultat pathologique ou douteux en DBS doit être systématiquement contrôlé par un dosage sur leucocytes.

Tableau 25 : Expression de l'activité enzymatique par technique leucocytaire et DBS

| | Leucocytes | DBS |
|--|--|---|
| Dosage des protéines | Étape préalable de dosage des protéines (technique Bradford) | Dosage des protéines impossible |
| Unité de l'activité enzymatique | nmoles de 4MU libérées/5h/mg de protéines | nmoles de 4MU libérées/h/mL de sang total |
| Influences | | Influencé par le nombre de leucocytes dans le sang |
| Interprétation | Diagnostic de certitude | Dépistage qui doit être confirmé par la technique sur leucocytes Et interprété en fonction de la NFS et de la clinique ++ |

PARTIE 3 : RESULTATS

Chapitre 1 : Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail est de développer les techniques de diagnostic et de dépistage de la maladie de Sanfilippo B (déficit de l'enzyme N-acétylGlucosaminidase ou NAGLU). Dans un premier temps, nous avons optimisé la gamme de 4-MU déjà en vigueur au laboratoire afin d'harmoniser les techniques. Le but du travail est d'optimiser la technique de diagnostic de la maladie de Sanfilippo B par la mesure de l'activité leucocytaire de la NAGLU et de développer une nouvelle technique de dépistage par la mesure d'activité enzymatique de cette même enzyme sur DBS. La deuxième partie de l'étude est la validation de méthode de ces 2 analyses selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189.

Chapitre 2 : Mise au point des techniques

1 Optimisation de la gamme de 4-MU

Il existe deux gammes de 4-MU en vigueur au laboratoire d'Enzymopathies du CHUGA, une dédiée aux techniques leucocytaires et une pour les techniques sur DBS (Tableau 26). Le but est de développer une nouvelle gamme adaptée aux deux types d'échantillons.

Tableau 26 : Gammes de 4-MU en vigueur au laboratoire

| | Points de gamme (Concentration de 4-MU en $\mu\text{mol/L}$) | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|---|---|---|
| Gamme A | 0 | 0,11 | 0,23 | 0,34 | 0,46 | 0,91 | 1,82 | 2,73 | 3,64 | | | |
| Gamme B | 0 | 0,025 | 0,05 | 0,125 | 0,25 | 0,375 | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

Gamme A : ancienne gamme pour techniques leucocytaires / Gamme B : ancienne gamme pour techniques sur DBS

Nous avons tout d'abord recherché la limite supérieure de linéarité ainsi que les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de la gamme de 4-MU afin de déterminer l'étendue et la linéarité de mesure du fluorimètre.

- **Limite de détection :**

La limite de détection (LOD) est le plus petit signal qui peut être distingué du blanc. Pour déterminer la LOD, nous réalisons 30 mesures du point 0 de la gamme (contenant uniquement du tampon glycine).

$$LOD = 3 \times \text{écart type de la fluorescence des blancs}$$

La LOD de la gamme de 4-MU est de **0,001 µmol/L**.

- **Limité de quantification :**

La limite de quantification (LOQ) est la plus petite valeur qui peut être rendue avec un niveau de confiance acceptable.

$$LOQ = 10 \times \text{écart type de la fluorescence des blancs}$$

La LOQ de la gamme de 4-MU est de **0,003 µmol/L**.

- **Limité de linéarité :**

La limite de linéarité correspond à la plus haute concentration de 4-MU pour laquelle il y a une relation de proportionnalité concentration-fluorescence. Elle est déterminée en mesurant la fluorescence de solutions de 4-MU à différentes concentrations. Il faut déterminer jusqu'à quel point on observe une linéarité (Figure 9).

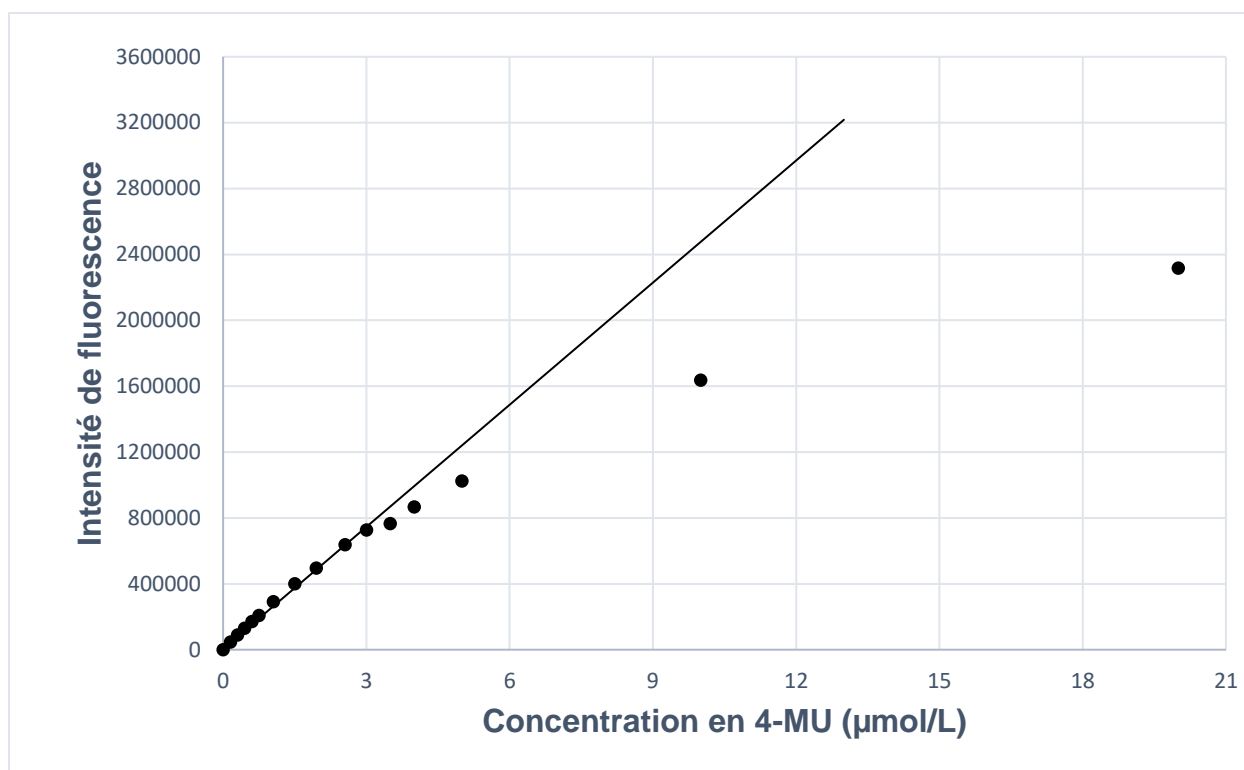


Figure 9 : Graphique présentant la détermination de la limite de linéarité de la gamme 4-MU

La courbe de tendance déterminée grâce aux premiers points de la gamme montre qu'il n'y a plus de relation linéaire après une concentration de **3 µmol/L** de 4-MU et pour une intensité de fluorescence de 727 000. Cela signifie que le fluorimètre n'est plus linéaire et donc plus fiable au-delà d'une fluorescence de **727 000 unités de fluorescence**.

Le dernier point de la nouvelle gamme ne devra donc pas dépasser 3 µmol/L de 4-MU. Les deux anciennes gammes dépassaient 3 µmol/L et n'étaient donc pas linéaires.

Pour la nouvelle gamme, nous avons choisi de mettre en place une gamme en 11 points allant jusqu'à 3 µmol/L (Tableau 27).

Tableau 27 : Nouvelle gamme de 4-MU

| | Points de gamme (Concentration de 4-MU en µmol/L) | | | | | | | | | | |
|----------------|---|------|-----|------|-----|------|------|-----|------|------|---|
| Nouvelle gamme | 0 | 0,15 | 0,3 | 0,45 | 0,6 | 0,75 | 1,05 | 1,5 | 1,95 | 2,55 | 3 |

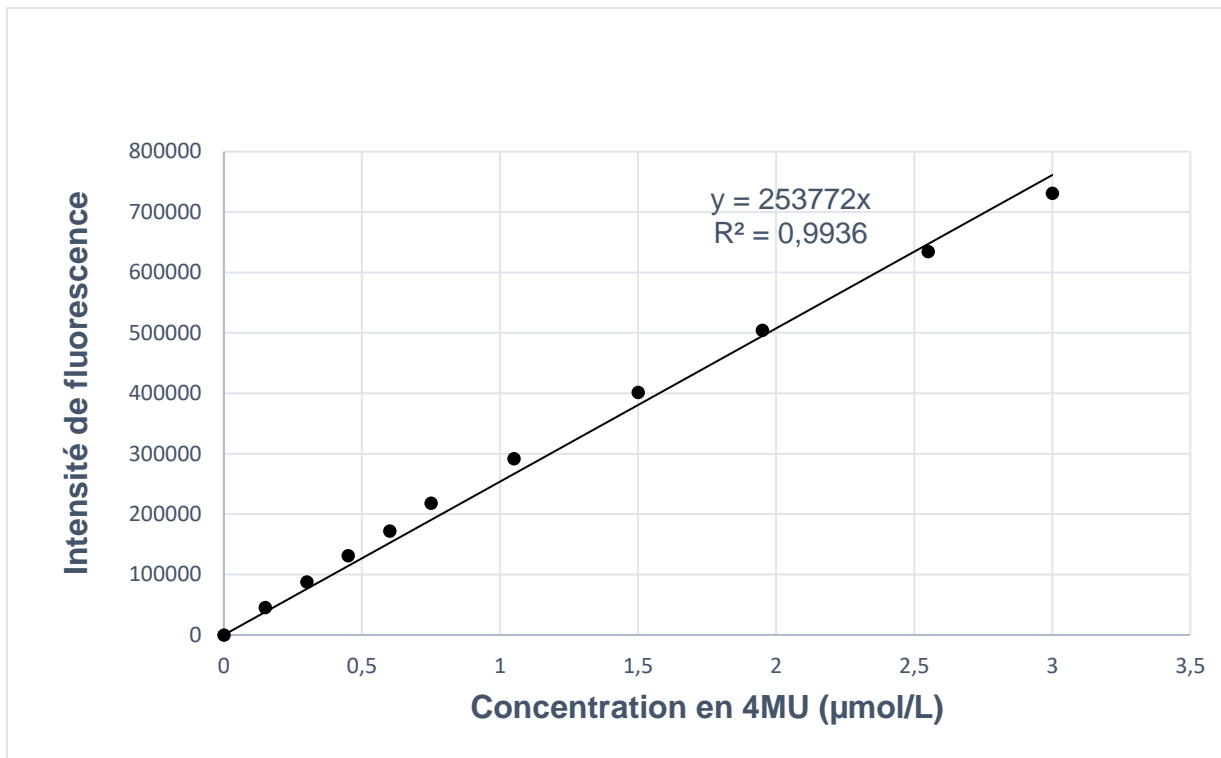


Figure 10 : Graphique présentant la nouvelle gamme de calibration de 4-MU

La Figure 10 présente la nouvelle gamme de calibration de 4-MU et sa courbe de tendance.

En pratique au laboratoire, nous réalisons une gamme de 4-MU par jour. Elle est acceptée si son coefficient de détermination (R^2) est supérieur à 0.990. Le coefficient directeur de la droite de tendance est suivi dans un logiciel de suivi des contrôles qualité (Unity Real Time, Biorad). Ce logiciel permet de suivre la pente des gammes de calibration de 4-MU et de mettre en évidence les dérives éventuelles.

Afin de valider définitivement la nouvelle gamme de 4-MU, nous avons comparé sa pente à celle des deux anciennes gammes (Figure 11).

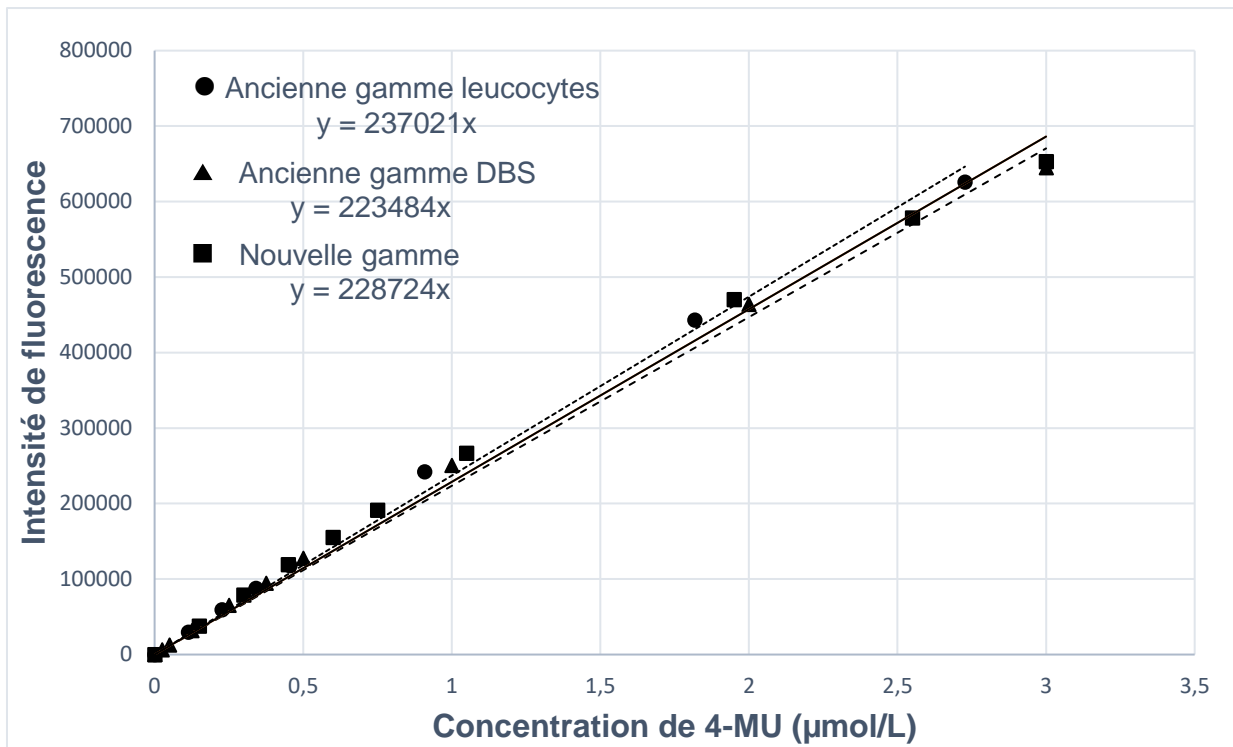


Figure 11 : Graphique montrant la comparaison des 3 gammes de 4-MU

Les carrés correspondent aux points de la nouvelle gamme de 4-MU. La droite discontinue définit sa droite de tendance.

Les triangles correspondent aux points de l'ancienne gamme DBS de 4-MU. La droite en trait plein définit sa droite de tendance.

Les cercles correspondent aux points de l'ancienne gamme leucocytes de 4-MU. La droite en pointillés définit sa droite de tendance.

La Figure 11 présente les 3 gammes de 4-MU (sans la partie non linéaire des anciennes gammes au-delà de 3 µmol/L). Les pentes des différentes courbes de tendance ont été affichées sur le graphique. Nous concluons que les 3 gammes sont semblables et nous validons le passage vers l'unique gamme de 4-MU pour l'ensemble des techniques (leucocytaires et sur DBS).

2 Optimisation de la mesure de l'activité enzymatique leucocytaire de la NAGLU

Le laboratoire utilisait jusqu'à présent un protocole de dosage de l'activité enzymatique leucocytaire de la NAGLU proposé par le laboratoire Moscerdam (44) (Tableau 28 et 29). L'objectif est de tester si les conditions proposées par ce protocole sont optimales pour ce dosage.

Tableau 28 : Réactifs nécessaires pour le protocole Moscerdam

| Réactifs | Caractéristiques | |
|------------------------|--|-----------------------------------|
| Substrat | 4-Methylumbelliferyl N-acétyl-alpha-D-glucosamine | Concentration : 0,25 mM |
| Tampon substrat | Tampon phosphate-citrate (Na ₂ HPO ₄ 0,2 M ; acide citrique 0,1 M) | pH 4,7 |
| Tampon d'arrêt | Tampon carbonate (NaHCO ₃ 0,35 M ; Na ₂ CO ₃ 0,15 M) | pH 10,7 |

Tableau 29 : Déroulement du protocole Moscerdam

| | Dosage Blanc | Dosage patient |
|---|--------------|----------------|
| BSA | 10 µL | - |
| Suspension de l'homogénat leucocytaire | - | 10 µL |
| Substrat reconstitué | 20 µL | 20 µL |
| Incubation 17h à 37 °C | | |
| Tampon d'arrêt | 200 µL | 200 µL |
| Prélever 200 µL puis les mettre en puits | | |
| Lecture de fluorescence (355-460 nm) | | |

2.1 Choix du tampon d'arrêt

Le tampon d'arrêt est un tampon fortement alcalin qui a pour but de stopper la réaction enzymatique et d'exacerber la fluorescence. Les enzymes lysosomales fonctionnent

habituellement en milieu acide, l'ajout de ce tampon alcalin bloque la réaction. Ce tampon est également utilisé pour réaliser la gamme de calibration de 4-MU.

Dans un but d'uniformisation des réactifs du laboratoire, une comparaison entre le tampon d'arrêt proposé par le protocole Moscerdam (Tampon carbonate, NaHCO_3 0,35 M ; Na_2CO_3 0,15 M pH 10,7) et le tampon d'arrêt (Tampon Glycine-NaOH, 1 M, pH 10,5) utilisé majoritairement au laboratoire. De plus, le tampon glycine est beaucoup plus simple à réaliser que le tampon carbonate.

Afin d'étudier si le choix du tampon d'arrêt influence les résultats d'activité enzymatique de la NAGLU, des dosages d'activité leucocytaire ont été réalisés selon le protocole Moscerdam en utilisant en parallèle soit le tampon carbonate (NaHCO_3 0,35 M ; Na_2CO_3 0,15 M ; pH 10,7) soit le tampon glycine (1 M pH 10,5) (Figure 12).

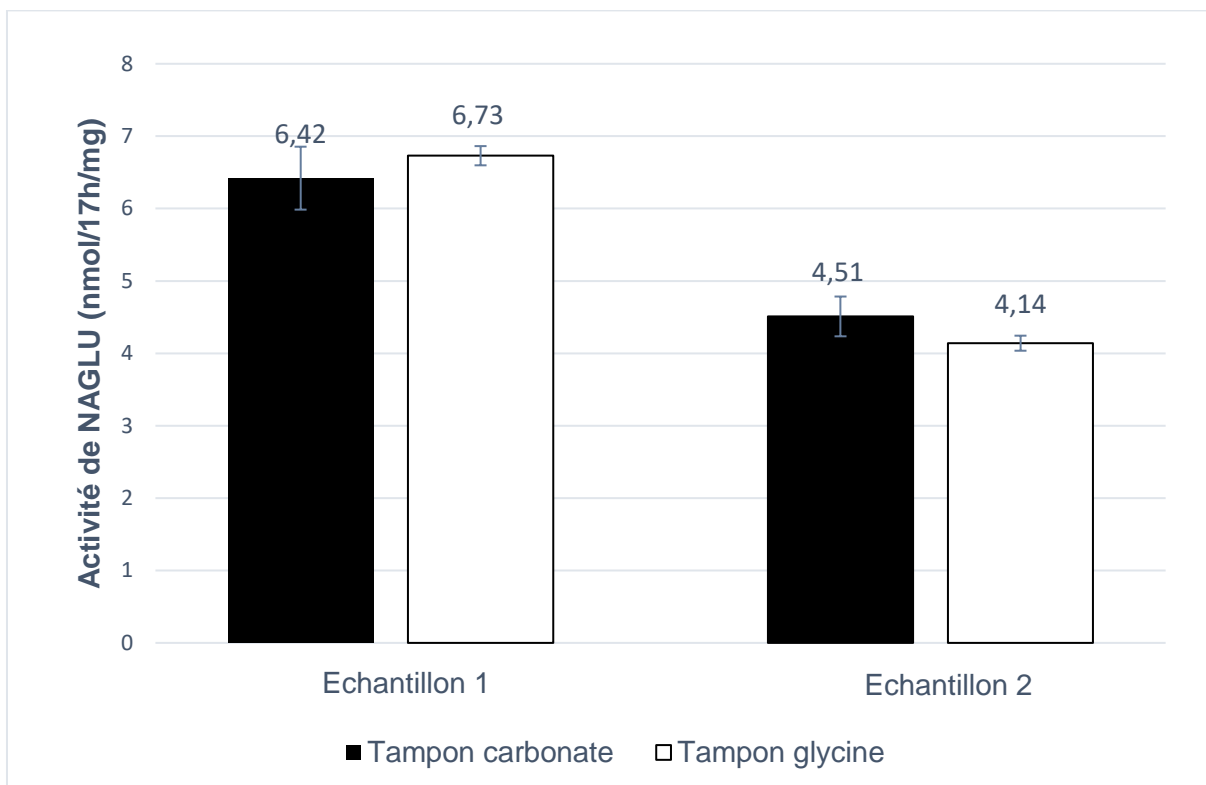


Figure 12 : Effet du tampon d'arrêt sur l'activité enzymatique de la NAGLU de 2 échantillons

Les valeurs d'activité ont été obtenues grâce à une gamme de calibration réalisée à base de 4-MU diluée dans le tampon d'arrêt correspondant.

Les résultats montrent que le choix du tampon d'arrêt ne fait pas varier de façon significative le résultat de l'activité enzymatique. Cela est cohérent car les deux tampons étudiés ont un pH fortement alcalin (pH 10,7 et 10,5), ils exercent donc la même action.

Nous avons également comparé les résultats de fluorescence des deux gammes de calibration de 4-MU réalisées avec chacun des tampons d'arrêt (Figure 13).

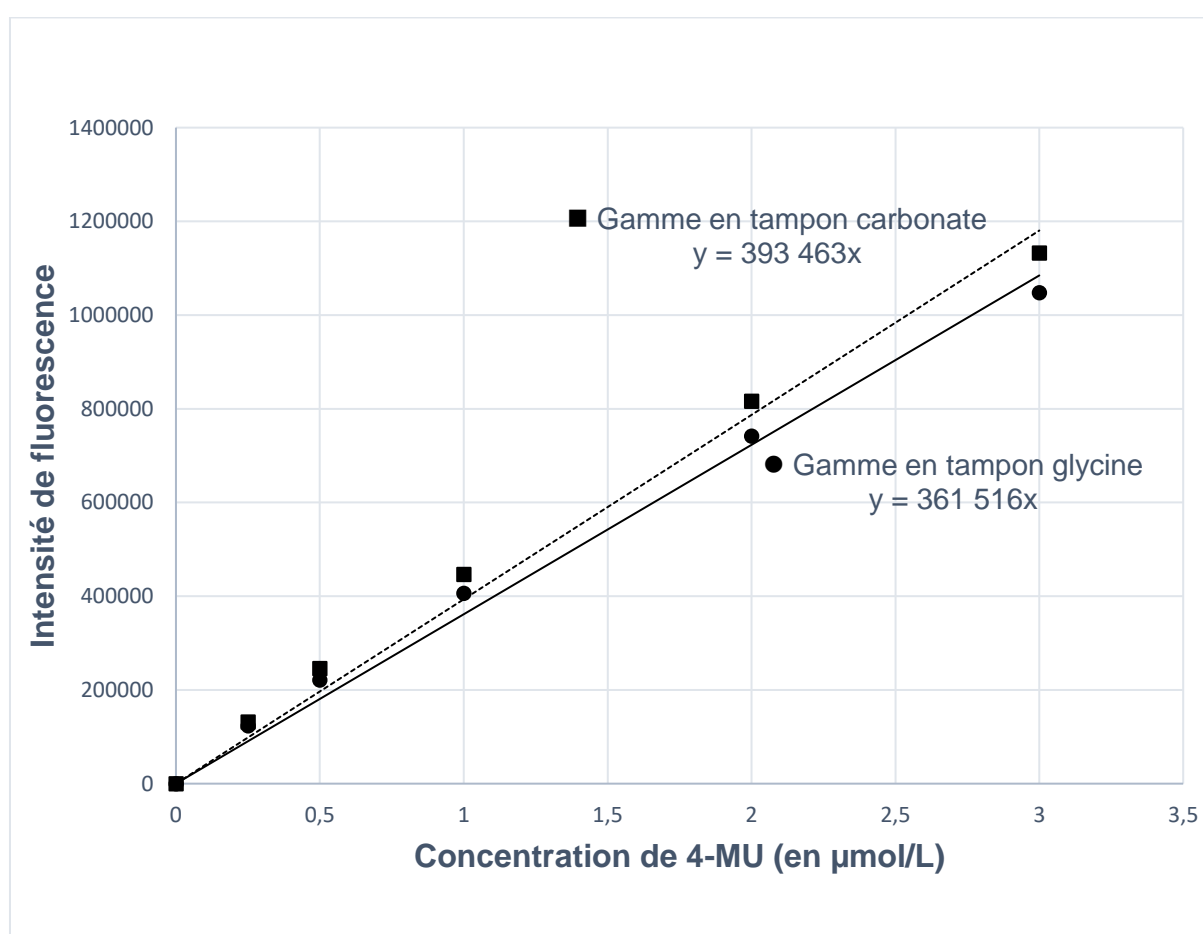


Figure 13 : Graphique comparant une gamme de 4-MU en tampon glycine et en tampon carbonate

Les carrés correspondent aux points de la gamme de 4-MU en tampon carbonate (Na_2CO_3 0,35 M ; NaHCO_3 0,15 M ; pH 10,7). La droite en pointillés définit sa droite de tendance.

Les cercles correspondent aux points de la gamme de 4-MU en tampon glycine (1 M, pH 10,5). La droite en trait plein définit sa droite de tendance.

Nous observons que la pente des deux gammes sont sensiblement semblables.

Au vu de la comparaison des gammes de calibration et des résultats de 2 témoins, nous concluons que le tampon glycine ne change pas la pente de la gamme de calibration et donc la mesure d'activité de la NAGLU par rapport au tampon carbonate.

Le tampon glycine (1 M, pH 10,5) est retenu, les réactions enzymatiques dosées sur leucocytes et DBS seront donc arrêtées avec ce tampon et les gammes de 4-MU seront également effectuées avec ce même tampon.

2.2 Choix du tampon substrat

Le tampon substrat est le tampon dans lequel le substrat est reconstitué. Sa nature et son pH conditionnent l'activité de l'enzyme. Il faut se rapprocher au plus près du pH optimal de l'enzyme. Le protocole de Moscerdam (44) propose un tampon citrate-phosphate (Na_2HPO_4 0,2 M ; acide citrique 0,1 M) à pH 4,7.

Le but de cette étape est de déterminer quelle nature de tampon substrat et quel pH sont les plus adaptés pour le dosage de la NAGLU leucocytaire. Pour cela, nous avons comparé deux tampons : le tampon citrate-phosphate et le tampon acétate (testés aussi dans la technique DBS) à différents pH (Figure 14 et 15). Nous avons réalisé le dosage de la NAGLU leucocytaire sur deux échantillons (1 et 2) en reconstituant le substrat parallèlement dans les deux tampons et à des pH différents.

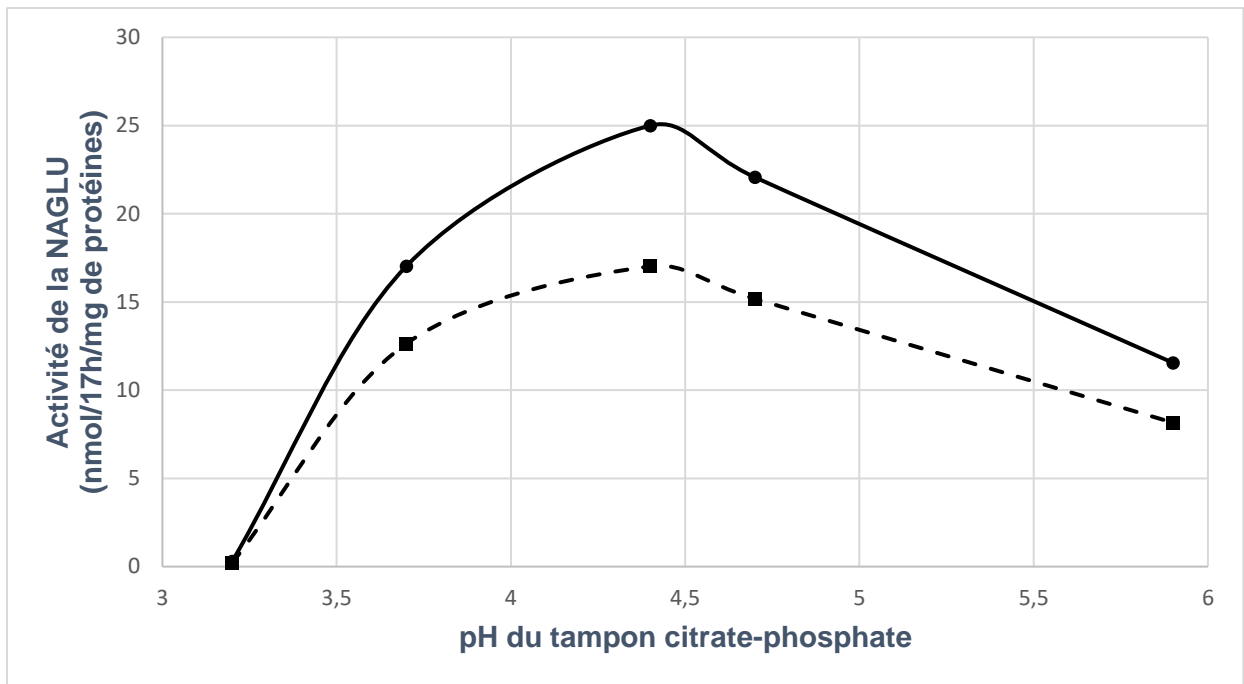


Figure 14 : Effet du pH du tampon citrate-phosphate sur l'activité de la NAGLU en leucocytes

Les courbes correspondent à la variation d'activité de la NAGLU leucocytaire due à l'effet du pH du tampon citrate phosphate pour l'échantillon 1 (courbe pleine) et pour l'échantillon 2 (courbe en pointillés).

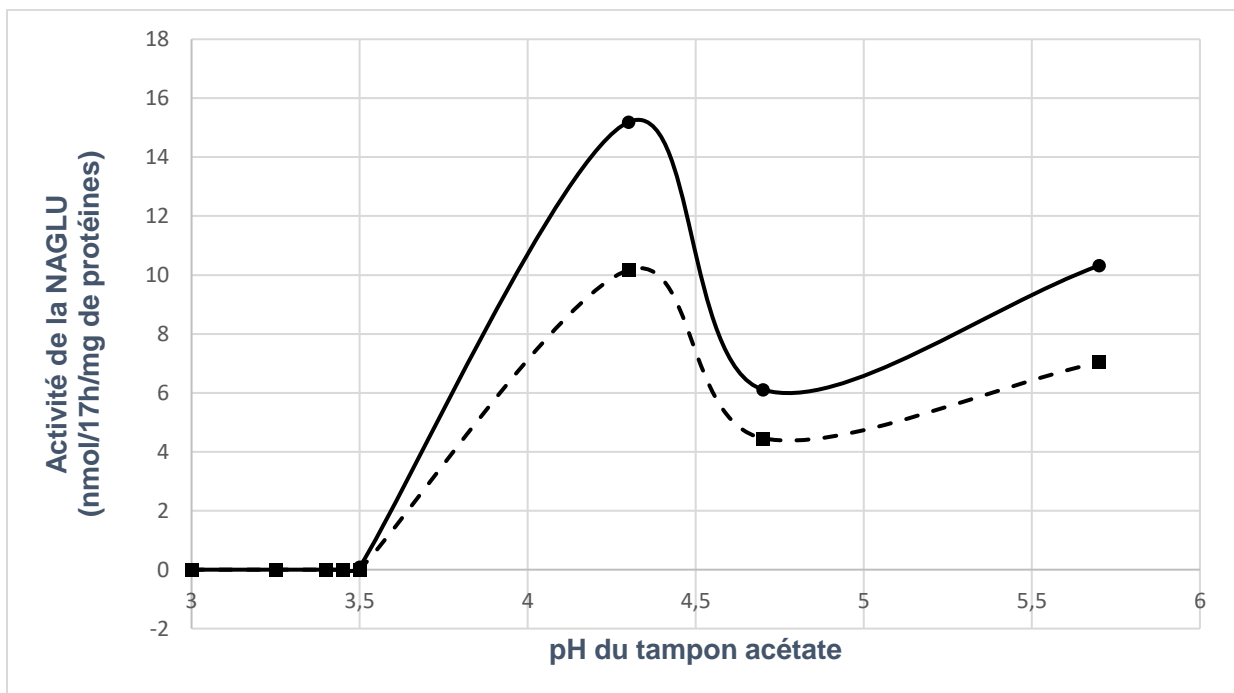


Figure 15 : Effet du pH du tampon acétate sur l'activité de la NAGLU sur leucocytes

Les courbes correspondent à la variation d'activité de la NAGLU leucocytaire due à l'effet du pH du tampon acétate pour l'échantillon 1 (courbe pleine) et pour l'échantillon 2 (courbe en pointillés).

L'activité optimale de la NAGLU en tampon acétate présente un pic étroit au pH 4,3. Une variation minime du pH pourrait modifier de façon importante l'activité enzymatique mesurée. Parallèlement, l'activité de la NAGLU en tampon citrate-phosphate augmente de manière plus régulière jusqu'à un maximum à pH 4,4. Cette nature de tampon semble présenter la plus faible variation d'activité lors d'une variation de pH. De plus, les activités enzymatiques mesurées en tampon citrate-phosphate sont plus élevées : un maximum à 25 nmol/17h/mg en tampon citrate-phosphate (Na_2HPO_4 88,8 mM ; acide citrique 55,6 mM) à pH 4,4 contre 15,2 nmol/17h/mg en tampon acétate (0,3 M) à pH 4,3 pour l'échantillon 1.

Le tampon citrate-phosphate (Na_2HPO_4 88,8 mM ; acide citrique 55,6 mM) à pH 4,4 est donc validé pour le dosage d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire.

2.3 Choix de la concentration en substrat

La concentration en substrat est un élément déterminant en enzymologie notamment dans le rapport entre la concentration en enzyme et celle en substrat. Pour déterminer la concentration en substrat optimale pour une réaction enzymatique, il faut déterminer la constante de Michaelis-Menten ou K_m de la NAGLU pour son substrat. Le K_m reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Il correspond également à la concentration en substrat dans le milieu réactionnel nécessaire afin d'obtenir une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maximale (V_{\max}). Plus le K_m est élevé, plus il faut de substrat pour atteindre la moitié de la V_{\max} et donc moins l'enzyme est affine pour son substrat.

La mesure de K_m consiste à réaliser plusieurs dosages d'un même échantillon en variant la concentration en substrat dans le milieu réactionnel.

12 concentrations en substrat allant de 0,03 à 1,67 mM ont été testées (Figure 16).

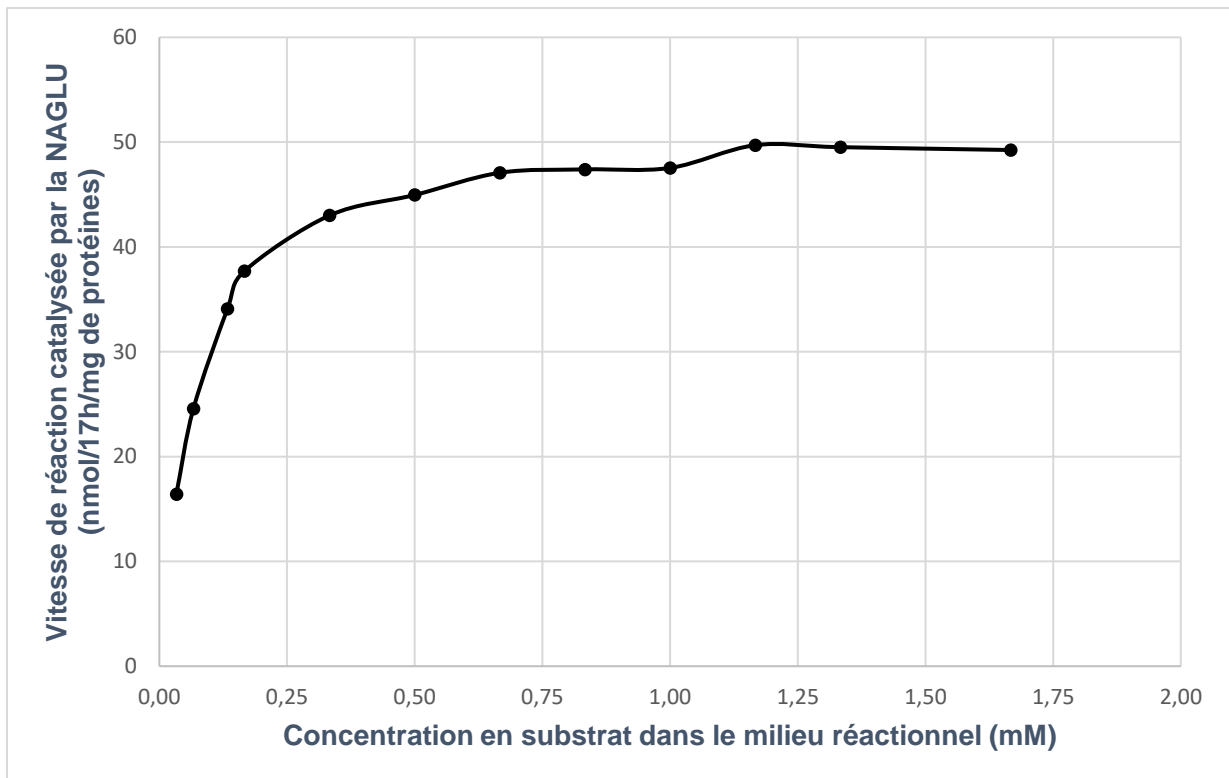


Figure 16 : Détermination expérimentale K_m de la NAGLU pour son substrat pour la technique leucocytaire

L'interprétation des résultats obtenus par la représentation de Lineweaver-Burk permet de déterminer précisément le K_m et la V_{max} de la réaction.

$$\text{Equation de Lineweaver-Burk : } \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

V est la vitesse de la réaction enzymatique, K_m est la constante de Michaelis-Menten, V_{max} est la vitesse maximale de la réaction enzymatique et S est la concentration en substrat.

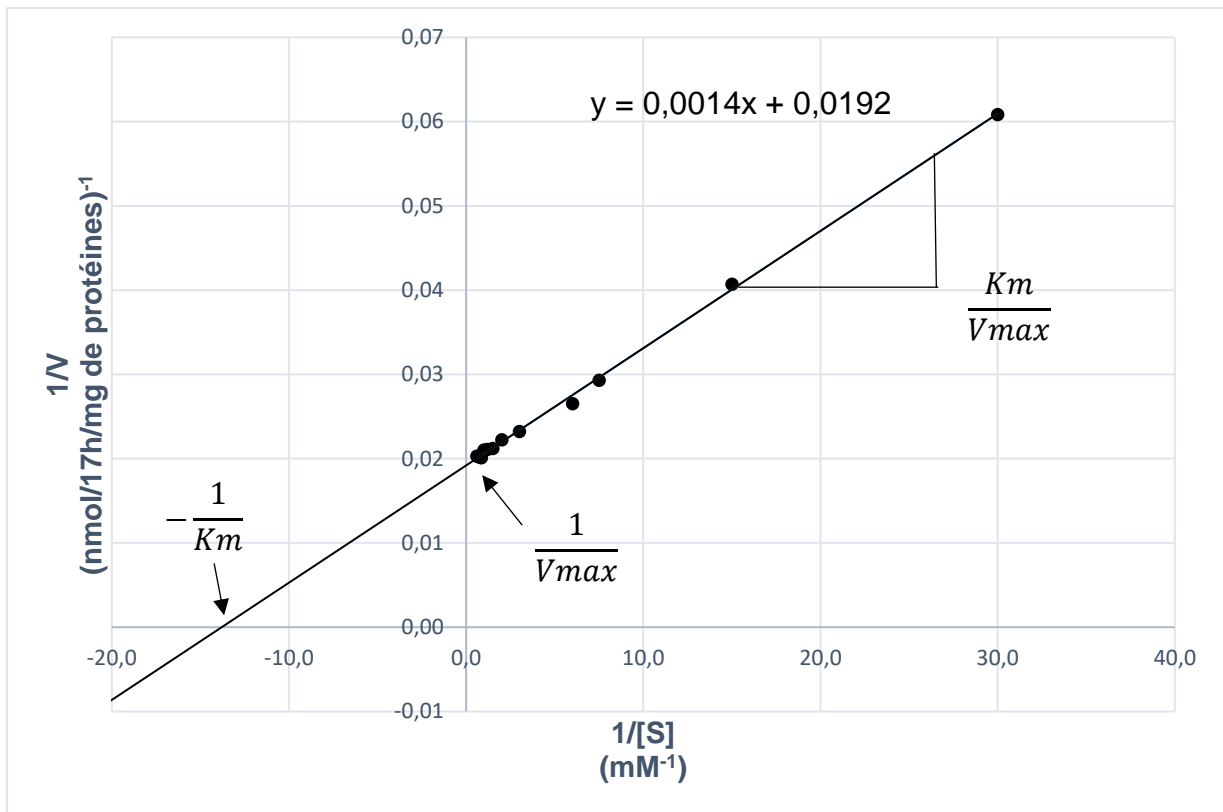


Figure 17 : Représentation de Lineweaver-Burk de la technique leucocytaire

Grâce à l'équation de Lineweaver-Burk et sa représentation (Figure 17), les paramètres cinétiques de l'enzyme, K_m et V_{max} , ont été déterminés : $K_m = 0,073 \text{ mM}$ et $V_{max} = 52,08 \text{ nmol/17h/mg}$.

Pour mesurer une activité enzymatique, il faut que le substrat soit en excès par rapport à l'enzyme afin que sa concentration ne soit pas limitante dans la réaction. En enzymologie, il est admis que le substrat est en excès lorsque sa concentration représente 10 fois le K_m . Pour le dosage de l'activité de la NAGLU leucocytaire, il faut donc une concentration en substrat dans le milieu réactionnel de 0,73 mM. Au vu de la dilution au 2/3 du substrat dans le milieu réactionnel par l'adjonction de l'échantillon, nous choisissons d'ajouter le substrat à 1 mM.

La concentration de substrat pour le dosage de l'activité de la NAGLU leucocytaire est donc fixée à 1 mM.

2.4 Choix du temps d'incubation

Les valeurs de fluorescence obtenues lors du dosage de certains échantillons de patients étaient supérieures à la limite de linéarité du fluorimètre (727 000 unités de fluorescence). Afin d'éviter ce problème, le temps d'incubation de la réaction a été diminué de 17h à 5h (Tableau 30).

Tableau 30 : Dosage de la NAGLU leucocytaire d'un échantillon à deux temps d'incubation différents

| Temps d'incubation | 17 h | 5 h |
|---|------------------|-----------------|
| Intensité de fluorescence du dosage de la NAGLU leucocytaire | 810 362 | 297638 |
| Activité de la NAGLU leucocytaire | 55,3 nmol/17h/mg | 25,5 nmol/5h/mg |

Cette réduction du temps d'incubation nous a permis d'obtenir des valeurs de fluorescence comprises dans l'étendue de mesure linéaire du fluorimètre.

Le temps d'incubation du dosage de l'activité de la NAGLU leucocytaire retenu est de 5h.

2.5 Synthèse : Mode opératoire de la mesure d'activité de la NAGLU leucocytaire

Les différents paramètres clés du dosage de l'activité de la NAGLU leucocytaire ont été déterminés. Le tableau 31 présente un résumé du mode opératoire de cette technique qui a été optimisée.

Tableau 31 : Mode opératoire du dosage optimisé de la NAGLU leucocytaire

| | Dosage Blanc x 1 | Dosage patient x 3 | Dosage témoin x 3 |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| BSA (0,2 %) | 10 µL | - | - |
| Suspension leucocytaire | - | 10 µL | 10 µL |
| Substrat reconstitué dans un tampon citrate-phosphate (Na₂HPO₄ 88,8 mM ; acide citrique 55,6 mM), pH 4,4 à une concentration de 1 mM | 20 µL | 20 µL | 20 µL |
| Incubation 5h à 37 °C | | | |
| Tampon d'arrêt glycine (1 M, pH 10,5) | 200 µL | 200 µL | 200 µL |
| Prélever 200 µL puis les mettre en puits | | | |
| Lecture de fluorescence (355-460 nm) | | | |

Le dosage blanc permet de s'affranchir du bruit de fond généré par les réactifs et de s'assurer de l'intégrité du substrat. Son intensité de fluorescence est soustraite à celle du dosage des échantillons de patient et du témoin.

Lors de la mesure de l'activité enzymatique, des dosages contrôles sont effectués en parallèle.

L'activité enzymatique est dosée en triplicata pour les patients, la moyenne des trois résultats est rendue lorsque l'écart moyen entre ceux-ci est inférieur à 10 %.

L'intégrité du prélèvement est contrôlée en réalisant le dosage d'une autre enzyme appelée enzyme témoin sur ce même prélèvement. L'activité de cette enzyme témoin doit être dans les valeurs de référence afin de valider l'analyse. Dans le cas du bilan MPS III, les 4 enzymes des 4 sous-types servent de témoins entre elles.

Afin de s'assurer de l'intégrité des réactifs, nous insérons dans chaque série un échantillon témoin traité de la même façon que l'échantillon du patient. Ce témoin provient de l'EFS et

est considéré comme sain. Les résultats de cet échantillon témoin doivent être compris dans les valeurs de référence afin de pouvoir valider l'analyse.

Pour résumer, pour valider cette analyse, il faut que les résultats obtenus en triplicata soient semblables et que l'activité de l'enzyme témoin et du témoin EFS soient normales (Tableau 32).

Tableau 32 : Tableau récapitulatif des contrôles pour le dosage de l'activité NAGLU sur culot leucocytaire

| | | | |
|------------------------|---|--|--|
| Contrôles | Dosage de l'activité de la NAGLU du patient en triplicata | Dosage de l'activité d'une enzyme témoin du patient | Dosage de l'activité de la NAGLU d'un échantillon témoin sain |
| Interprétations | Répétabilité des résultats | Intégrité de l'échantillon du patient | Validation des réactifs et de la technique |

Un résultat anormal d'un de ces contrôles doit faire reconsidérer la série et une éventuelle nouvelle analyse sera nécessaire.

3 Mise au point de la technique de dosage de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS

Les publications présentant un protocole pour le dosage de l'activité de la NAGLU sur DBS sont très rares car très peu de laboratoires ont développé cette technique sur DBS. Afin de développer cette technique, nous sommes partis de la publication de Civallero *et al.* intitulé « *Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases* » (45). Cet article présente différents protocoles permettant de mesurer l'activité sur DBS de 12 enzymes impliquées dans des maladies de surcharge lysosomale. Le Tableau 33 présente les réactifs utilisés dans cette étude et le Tableau 34 présente le protocole proposé par les auteurs pour le dosage de l'activité de la NAGLU sur goutte de sang séché.

Tableau 33 : Réactifs nécessaires pour le protocole de dosage de la NAGLU sur DBS proposé par Civallero et al.

(D'après (45))

| Réactifs | Caractéristiques | |
|----------------------------|---|---------|
| Substrat | 4-Methylumbelliferyl N-acétyl-alpha-D-glucosamine | 2 mM |
| Reconstitution du substrat | Dans de l'eau distillée | |
| Tampon d'élution | Tampon acétate (0,2 M) | pH 4,3 |
| Tampon d'arrêt | Tampon glycine (1 M) | pH 10,5 |

Tableau 34 : Déroulement du protocole de dosage de la NAGLU sur DBS de Civallero *et al*

(D'après (45))

| | Dosage patient |
|--|--|
| Elution d'un punch de 3 mm de diamètre | Dans 50 µL d'eau + 25 µL de tampon acétate |
| Ajout du substrat reconstitué | 25 µL |
| Incubation 20 h à 37 °C | |
| Tampon d'arrêt | 1 mL |
| Prélever le surnageant puis mettre en puits | |
| Lecture de fluorescence (355-460 nm) | |

L'objectif est de tester tous les paramètres clés de la réaction afin d'évaluer si cette technique proposée est optimale.

3.1 Choix du tampon d'arrêt

Dans un but d'uniformisation de nos techniques, nous utiliserons le même tampon d'arrêt que la technique leucocytaire : tampon glycine (1 M à pH 10,5).

3.2 Choix du tampon substrat

Le protocole de Civallero *et al.* propose d'éluer le DBS dans de l'eau distillée et du tampon acétate (0,2 M, pH 4,3) et de reconstituer le substrat dans de l'eau distillée. Nous décidons de reconstituer directement le substrat dans un tampon à pH acide afin qu'il soit déjà dans des conditions de pH optimal pour la réaction enzymatique, comme cela a été réalisé pour le dosage sur leucocytes.

Pour cela, nous réalisons le dosage selon la technique de Civallero *et al.* sur deux échantillons en ayant reconstitué le substrat dans deux tampons et à des pH différents. Nous utilisons un tampon citrate-phosphate et un tampon acétate à différents pH (de 3,1 à 5,5) (Figures 18 et 19).

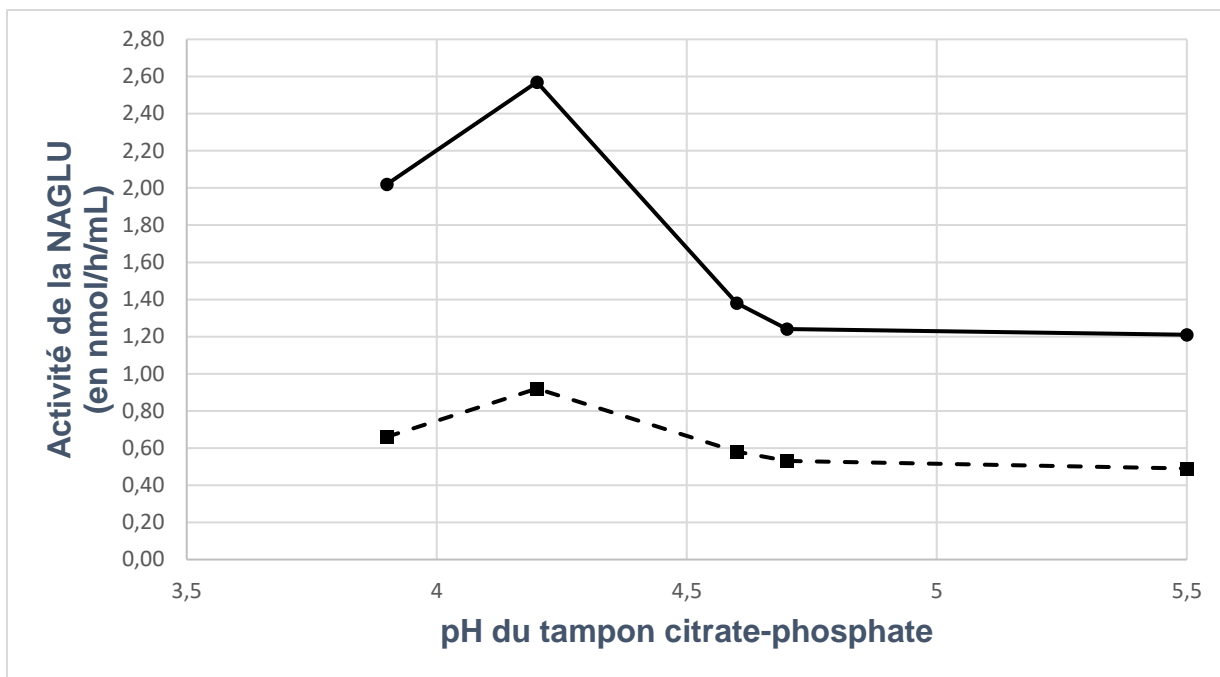


Figure 18 : Effet du pH du tampon citrate-phosphate sur l'activité de la NAGLU en DBS

Les courbes correspondent à la variation d'activité de la NAGLU en DBS en fonction du pH du tampon citrate-phosphate, pour l'échantillon 1 (courbe pleine) et pour l'échantillon 2 (courbe en pointillés).

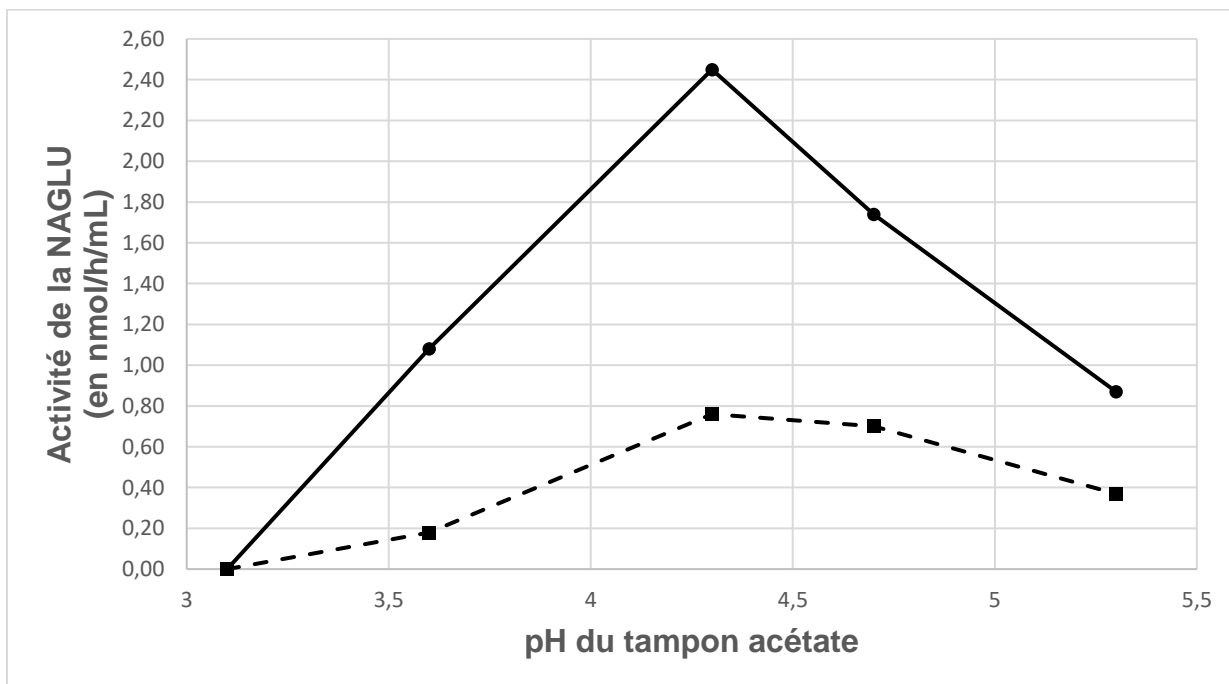


Figure 19 : Effet du pH du tampon acétate sur l'activité de la NAGLU en DBS

Les courbes correspondent à la variation d'activité de la NAGLU en DBS en fonction du pH du tampon acétate pour l'échantillon 1 (courbe pleine) et pour l'échantillon 2 (courbe en pointillés).

Les graphiques montrent qu'avec le tampon citrate-phosphate, le maximum d'activité est obtenu pour un pH de 4,2. Ce pH optimal est différent du pH du tampon citrate-phosphate utilisé dans la technique leucocytaire (pH 4,4), il n'est donc pas envisageable d'utiliser le même tampon substrat pour les deux techniques.

Avec le tampon acétate (0,3 M), le pH optimal est de 4,3 ce qui est cohérent avec le protocole de Civallero *et al.* Nous validons donc la reconstitution du substrat dans du tampon acétate (0,3 M) à pH 4,3.

3.3 Conditions d'élution du DBS

L'étape d'élution du DBS permet d'éluer le sang total dans le milieu réactionnel. Nous avons testé différentes conditions pour cette étape afin de déterminer la plus optimale pour le dosage. Dans la publication de Civallero *et al.*, le DBS est plongé initialement dans un mélange de tampon acétate (0,2 M ; pH 4,3) (25 µL) et d'eau (50 µL), mais ne mentionne pas de temps d'élution. Au laboratoire, nous effectuons pour d'autres techniques sur DBS, une phase d'élution de 30 min, à 37°C, dans de l'eau PPI avant l'ajout du substrat. Nous avons comparé 4 conditions différentes d'élution sur deux prélèvements provenant de témoins EFS (Tableau 35).

Tableau 35 : Test de différentes conditions d'éluion du DBS avant l'ajout du substrat

Condition A : Elution par un mélange de tampon acétate (0,3 M pH 4,3) et d'eau (protocole de Civallero *et al.*) avec 30 min d'incubation avant l'ajout du substrat.

Condition B : Elution par un mélange de tampon acétate (0,3 M pH 4,3) et d'eau (protocole de Civallero *et al.*) sans incubation avant l'ajout du substrat

Condition C : Elution de 30 min uniquement avec de l'eau pour préparation injectable (PPI) avant l'ajout du substrat

Condition D : Elution de 30 min uniquement avec du tampon acétate (0,3 M pH 4,3) avant l'ajout du substrat

| Conditions d'éluion | A | B | C | D |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| DBS | 1 punch | 1 punch | 1 punch | 1 punch |
| Tampon acétate (0,3 M pH 4,3) | 25 µL | 25 µL | - | 50 µL |
| Eau PPI | 50 µL | 50 µL | 50 µL | - |
| Température | 37 °C | | | |
| Temps d'incubation | 30 min | 0 min | 30 min | 30 min |
| Substrat | 25 µL à 2 mM | 25 µL à 2 mM | 50 µL à 1 mM | 50 µL à 1 mM |
| Concentration finale en substrat dans le milieu réactionnel | 0,5 mM | | | |

Les 4 conditions sont comparables car elles ont le même volume final ainsi que la même concentration finale en substrat.

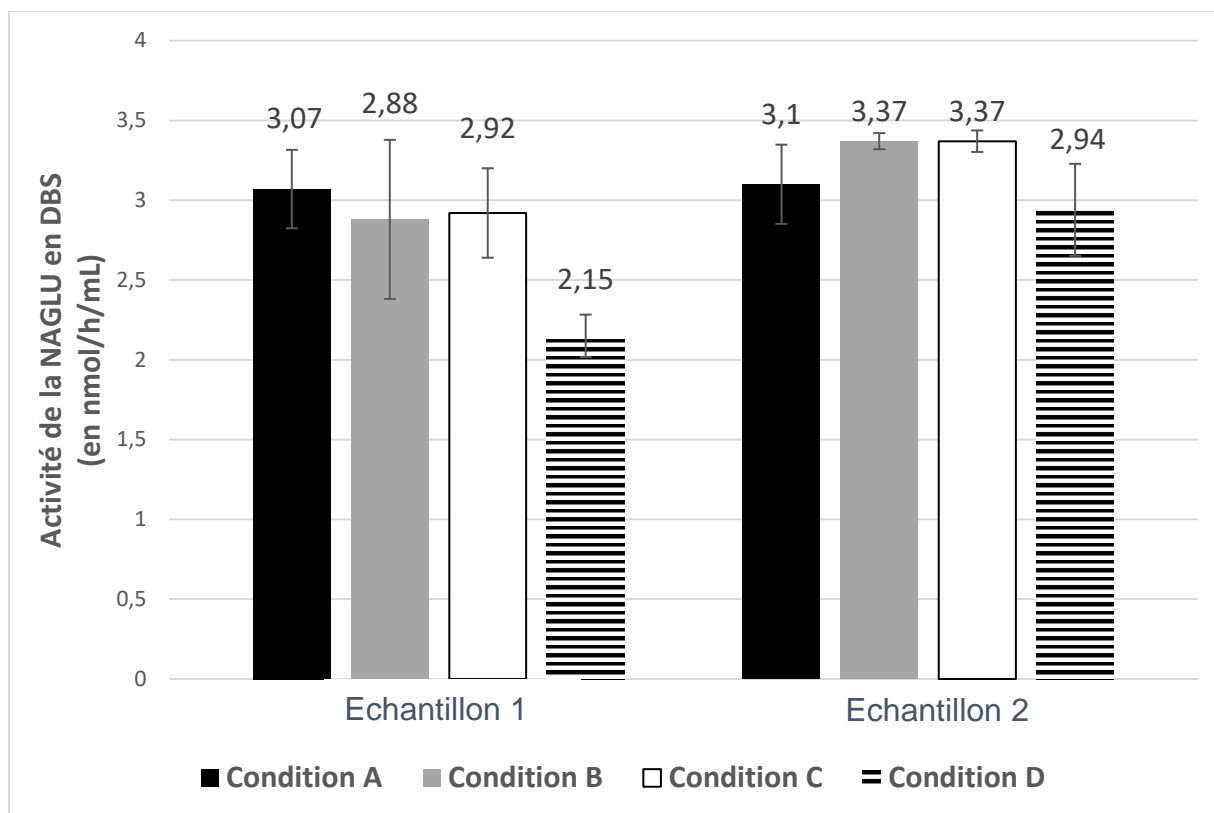


Figure 20 : Les résultats d'activité de la NAGLU dans 4 conditions d'éluion différentes

Condition A : Elution par un mélange de tampon acétate (0,3 M pH 4,3) et d'eau (protocole de Civallero *et al.*) avec 30 min d'incubation avant l'ajout du substrat.

Condition B : Elution par un mélange de tampon acétate (0,3 M pH 4,3) et d'eau (protocole de Civallero *et al.*) sans incubation avant l'ajout du substrat

Condition C : Elution de 30 min uniquement avec de l'eau pour préparation injectable (PPI) avant l'ajout du substrat

Condition D : Elution de 30 min uniquement avec du tampon acétate (0,3 M pH 4,3) avant l'ajout du substrat

Nous observons que les conditions A et B ne changent pas de façon conséquente l'activité de la NAGLU des deux témoins (Figure 20). Nous pouvons conclure qu'une phase d'incubation n'est pas indispensable pour cette technique. La condition C, c'est-à-dire l'éluion de 30 min uniquement avec de l'eau PPI n'influence pas l'activité enzymatique. En revanche, pour la condition D, la trop forte concentration en tampon acétate semble inhiber un peu la réaction enzymatique, une activité plus basse est objectivée. La condition D est

donc exclue. Afin d'être uniforme avec l'ensemble des techniques réalisées sur DBS au laboratoire, nous choisissons néanmoins de réaliser une élution de 30 minutes. Nous optons pour la condition d'élution C qui est la plus en harmonie avec les conditions d'élution des DBS des autres techniques du laboratoire car elle est la moins contraignante (utilisation uniquement d'eau PPI pour cette étape).

3.4 Choix de la concentration en substrat

Comme pour la technique leucocytaire, nous déterminons le K_m de la NAGLU sur DBS dans les conditions déterminées précédemment. Pour cela, nous réalisons le dosage d'un même échantillon avec différentes concentrations en substrat dans le milieu réactionnel. Nous testons 9 concentrations en substrats allant de 0,05 à 2,5 mM dans le milieu réactionnel (Figure 21).

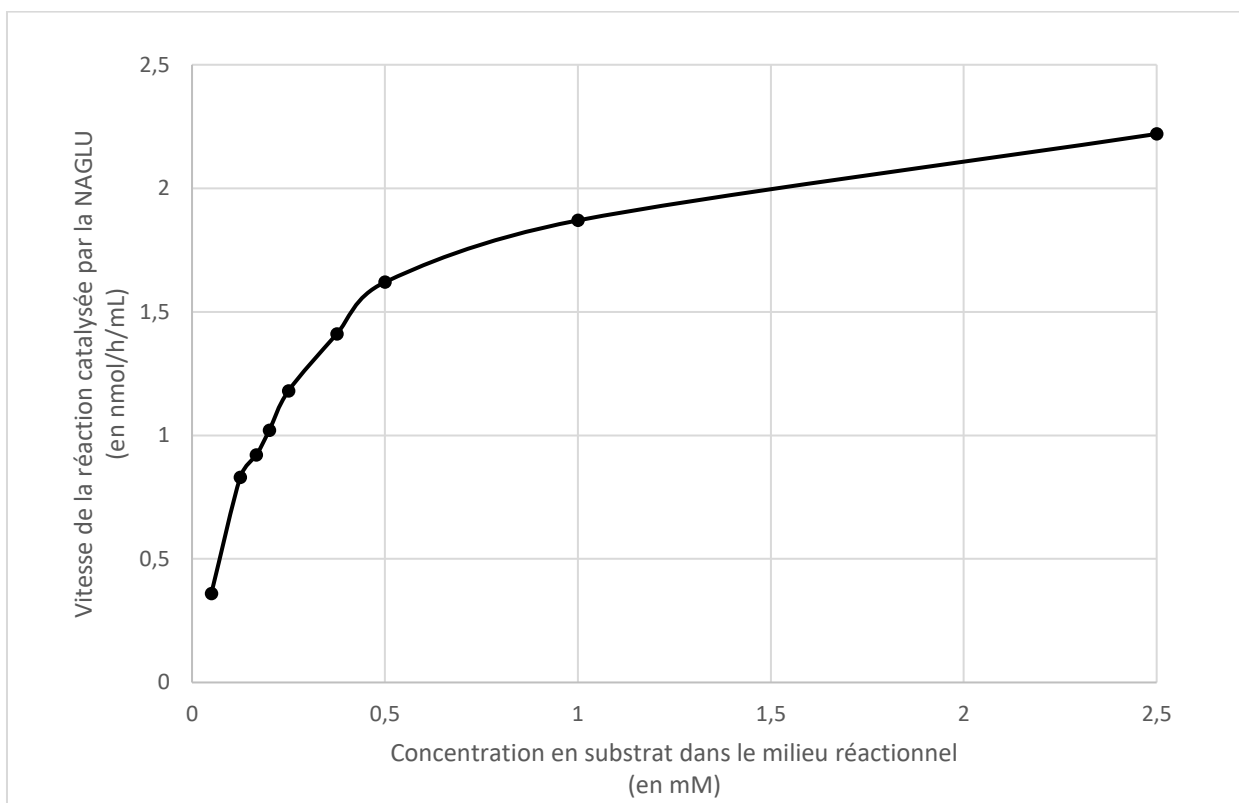


Figure 21 : Détermination expérimentale du K_m de la NAGLU pour son substrat pour la technique en DBS

L'interprétation des résultats obtenus par la représentation de Lineweaver-Burk permet de déterminer précisément le K_m et la V_{max} de la réaction (Figure 22).

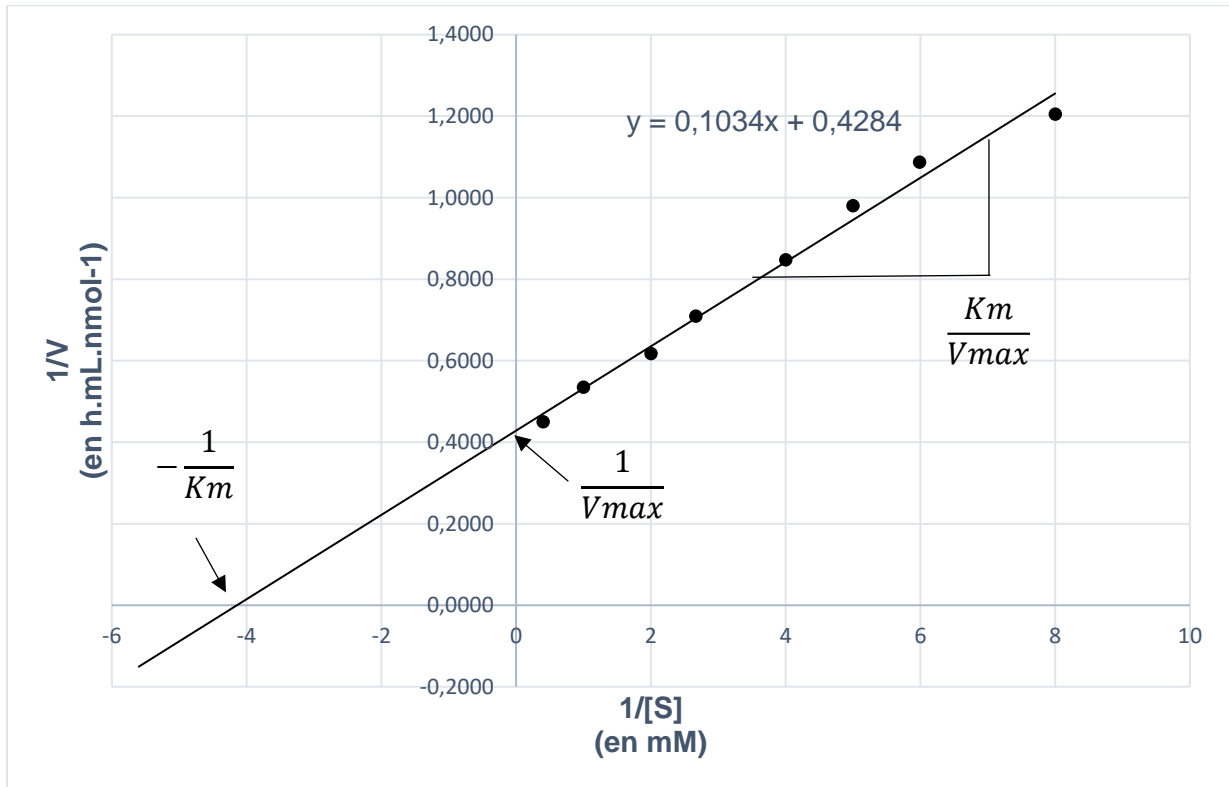


Figure 22 : Représentation de Lineweaver-Burk pour la technique DBS

Grâce à la représentation de Lineweaver-Burk et à son équation, nous obtenons un K_m de **0,24 mM** et une V_{max} de **2,33 nmol/h/mL**. Pour mesurer une activité enzymatique, il faut que le substrat soit en excès par rapport à l'enzyme afin que sa concentration ne soit pas limitante dans la réaction. En enzymologie, il est admis que le substrat est en excès lorsque sa concentration représente 10 fois le K_m . Pour le dosage de l'activité de la NAGLU leucocytaire, il faut donc une concentration en substrat dans le milieu réactionnel de 2,4 mM. Au vu de la dilution au demi du substrat dans le milieu réactionnel (50 μ L de substrat + 50 μ L d'eau pour l'élution du punch), nous choisissons d'ajouter une concentration en substrat à 5 mM.

3.5 Conditions de réalisation du DBS

Le DBS peut être réalisé selon différentes procédures : soit à partir du bout du doigt (ou du talon pour les nourrissons), soit à partir d'un tube de sang. Ces différentes conditions ont été testées afin de vérifier l'influence de la méthode de dépôt de la tâche de sang sur les résultats. Pour cela, nous avons réalisé le dosage de l'activité de la NAGLU à partir de différents prélèvements d'un même individu : un DBS réalisé à partir d'une goutte de sang au bout du doigt, un DBS réalisé à partir d'un tube EDTA et un autre réalisé à partir d'un tube héparinate de lithium (Figure 23).

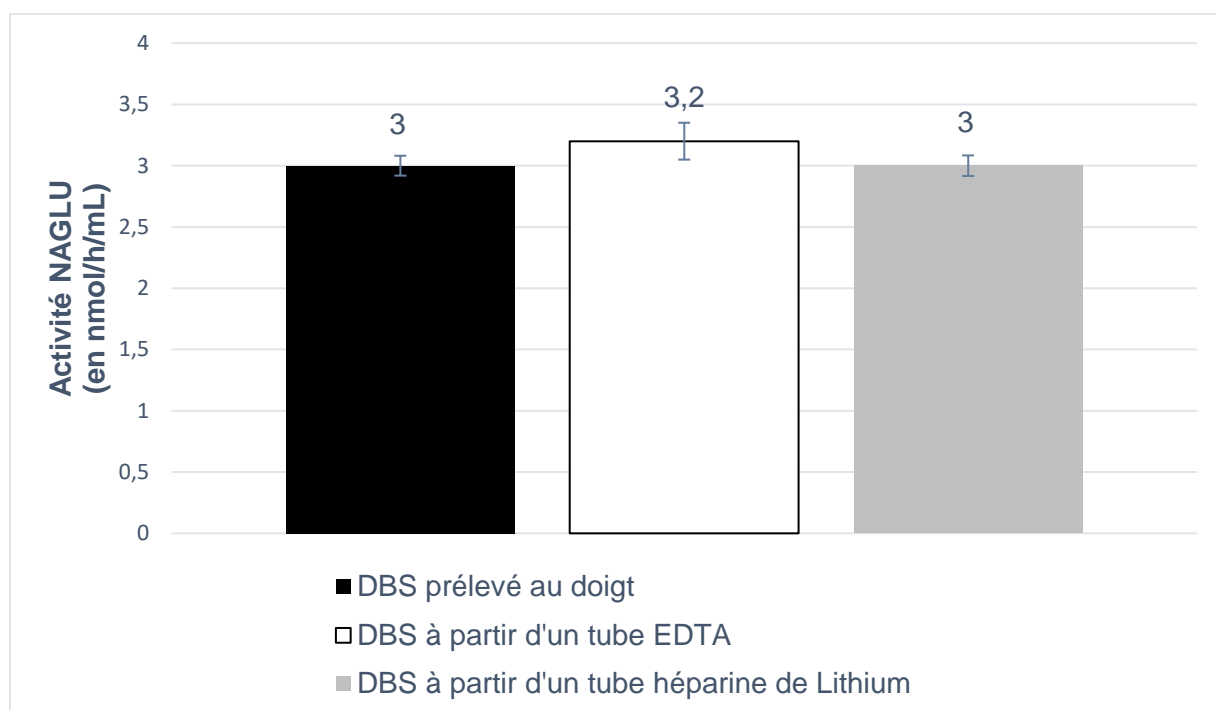


Figure 23 : Test des différentes conditions pré analytiques du DBS

Les résultats sont semblables pour les 3 conditions de dépôt de sang. Le DBS peut être soit réalisé directement au bout du doigt (ou au talon pour les nourrissons), soit à partir d'un tube EDTA ou à partir d'un tube héparine de Lithium. Pour la validation de méthode, nous avons réalisé tous les tests à partir de DBS déposés à partir de tube EDTA car c'est le tube préconisé pour la mesure d'activité enzymatique au laboratoire.

3.6 Synthèse : Mode opératoire de la mesure d'activité de la NAGLU sur goutte de sang séchée

Les différents paramètres clés du dosage de l'activité de la NAGLU sur DBS ont ensuite été déterminés. Le Tableau 36 présente un résumé du mode opératoire de cette technique que nous avons développée.

Tableau 36 : Mode opératoire du dosage optimisé de la NAGLU sur goutte de sang séchée

BR = Blanc « Réactif »

BE = Blanc « Echantillon »

| | BR | BE Patient | BE Témoin | Dosage patient x 3 | Dosage témoin x 3 |
|--|--------|------------|-----------|--------------------|-------------------|
| Punch | Vierge | Patient | Témoin | Patient | Témoin |
| Eau PPI | 50 µL | | | | |
| Elution 30 min à 37 °C | | | | | |
| Substrat en tampon acétate (0,3 M, pH 4,3) à 5 mM | 50 µL | - | - | 50 µL | 50 µL |
| Eau PPI | - | 50 µL | 50 µL | - | - |
| Incubation 20 h à 37 °C | | | | | |
| Tampon d'arrêt glycine (1 M, pH 10,5) | 100 µL | | | | |
| Prélever 175 µL puis mettre en puits | | | | | |
| Lecture de fluorescence (355-460 nm) | | | | | |

Les BR et BE permettent de s'affranchir du bruit de fond généré par l'échantillon et de vérifier l'intégrité du substrat et des réactifs. Leur intensité de fluorescence est soustraite à celle du dosage de l'échantillon du patient.

Lors de la mesure de l'activité enzymatique, nous insérons des contrôles dans le dosage afin de sécuriser l'analyse.

Comme pour la technique leucocytaire, l'échantillon du patient est dosé en triplicata et nous rendons la moyenne des trois résultats, ceux-ci doivent présenter un écart moyen inférieur à 10 % pour pouvoir valider l'analyse.

L'intégrité du prélèvement est vérifiée en réalisant le dosage d'une autre enzyme appelée enzyme témoin sur ce même prélèvement. L'activité de cette enzyme témoin doit être comprise dans les valeurs de référence. Dans le cas du bilan MPS III, les 4 enzymes des 4 sous -types sont témoins entre elles.

Afin de s'assurer de l'intégrité des réactifs, un échantillon témoin est traité de la même façon que l'échantillon du patient. Ce témoin provient de l'EFS et est considéré comme sain. Les résultats de cet échantillon témoin doivent être compris dans les valeurs de référence afin de pouvoir valider le dosage.

Pour résumer, pour valider cette analyse, il faut que les résultats obtenus en triplicata soient semblables et que l'activité de l'enzyme témoin et du témoin EFS soient normales (Tableau 37).

Tableau 37 : Tableau récapitulatif des contrôles de la réaction sur goutte de sang séchée

| | | | |
|------------------------|--|--|--|
| Contrôles | Dosage de l'activité de la NAGLU du patient en triplicata | Dosage de l'activité d'une enzyme témoin du patient | Dosage de l'activité de la NAGLU d'un échantillon témoin sain |
| Interprétations | Répétabilité des résultats | Intégrité de l'échantillon du patient | Validation des réactifs et de la technique |

Un résultat anormal d'un de ces contrôles doit faire reconsidérer la série et une éventuelle nouvelle analyse sera nécessaire.

Chapitre 2 : Validation de méthode

La mesure d'activité de la NAGLU leucocytaire et sur goutte de sang séchée sont des méthodes développées par le laboratoire. Les réactifs prêts à l'emploi n'existent pas et doivent être préparés au laboratoire. Ces techniques entrent donc dans le cadre d'une portée de type B (SH REF 08). Ces méthodes sont quantitatives et de processus complexe, composé de plusieurs sous-processus (Tableau 38).

La validation de méthode permet la confirmation que les méthodes sont utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent aux besoins des « clients » (patients/prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées par le laboratoire (SH GTA 04 Rev 01).

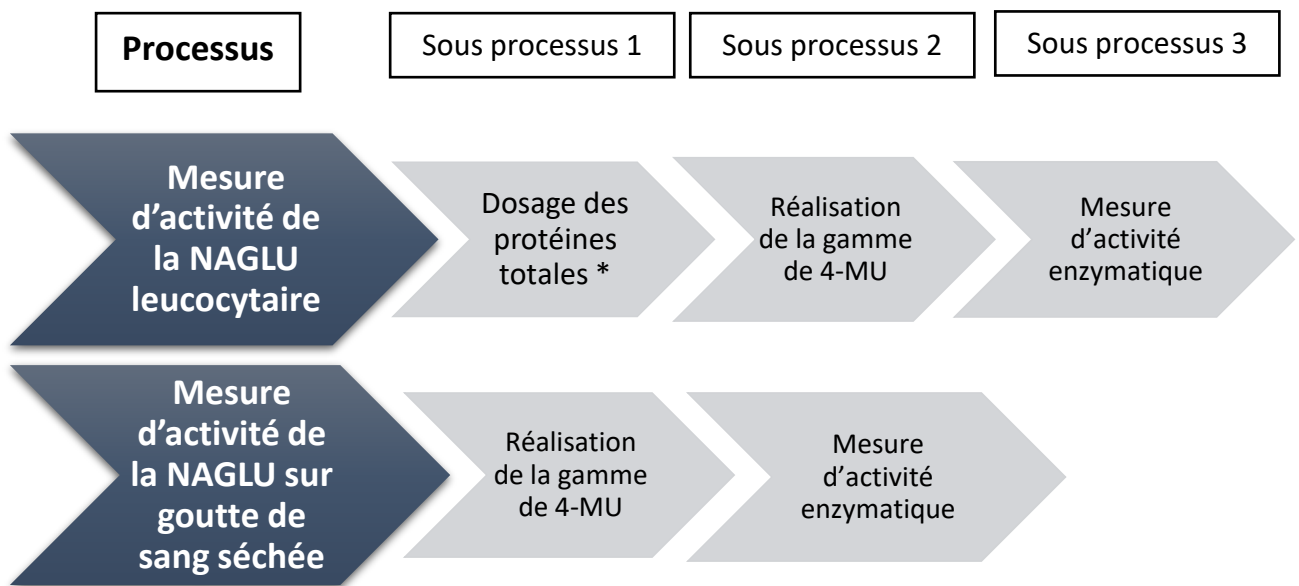


Figure 24 : Composition des processus de mesure d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire et sur DBS

* sous processus déjà accrédité COFRAC selon la norme 15189

La validation de la méthode est réalisée en suivant les recommandations du guide SH GTA 04 rév 01 pour l'accréditation d'une méthode de portée B. Il convient tout d'abord d'identifier les performances à analyser pour cette méthode de portée B et de transposer ces recommandations aux examens à valider.

Tableau 38 : Résumé des performances à évaluer lors d'une validation de méthode de portée B quantitative (selon le SH GTA 04 Rev 01)

| Selon SH GTA 04 Rev 01 | |
|--|--|
| Critères à évaluer | Validation (Portée B) Quantitatif |
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | Essai |
| Justesse/Exactitude | Essai |
| Incertitudes/facteur de variabilité et évaluation | Maitrise des facteurs de variabilité |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyse des discordances | Essai |
| Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité) | Essai |
| Interférences | Essai |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | Essai |
| Robustesse | Essai |
| Stabilité des réactifs (après ouverture, embraqués) | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | Essai |
| Limite de détection | / |
| Spécificité/sensibilité analytique | / |
| Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude de la méthode ou du système analytique | |

Nous sommes un des rares laboratoires en France à réaliser ce dosage. Il n'existe aucun contrôle de qualité interne (CIQ) commercialisé à ce jour. Pour pallier cela, le laboratoire a imaginé un système de CIQ. Une poche de sang d'un témoin sain provenant de l'EFS permet de préparer un grand nombre de culots leucocytaires et de cartons DBS. Un de ces échantillons témoins est intégré dans chacune des techniques, les résultats sont suivis dans le logiciel URT (*Unity Real Time*[®] de Biorad[™]) afin de contrôler les dérives et garantir la fiabilité de la technique et des réactifs utilisés.

Le laboratoire est inscrit à un programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour l'ensemble des maladies lysosomales. Six échantillons par an sont analysés par le laboratoire pour un panel défini de maladies lysosomales. Le programme demande l'étude enzymatique propre à dix pathologies par échantillon. La diversité des maladies lysosomales ne permet pas une évaluation annuelle de chaque pathologie. Ce programme se positionne sur des techniques sur fibroblastes. Un programme sur leucocytes à grande échelle est difficile à mettre en œuvre du fait du volume de leucocytes nécessaire pour l'ensemble des participants. Les techniques sur DBS étant en plein essor, le laboratoire est pilote pour un programme d'EEQ sur DBS.

La maladie de Sanfilippo B étant rare, nous ne disposons d'aucun échantillon de personne atteinte. Un projet serait de mettre en place un programme de comparaison inter-laboratoire permettant d'échanger des échantillons de patients avec des laboratoires français ou étrangers.

1 Validation de méthode du diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur leucocytes

1.1 Sous processus 1 : Dosage des protéines totales

Ce sous processus est déjà accrédité COFRAC selon la norme ISO 15189 au sein de l'examen « diagnostic de la maladie de Fabry sur leucocyte ».

1.2 Sous processus 2 : Gamme de 4-MU

a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « gamme 4-MU »

Tableau 39 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « gamme de 4-MU »

NA : non applicable

| Critères à évaluer | Application aux sous processus « Gamme de 4-MU » |
|--|---|
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | Essai |
| Justesse/Exactitude | NA |
| Incertitudes/facteur de variabilité et évaluation | NA |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyse des discordances | NA |
| Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité) | Essai |
| Interférences | NA |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | NA |
| Robustesse | Essai |
| Stabilité des réactifs (après ouverture, embraqués) | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | NA |
| Limite de détection | Essai |
| Spécificité/sensibilité analytique | / |
| Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude de la méthode ou du système analytique | |

Certains paramètres sont non applicables pour la validation de méthode. Nous détaillerons les raisons dans le prochain paragraphe.

b) Validation de méthode

- Répétabilité

La répétabilité est l'analyse répétée d'un même échantillon par la même technique dans les mêmes conditions (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage) et dans un délai le plus court possible.

Nous avons réalisé, dans les mêmes conditions (le même jour, par le même opérateur, avec le même lot de tampon glycine 1 M pH 10,5 et le même lot de 4-MU), plusieurs fois la même gamme de 4-MU. Nous avons testé la répétabilité de l'ancienne gamme 4-MU (à 9 points) et de la nouvelle (à 11 points). Nous avons ensuite évalué le CV des coefficients directeurs des gammes.

Tableau 40 : Répétabilité de l'ancienne et de la nouvelle gamme de 4-MU

| RÉPÉTABILITE de la gamme de 4-MU | | | | | | |
|--|------------------------------|--|---|---------------|---|-------------------|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (coefficient directeur) | Ecart-type (coefficient directeur) | CV (%) | CV (%) retenu par le laboratoire | Conclusion |
| Solution de 4-méthylumbeliférol en tampon glycine, 9 points | 5 gammes de 9 points | 201736 | 3542 | 1.8 | 10% | CV acceptable |
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 11 points | 24 gammes de 11 points | 224151 | 9559 | 4.3 | 10% | CV acceptable |

Il nous a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de répétabilité de 10 %.

Les CV de répétabilité étant inférieurs au CV limite fixé, la répétabilité des gammes de 4-MU est conforme à nos exigences.

- **Reproductibilité**

La reproductibilité ou fidélité intermédiaire est l'analyse répétée d'un même échantillon par la même technique dans des conditions différentes (opérateur, lot de réactifs, étalonnage).

Nous avons réalisé des gammes de 4-MU dans des conditions différentes (jours différents, opérateurs différents, lots de tampon glycine 1 M pH 10,5 et de 4-MU différents). Nous avons testé la reproductibilité de l'ancienne gamme de 4-MU (à 9 points) et de la nouvelle (à 11 points). Nous avons ensuite évalué le CV des coefficients directeurs des gammes.

Tableau 41 : Reproductibilité de l'ancienne et de la nouvelle gamme de 4-MU

| FIDELITE INTERMEDIAIRE de la gamme de 4MU | | | | | | |
|---|------------------------------|--|---|---------------|---|-------------------|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (coefficient directeur) | Ecart-type (coefficient directeur) | CV (%) | CV (%) retenu par le laboratoire | Conclusion |
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 9 points (ancienne gamme) | 21 | 96460 | 5274 | 5.5 | 15% | CV acceptable |
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 11 points (nouvelle gamme) | 30 | 243514 | 12675 | 5.2 | 15% | CV acceptable |

Il nous a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de reproductibilité de 15 %.

Les CV de reproductibilité étant inférieurs au CV limite, la reproductibilité des gammes de 4-MU est conforme à nos exigences.

- **Justesse**

Elle est définie comme l'écart entre la moyenne d'un nombre infini de mesures d'un même échantillon et une valeur de référence. L'écart observé correspond au biais. Ce paramètre est généralement mesuré en utilisant les CIQ externalisés.

Nous ne disposons pas de CIQ externalisé pour ce sous processus, ce paramètre est non applicable. Par ailleurs, il ne donne pas lieu à un rendu de résultat, mais ce sous processus permet de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée en combinaison d'autres sous-processus.

- **Exactitude**

L'exactitude correspond à l'écart entre une valeur mesurée d'un échantillon inconnu et la valeur cible du mesurande. Ce paramètre est généralement déterminé grâce à des programmes d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ).

Nous ne disposons pas d'EEQ pour ce sous processus, ce paramètre est non applicable.

- **Incertitude de mesure**

Selon le SH GTA 14, l'incertitude de mesure correspond à la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande. Ce paramètre aide le clinicien et le biologiste médical à comparer deux valeurs entre elles, comme dans le cas d'analyse des antécédents.

Plusieurs méthodes existent pour calculer ces incertitudes de mesure. Il faut pour cela disposer soit d'un étalonnage de référence, soit de CIQ et d'un matériau de référence, soit de CIQ et d'EEQ, soit de CIQ et d'un étalon fournisseur. Nous ne disposons pas de ces outils pour le calcul d'incertitude. Par ailleurs, ce sous processus ne donne pas lieu à un

rendu de résultat, mais il permet de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée en combinaison d'autres sous-processus.

- Variabilité inter-opérateurs

Toutes les techniques présentées dans ce travail sont manuelles et sont donc sujettes à des variations selon l'opérateur. Il est donc important de vérifier que cette variabilité inter-opérateur ne crée pas de variation significative au niveau des résultats rendus. Les 4 techniciennes du laboratoire ont réalisé chacune 9 gammes de 4-MU (Tableau 42). Nous avons évalué la variabilité inter-opérateur grâce à une étude statistique par un test Anova sur les pentes des gammes obtenues.

Tableau 42 : Variabilité inter-opérateur de la gamme 4-MU

| | Opérateur 1 | Opérateur 2 | Opérateur 3 | Opérateur 4 |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Somme des pentes | 2208715 | 2126503 | 2287930 | 2233768 |
| Moyenne des pentes | 245413 | 236278 | 254214 | 248196 |
| Variance des pentes | 37474282 | 89142312 | 478770001 | 211345124 |

La valeur F calculée est égale à 2,45. Cette valeur est inférieure au F théorique de 2,92 (obtenu dans la table de Fisher-Snedecor). L'interprétation de ces résultats par la méthode Anova montre donc que les moyennes des 4 opérateurs ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5 %.

- Effet de bord des plaques

La lecture de la gamme s'effectue en microplaques de 96 puits. Il est intéressant de vérifier qu'il n'y a pas d'effet de bord de plaque. Nous déposons un même point de la gamme de 4-MU dans tous les puits d'une plaque. Nous étudions ensuite le nombre de point dont le résultat est supérieur à la moyenne +/- 3 écarts types (M+/-3ET).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------|------------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|----|------------|
| A | | gris clair | | | | gris foncé | gris foncé | | gris clair | | | gris clair |
| B | | | | | | | gris foncé | gris clair | | | | |
| C | | gris clair | | | | | gris foncé | gris clair | | | | gris clair |
| D | | | | | | | | gris clair | gris clair | | | |
| E | | | | | | gris clair | | | | | | |
| F | | | | gris clair | | | | gris clair | | | | gris clair |
| G | | | | | | gris clair | gris foncé | gris clair | | | | |
| H | gris foncé | gris foncé | | gris clair | gris clair | | | | gris clair | | | gris clair |

Figure 25 : Etude de l'effet de bord de plaque

Cette figure représente la plaque de 96 puits.

Les puits blancs présentent une fluorescence comprise entre la moyenne de tous les puits +/- 1 écart type.

Les puits gris clairs présentent une fluorescence comprise entre [M-2ET ; M-1ET[et]M+1ET ;M+2ET]

Les puits gris foncés présentent une fluorescence comprise entre [M-3ET ; M-2ET[et]M+2ET ;M+3ET]

Il n'y a aucun point dont le résultat dépasse la moyenne +/- 3 écarts types. La dispersion est répartie de façon homogène (Figure 25). Nous n'observons aucun effet de bord de plaque pour la mesure de la fluorescence de 4MU.

- **Etendue de mesure**

L'étendue de mesure correspond à la plage de valeur à l'intérieur de laquelle la technique est fiable. Elle comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite de linéarité. Cette étendue de mesure a été déterminée dans la partie « Optimisation de la gamme de 4-MU (Chapitre 2) ».

Limite de détection (LOD) :

C'est le plus petit signal exprimé en concentration qui peut être distingué d'un blanc de réaction. Pour déterminer la LOD, nous réalisons 20 mesures de blancs, c'est-à-dire du point 0 de la gamme (contenant uniquement du tampon glycine).

$$LOD = 3 \times \text{écart type des Blancs}$$

$$\text{LOD de la gamme de 4-MU} = \mathbf{0,001 \mu\text{mol/L}}$$

Limite de quantification (LOQ) :

C'est la plus petite valeur exprimée en concentration, rendu avec un niveau de confiance acceptable. Pour déterminer la LOQ, nous réalisons 20 mesures de blancs, c'est-à-dire du point 0 de la gamme (contenant uniquement du tampon glycine).

$$LOQ = 10 \times \text{écart type des Blancs}$$

$$\text{LOQ de la gamme de 4-MU} = \mathbf{0,003 \mu\text{mol/L}}$$

Limite de linéarité :

Elle correspond à la limite de concentration de 4-MU au-delà de laquelle il n'y a plus de relation de linéarité. Elle est mesurée en diluant une suspension de 4-MU de concentration très élevée et en montrant la relation linéaire entre les dilutions effectuées et les résultats observés.

$$\text{Limite de linéarité de la gamme de 4-MU} : \mathbf{3 \mu\text{mol/L}}$$

- **Interférences**

Pour la gamme de 4-MU, nous travaillons à partir d'une solution aqueuse de 4-MU réalisée au laboratoire. Aucune interférence n'est possible.

- **Contaminations**

Le matériel utilisé est à usage unique, l'embout de la pipette est changé à chaque pipetage. Aucune contamination inter-échantillons et inter-réactifs n'est donc possible.

- Robustesse

La robustesse est la capacité d'une méthode à rester non affectée par des variations faibles, mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode. La robustesse d'une technique peut s'évaluer en divisant le CV de reproductibilité par le CV de répétabilité. Plus il est proche de 1, plus la technique est robuste. Pour la gamme 4-MU, ce rapport est de 1,2. La technique de la gamme de 4-MU semble plutôt robuste.

- Stabilité

La stabilité des réactifs et tampons utilisés dans ces dosages a été évaluée en faisant des tests à des intervalles de temps réguliers entre J0 et Jn.

Stabilité de l'aliquot de solution mère de 4-MU pour la réalisation de la gamme :

Une étude de la pente de notre ancienne gamme de 4-MU (en 9 points) sur 6 mois a été réalisée à partir d'aliquots de solution mère de 4-MU congelés à -20 °C à J0 (Figure 26).

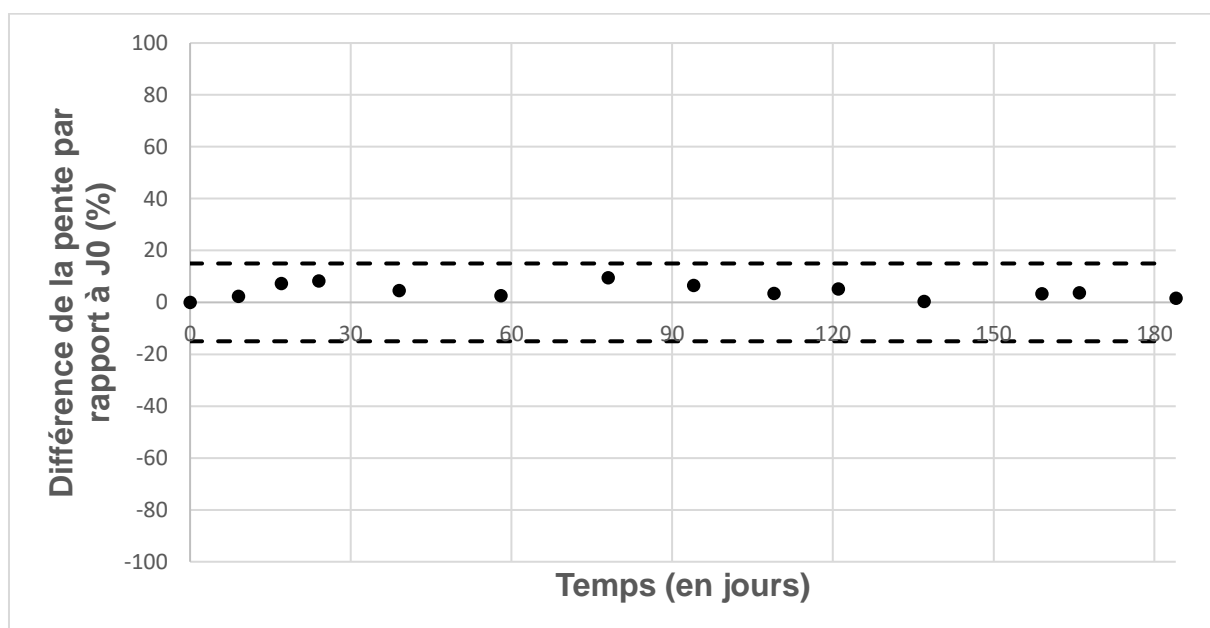


Figure 26 : Etude de stabilité de la solution mère de 4-MU

Les traits en pointillés correspondent aux seuils de +/- 15 % par rapport à la pente de référence de J0

Le seuil de +/- 15 % par rapport à la pente de la gamme à J0 a été choisi pour évaluer la stabilité de la gamme de 4-MU. Cette figure montre que la différence de la pente de la gamme sur 6 mois ne diffère pas de plus de 15 % par rapport à la pente déterminée à J0. Nous définissons ainsi que les aliquots de 4MU que nous préparons ont un délai de d'utilisation de 6 mois.

Stabilité du tampon glycine (1 M pH 10,5) :

Il est également important de suivre la stabilité du tampon glycine (1M pH 10,5) (servant dans la gamme de calibration et dans l'arrêt des techniques enzymatiques). Ce tampon est conservé à température ambiante au laboratoire. Nous avons préparé un tampon glycine (1M pH 10,5) à J0.

Cette stabilité peut être utile pour toutes les techniques stoppées par le tampon glycine, nous avons étudié cette stabilité grâce au dosage de l'alphaGalactosidase A pour le diagnostic de la maladie de Fabry. Nous comparons un dosage arrêté par un tampon glycine (1M pH 10,5) préparé à J0 avec un dosage arrêté par un tampon glycine frais du jour. Les résultats sont ensuite exprimés en écart par rapport au résultat rendu avec le tampon glycine (1M pH 10,5) frais du jour.

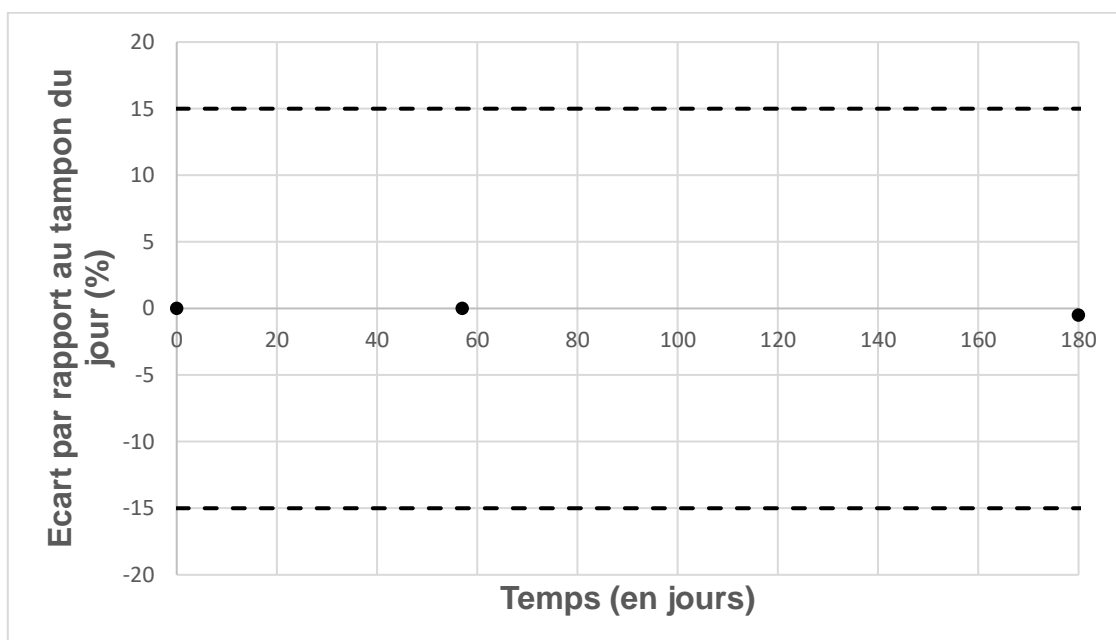


Figure 27 : Etude de la stabilité du tampon glycine

Nous avons étudié cette stabilité sur une période de 6 mois et les résultats sont compris entre les bornes de stabilité de +/- 15 % (Figure 27). Nous définissons donc que le délai de d'utilisation de notre préparation de tampon glycine (1M pH 10,5) est de 6 mois.

- **Intervalle de référence**

La gamme 4-MU ne donne pas lieu à un rendu de résultat, mais elle permet un calcul en combinaison avec un autre sous-processus, il n'y a donc pas d'intervalle de référence applicable pour ce sous processus

- **Sensibilité et spécificité**

Ces paramètres ne concernent pas la gamme 4-MU car ce n'est pas un sous processus donnant lieu à un résultat.

- **Comparaison de méthode**

Ce paramètre n'est applicable car nous ne disposons pas de méthode ou d'automate de repli.

1.3 Sous processus 3 : Mesure de l'activité de la NAGLU leucocytaire

a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire »

Tableau 43 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire »

| Critères à évaluer | Application aux sous processus « Mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire » |
|--|---|
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | Essai |
| Justesse/Exactitude | NA |
| Incertitudes/facteur de variabilité et évaluation | NA |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyse des discordances | NA |
| Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité) | Essai |
| Interférences | NA |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | Essai |
| Robustesse | Essai |
| Stabilité des réactifs (après ouverture, embraqués) | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | Essai |
| Limite de détection | Essai |
| Spécificité/sensibilité analytique | / |
| Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude de la méthode ou du système analytique | |

Certains paramètres sont non applicables pour la validation de méthode de ce sous processus, nous détaillerons les causes dans chaque sous parties.

b) Validation de méthode

• Répétabilité

Nous avons réalisé, dans les mêmes conditions (le même jour, par le même opérateur, avec les mêmes lots de réactifs, avec la même gamme et le même dosage de protéines), la mesure d'activité de la NAGLU leucocytaire d'un même échantillon de façon répétée. Au vu du coût des réactifs, de la quantité d'échantillon disponible et du temps d'analyse, nous avons fixé à 20 le nombre de passages.

Ne disposant pas de contrôle de qualité interne commercial pour cet examen, la répétabilité a été étudiée sur un échantillon de témoin sain (issu de l'EFS). Afin d'avoir une répétabilité sur deux niveaux de concentration, nous avons réalisé le test sur le culot leucocytaire dilué et non dilué.

Tableau 44 : Répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire

| REPETABILITE de la mesure d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire | | | | | | |
|--|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------------------|---|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/5h/mg) | Ecart-type (nmol 4MU/5h/mg) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire |
| Solution leucocytaire issue de témoin EFS N1 | 20 | 31.9 | 1.37 | 4.3 | NA | 10 % |
| Solution leucocytaire issu de témoin EFS N1 dilué au 1/2 | 22 | 19.9 | 1.55 | 7.8 | NA | 10 % |

Il nous a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de répétabilité de 10 %.

Les CV de répétabilité étant inférieurs au CV limite, la répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire est conforme à nos exigences pour les deux niveaux étudiés.

- **Reproductibilité**

Nous avons réalisé des mesures d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire dans des conditions différentes (jours différents, opérateurs différents, lots de réactifs différents, gammes de calibration différentes). Nous avons testé la reproductibilité sur un échantillon d'un témoin sain (culots leucocytaires issus d'une poche de sang de l'EFS) (Tableau 45).

Tableau 45 : Reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire

| FIDELITE INTERMEDIAIRE de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire | | | | | | |
|---|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------------------|---|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/5h/mg) | Ecart-type (nmol 4MU/5h/mg) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire |
| Solution leucocytaire issue d'une poche | 20 | 22.5 | 1.76 | 7.9 | NA | 15 % |

Il a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de reproductibilité de 15 %.

Les CV de reproductibilité étant inférieurs au CV limite, la reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire est conforme à nos exigences.

- Justesse

Nous ne disposons pas de CIQ externalisé pour ce sous processus, ce paramètre est non applicable.

- Exactitude

Le programme d'EEQ des maladies lysosomales n'a pas proposé l'évaluation de la maladie de Sanfilippo B durant la période de validation de méthode. Cette méthode sera testée lors des prochaines évaluations. De plus, un projet d'échange d'échantillons avec d'autres laboratoires spécialisés est en cours de développement pour cet examen.

- Incertitude de mesure

A l'heure actuelle, nous ne disposons ni d'EEQ ni de matériaux de référence pour le calcul d'incertitude. Ce paramètre est non applicable.

- Variabilité inter-opérateurs

Toutes les techniques présentées dans ce travail sont manuelles et sont donc sujettes à des variations selon l'opérateur. Il est donc important de vérifier que cette variabilité inter-opérateur ne crée pas de variation significative au niveau des résultats rendus. Trois techniciennes du laboratoire ont mesuré l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire sur 8 culots leucocytaires issus de 8 témoins sains (don de sang de l'EFS) (Tableau 46). Nous avons évalué la variabilité inter-opérateur grâce à une étude statistique par un test Anova à partir des résultats obtenus par chaque opérateur.

Tableau 46 : Variabilité inter-opérateur de la mesure d'activité enzymatique NAGLU sur leucocytes

| | Opérateur 1 | Opérateur 2 | Opérateur 3 |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Somme des résultats (nmol/5h/mg) | 199,2 | 208,1 | 206,8 |
| Moyenne des résultats (nmol/5h/mg) | 24,9 | 26,0 | 25,8 |
| Variance des résultats | 3,6 | 4,0 | 3,5 |

La valeur F calculée est égale à 0,78, elle est inférieure au F théorique de 3,47 (obtenu dans la table de Fisher-Snedecor). L'interprétation de ces résultats par la méthode Anova montre donc que les moyennes obtenues pour les 3 opérateurs ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5 %.

- **Effet de bord des plaques**

La lecture de fluorescence finale s'effectue dans les mêmes microplaques de 96 puits que la gamme de 4-MU. L'effet de bord des plaques a été étudié dans la partie « validation de méthode du sous processus 2 (gamme 4MU) ».

- **Etendue de mesure**

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite de linéarité.

Limite de détection (LOD) :

C'est le plus petit signal exprimé en concentration qui peut être distingué d'un blanc de réaction. Pour déterminer la LOD, nous réalisons 20 mesures de « blancs réactifs ».

$$LOD = 3 \times \text{écart type des BR}$$

$$LOD = \mathbf{0,008 \mu mol/L}$$

Limite de quantification (LOQ) :

C'est la plus petite valeur exprimée en concentration, rendu avec un niveau de confiance acceptable. Pour déterminer la LOQ, nous réalisons 20 mesures de « blancs réactifs ».

$$LOQ = 10 \times \text{écart type des BR}$$

$$LOQ = \mathbf{0,028 \mu\text{mol/L}}$$

Limite de linéarité :

Elle correspond à la limite de concentration de 4-MU (libéré lors de la réaction enzymatique) après laquelle il n'y a plus de relation de linéarité avec la fluorescence.

La limite supérieure de linéarité de la mesure d'activité enzymatique de la NAGLU correspond à celle du fluorimètre (déterminée dans la partie « validation de méthode du sous processus gamme 4-MU). Il est impossible pour nous d'obtenir un échantillon biologique ayant une activité enzymatique très élevée. D'autre part, nous cherchons un déficit enzymatique et nous nous intéressons surtout aux valeurs basses de notre technique.

$$\text{Limite de linéarité : } \mathbf{3 \mu\text{mol/L}}$$

- Interférences

Pour le dosage enzymatique sur leucocytaire de la NAGLU, nous travaillons à partir d'un culot leucocytaire pur ne permettant pas la vérification des interférences.

- Contaminations

Le matériel utilisé est à usage unique, l'embout de la pipette est changé à chaque pipetage. Aucune contamination inter-échantillons et inter-réactifs n'est donc possible pendant l'analyse. La seule contamination possible serait lors de la lyse de plusieurs culots leucocytaires, lors de la phase pré-analytique.

Afin d'étudier cette possible contamination, 9 aliquots d'échantillons ayant une forte concentration en protéines (H) et 9 aliquots d'échantillons ayant une concentration faible en

protéines (B). (Figure 28) ont été cassés successivement aux ultra-sons (sans rinçage de la sonde à ultrasons) de la façon suivante : 3 échantillons H puis de 3 échantillons B, le tout 3 fois. Nous dosons les protéines de chaque échantillon après chaque sonication (3 sonications par aliquot).

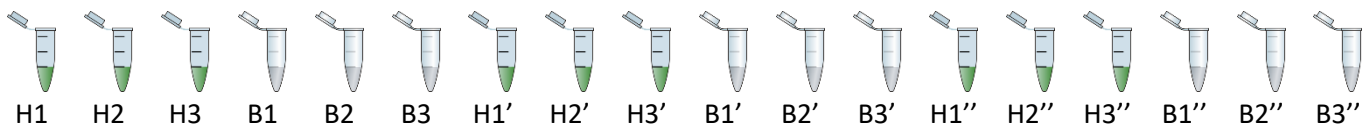


Figure 28 : Test de contamination inter-échantillons de la sonde à ultrasons

Les H étant les échantillons riches en protéines et B les échantillons pauvres en protéines

Le pourcentage de contamination est calculé selon la formule :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(\text{moyenne B1} - \text{moyenne B3})}{(\text{moyenne H} - \text{moyenne B3})} \times 100$$

Moyenne B1 : Moyenne des résultats de B1, B1' et B1''

Moyenne B3 : Moyenne des résultats de B3, B3' et B3''

Moyenne H : Moyenne des résultats de l'ensemble des H

La contamination de la sonde à ultrasons est estimée à **1,1 %** lors de la 1^{ère} sonication, à **0,5 %** lors de la 2^{ème} sonication et à **2,6 %** lors de la 3^{ème} sonication. Elle est donc négligeable.

- **Robustesse**

La robustesse d'une technique peut s'évaluer en divisant le CV de reproductibilité par le CV de répétabilité. Plus il est proche de 1, plus la technique est robuste. Pour la technique leucocytaire, ce rapport est de 1 (pour un niveau de concentration aux alentours de 20 nmol/5h/mg). La technique leucocytaire semble être plutôt robuste.

- Stabilité

La stabilité des réactifs et tampons a été évaluée en faisant des tests à intervalles de temps réguliers entre J0 et Jn.

Stabilité des réactifs de la technique leucocytaire et du culot leucocytaire :

Nous étudions pour cette technique la stabilité du substrat (reconstitué dans le tampon substrat et prêt à l'emploi), du culot leucocytaire (conservé à -80 °C) ainsi que de la BSA (conservée à -20 °C). Pour cela, à J0, plusieurs culots leucocytaires sont préparés à partir d'une poche de sang d'un témoin EFS et sont conservés à -80°C. Le même jour, le substrat et la BSA sont préparés, aliquotés et conservés respectivement à -80°C et à -20°C. A J0, un premier dosage est réalisé et servira de point de comparaison pour le suivi de stabilité. Nous effectuons à intervalle de temps régulier des dosages de l'activité NAGLU leucocytaire sur ces culots avec ces mêmes réactifs.

Nous définissons une limite de stabilité théorique (Lst) à 15 % (la même que le CV de reproductibilité). Les valeurs acceptables pour la stabilité est de $[v-Lst (\%) ; v+Lst (\%)]$ où v est la valeur obtenue à J0.

Nous exprimons les résultats par l'écart du dosage à Jn par rapport à la valeur à J0 (Figure 29).

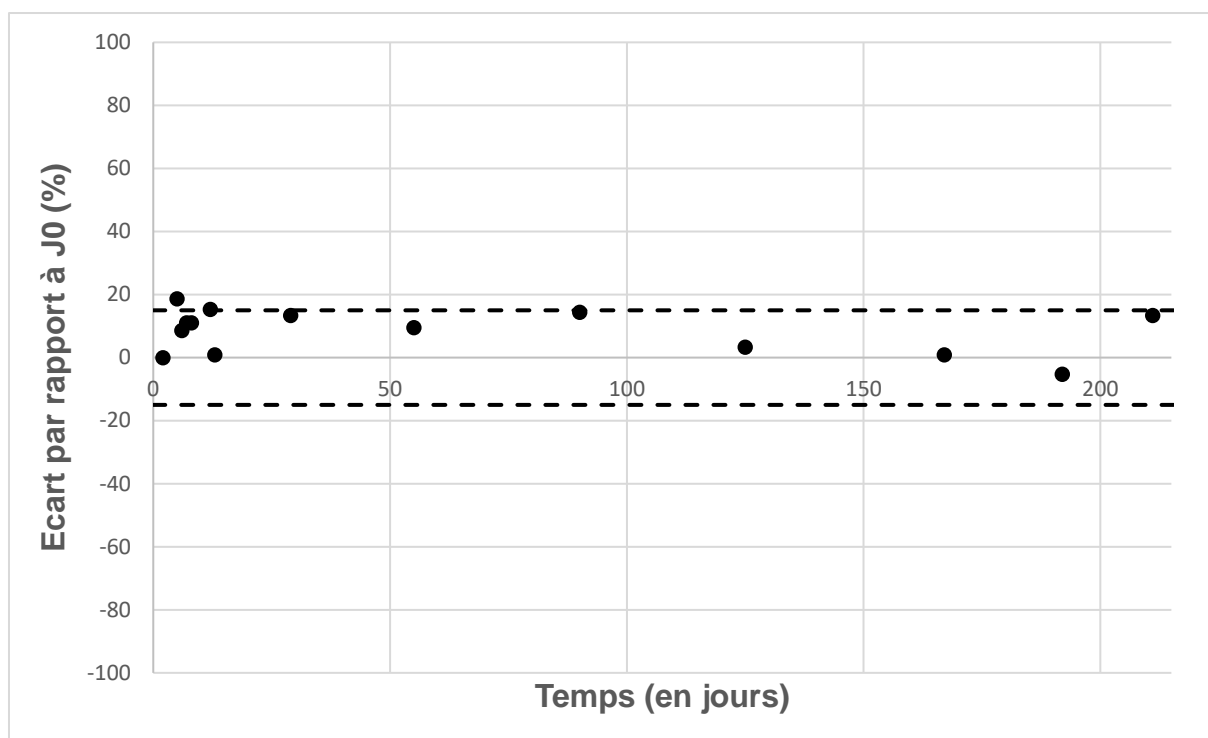


Figure 29 : Etude de la stabilité des réactifs de la technique leucocytaire et du culot leucocytaire

La Figure 29 montre que les dosages sont compris dans l'intervalle de +/- 15 % par rapport à J0 hormis deux points en début d'étude qui dépassent légèrement la borne haute. Cela peut s'expliquer par le fait que la valeur à J0 a été déterminée grâce à une seule valeur de dosage et non grâce à une moyenne de plusieurs dosages à J0. La valeur prise comme référence à J0 n'est donc pas exactement représentative de la valeur de référence. Cela peut s'observer sur les premiers points de l'étude qui sont supérieurs à la valeur de référence à J0.

Grâce à cette étude de stabilité, nous estimons que les culots leucocytaires, le substrat reconstitué de la technique leucocytaire et la BSA sont stables pendant 7 mois dans les conditions de conservation définies.

Stabilité du tampon d'arrêt glycine (1 M pH 10,5) :

Il a été étudié dans le sous processus 2 (gamme 4-MU) et est stable 6 mois à température ambiante.

- Intervalle de référence

Dans le cadre d'une ligne de portée B, nous devons définir nos propres valeurs de références. Le diagnostic de la maladie de Sanfilippo B est d'avantage adressée à des enfants, il est néanmoins difficile d'obtenir des échantillons biologiques pédiatriques afin de déterminer des valeurs de référence chez les enfants. Nous avons donc décidé d'appliquer un intervalle de référence adulte. La mesure de l'activité NAGLU leucocytaire chez 34 sujets sains (donneurs de sang à l'EFS) permet d'avoir une bonne représentation d'un intervalle de référence physiologique chez l'adulte (Tableau 47).

Valeurs normales leucocytes :

Nous définissons les bornes de l'intervalle de référence par la moyenne (M) +/- un écart type. Les résultats entre [M-ET ; M+ET] sont considérés comme physiologiques. Les valeurs comprises entre [M-2ET ; M-ET[sont considérés comme légèrement abaissées et doivent être contrôlées sur un 2^{ème} prélèvement (Figure 30).

Tableau 47 : Intervalle de référence de la technique leucocytaire

| | Activité en nmol/5h/mg |
|--|------------------------|
| Moyenne (M) | 23,6 |
| Ecart type | 3,0 |
| M+/- 1ET (Intervalle physiologique) | [20,6 – 26,6] |
| M+/- 2ET | [17,5 – 29,7] |

L'intervalle de référence de l'activité de la NAGLU leucocytaire est de **[20,6 ; 26,6] nmol/5h/mg de protéines** (Tableau 47).

Nous distinguons plusieurs niveaux d'activité enzymatique. Les cas sévères de la maladie présentent une activité enzymatique inférieure à 10 % de la moyenne des sujets sains, soit **2,4 nmol/5h/mg de protéines**. Pour une activité enzymatique inférieure à 50 % de la moyenne des individus sains (soit **11,8 nmol/5h/mg de protéines**), un déficit enzymatique est évoqué et les résultats doivent être confrontés à la clinique. Une confirmation génétique peut être recherchée si les signes cliniques sont évocateurs. Si

l'activité est inférieure à la borne inférieure des valeurs de référence (Moyenne - 1 ET soit **20,6 nmol/5h/mg de protéines**) et supérieure à 50 % de la moyenne des sujets sains, une hétérozygotie ou un polymorphisme peuvent être envisagés. Un polymorphisme est une altération génique qui entraîne une légère modification structurale de l'enzyme. Elle est toujours fonctionnelle mais moins efficace, son activité est donc légèrement diminuée. Dans ce 3^{ème} cas, une étude familiale peut être envisagée ainsi qu'une étude génétique.

La Figure 30 présente les résultats obtenus pour les 34 témoins sains en fonction de la fréquence relative de l'activité enzymatique de chaque individu. Nous obtenons une courbe de Gauss, les résultats sont distribués selon une loi normale.

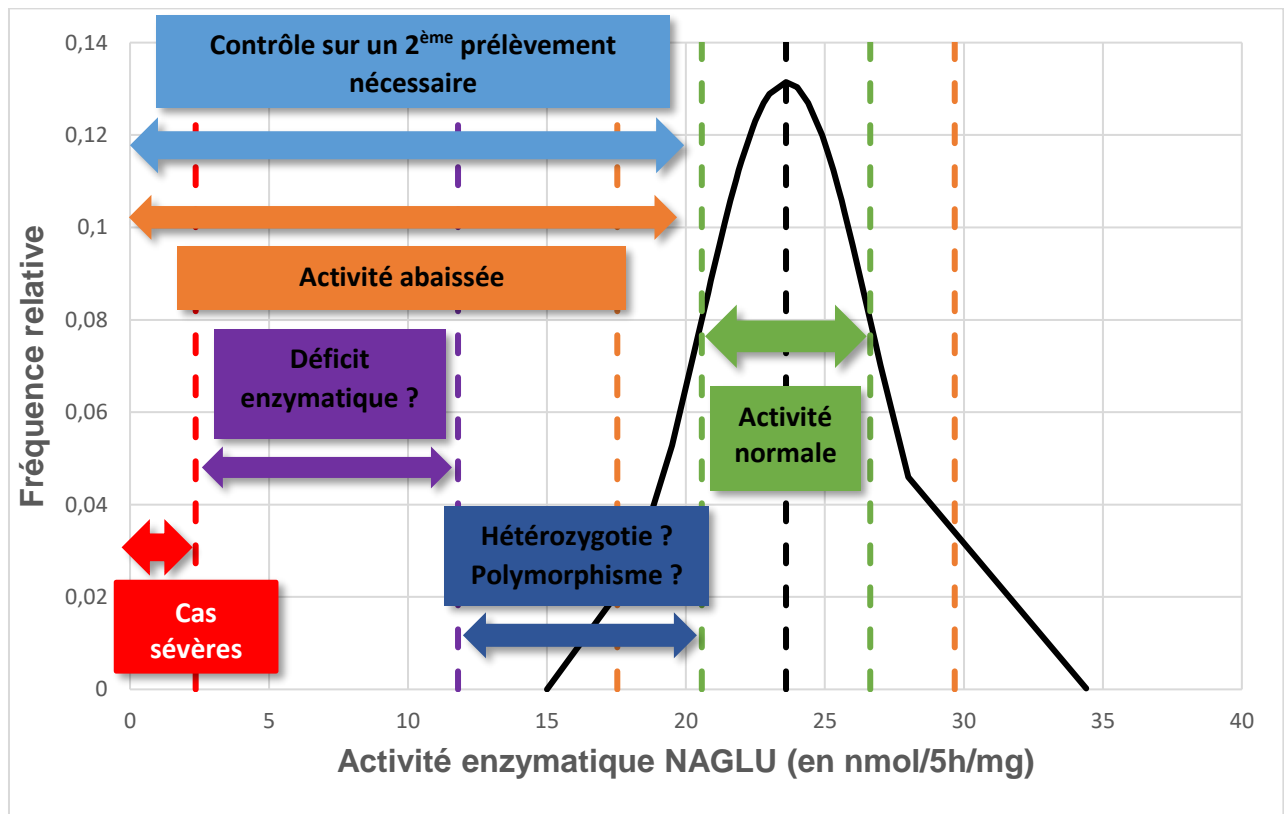


Figure 30 : Courbe de Gauss de l'activité leucocytaire de la NAGLU et interprétation des résultats

Courbe noire : courbe de Gauss

Pointillés noirs : Moyenne

Pointillés verts : Moyenne +/- 1ET (valeurs de référence)

Pointillés orange : Moyenne +/- 2 ET

Pointillés violets : Seuil de 50 % évoquant un déficit enzymatique

Pointillés rouges : Seuil de 10 % souvent observé pour les cas sévères

Cette pathologie étant de transmission autosomique récessive, il existe des sujets hétérozygotes présentant peu ou pas de signes cliniques. Ils présentent néanmoins une activité enzymatique NAGLU abaissée par rapport à une population saine. Ces sujets présenteront une activité enzymatique NAGLU comprise entre 20,6 nmol/5h/mg (soit M-1ET) et 11,8 nmol/5h/mg (c'est-à-dire 50 % de la moyenne des patients sains).

Un résultat supérieur à l'intervalle de référence n'a aucune signification clinique car c'est un déficit qui est recherché dans cette pathologie.

- **Sensibilité et spécificité**

Ces paramètres sont non applicables à la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire car c'est une technique quantitative.

- **Comparaison de méthode**

Ce paramètre n'est applicable car nous ne disposons pas de méthode ou d'automate de repli pour ce sous processus.

- **Déclaration d'aptitude**

Nous déclarons la méthode de diagnostic de la maladie de Sanfilippo B conforme. La maîtrise des risques est présentée dans le « SH FORM 43 - Diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur culot leucocytaire » (Annexe 1).

2 Validation de méthode du diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur DBS

2.1 Sous processus 1 : Gamme de 4-MU

Ce sous processus a déjà été validé dans la validation de méthode du diagnostic de la maladie de Sanfilippo sur leucocytes.

2.2 Sous processus 2 : Mesure de l'activité de la NAGLU sur DBS

a) Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS »

Tableau 48 : Adaptation des recommandations du SH GTA 04 Rev 01 au sous processus « mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS »

NA : non applicable

| Critères à évaluer | Application aux sous processus « Mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU DBS » |
|--|--|
| Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) | Essai |
| Justesse/Exactitude | NA |
| Incertitudes/facteur de variabilité et évaluation | NA |
| Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire et analyse des discordances | Essai |
| Intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité) | Essai |
| Interférences | NA |
| Contamination entre échantillons (s'il y a lieu) | Essai |
| Robustesse | Essai |
| Stabilité des réactifs (après ouverture, embraqués) | Essai |
| Intervalle de référence (valeurs usuelles) | Essai |
| Limite de détection | Essai |
| Spécificité/sensibilité analytique | / |
| Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude de la méthode ou du système analytique | |

Certains paramètres sont non applicables pour la validation de méthode de ce sous processus, nous détaillerons dans chaque sous-parties les raisons de la non application pour certains paramètres.

b) Validation de méthode

- Répétabilité

Nous avons réalisé, dans les mêmes conditions (le même jour, par le même opérateur, avec les mêmes lots de réactifs, avec la même gamme et le même dosage de protéines), la mesure d'activité de la NAGLU sur DBS d'un même échantillon de façon répétée. Nous avons fixé à 20 le nombre de passages au vu du coût des réactifs, de la quantité d'échantillon disponible et du temps d'analyse.

Ne disposant pas de contrôle de qualité interne pour cet examen, la répétabilité a été étudiée sur un échantillon de témoin sain. Afin d'avoir une répétabilité sur deux niveaux de concentration, nous avons réalisé le test sur un échantillon contenant un taux normal de leucocytes et sur un échantillon leucopénique.

Tableau 49 : Répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS

| REPETABILITE de la mesure d'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS | | | | | | |
|---|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------------------------|---|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/h/mL) | Ecart-type (nmol 4MU/h/mL) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire |
| DBS issu d'un patient N1 (normo leucocytaire) | 20 | 10.2 | 0.62 | 6.1 | NA | 10 % |
| DBS issu d'un patient N2 (leucopénique) | 23 | 1.0 | 0.05 | 5.2 | NA | 10 % |

Il a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de répétabilité de 10 %.

Les CV de répétabilité étant inférieurs au CV limite, la répétabilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS est conforme à nos exigences pour les deux niveaux étudiés.

- **Reproductibilité**

La reproductibilité ou fidélité intermédiaire est l'analyse d'un même échantillon par la même technique dans des conditions différentes (opérateur, lot de réactifs, étalonnage).

Nous avons réalisé des mesures d'activité enzymatique de la NAGLU leucocytaire dans des conditions différentes (jours différents, opérateurs différents, lots de réactifs différents, gammes de calibration différentes). Nous avons testé la reproductibilité sur un échantillon d'un témoin sain (plusieurs cartons DBS déposés à partir d'un échantillon de l'EFS).

Tableau 50 : Reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU DBS

| FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS | | | | | | |
|--|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------------------------|---|
| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/h/mL) | Ecart-type (nmol 4MU/h/mL) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire |
| DBS issu d'un témoin EFS | 20 | 4.7 | 0.28 | 6.0 | NA | 15 % |

Il a fallu définir un CV limite acceptable car il n'existe aucune donnée bibliographique ni de données fournisseurs pour cette gamme développée au laboratoire. Nous avons défini un CV limite de reproductibilité de 15 %.

Les CV de reproductibilité étant inférieurs au CV limite, la reproductibilité de la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS est conforme à nos exigences.

- *Justesse*

Nous ne disposons pas de CIQ externalisé pour ce sous processus, ce paramètre est non applicable.

- *Exactitude*

Il n'existe à ce jour aucun programme d'EEQ pour les techniques sur DBS. Le laboratoire est pilote pour le développement de ce type de programme. De plus, un projet d'échange d'échantillons avec d'autres laboratoires spécialisés peut être envisagé pour cet examen.

- *Incertitude de mesure*

Nous ne disposons, à l'heure actuelle, ni d'EEQ ni de matériaux de référence pour le calcul d'incertitude. Ce paramètre est donc non applicable

- *Variabilité inter-opérateurs*

Toutes les techniques présentées dans ce travail sont manuelles et sont donc sujettes à des variations selon l'opérateur. Il est donc important de vérifier que cette variabilité inter-opérateur ne crée pas de variation significative au niveau des résultats rendus.

Ce paramètre est en cours d'évaluation au laboratoire.

- *Effet de bord des plaques*

La lecture de fluorescence finale s'effectue dans les mêmes microplaques de 96 puits que la gamme de 4-MU. L'effet de bord des plaques a été étudié dans la partie « validation de méthode du sous processus 1 (gamme 4MU) ».

- *Etendue de mesure*

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite de linéarité.

Limite de détection (LOD) :

C'est le plus petit signal exprimé en concentration qui peut être distingué d'un blanc de réaction. Pour déterminer la LOD, nous réalisons 20 mesures de « blancs réactifs ».

$$LOD = 3 \times \text{écart type des BR}$$

$$LOD = \mathbf{0,061 \mu mol/L}$$

Limite de quantification (LOQ) :

C'est la plus petite valeur exprimée en concentration, rendu avec un niveau de confiance acceptable. Pour déterminer la LOQ, nous réalisons 20 mesures de « blancs réactifs ».

$$LOQ = 10 \times \text{écart type des BR}$$

$$LOQ = \mathbf{0,202 \mu mol/L}$$

Limite de linéarité :

Elle correspond à la limite de concentration de 4-MU (libéré lors de la réaction enzymatique) après laquelle il n'y a plus de relation de linéarité avec la fluorescence.

La limite supérieure de linéarité de la mesure d'activité enzymatique de la NAGLU correspond à celle du fluorimètre (déterminée dans la partie « validation de méthode du sous processus gamme 4-MU). Il est impossible pour nous d'obtenir un échantillon biologique ayant une activité enzymatique très élevée. D'autre part, nous cherchons un déficit enzymatique et nous nous intéressons surtout aux valeurs basses de notre technique.

$$\text{Limite de linéarité : } \mathbf{3 \mu mol/L}$$

- Interférences

Pour le dosage enzymatique sur DBS de la NAGLU, nous travaillons à partir d'une goutte de sang séchée ne permettant pas la vérification des interférences du type turbidité et ictère. Quelques publications (46,47) relatent l'interférence de la 4-MU avec l'hémoglobine. Il s'agit d'une interférence spectroscopique avec le noyau tétrapyrrolique de l'hème (constituant de l'hémoglobine). Il en résulte un *quenching* de fluorescence par l'hème.

L'interprétation des résultats de dépistage sur DBS est réalisée en parallèle d'une numération sanguine, ce qui permet de s'affranchir de cette interférence. En cas d'anémie sévère ou de polyglobulie, un dépistage par DBS n'est pas recommandé et un diagnostic sur leucocytes sera réalisé.

- Contaminations

Le matériel utilisé est à usage unique, l'embout de la pipette est changé à chaque pipetage. Aucune contamination inter-échantillons et inter-réactifs n'est donc possible pendant l'analyse. La seule contamination possible serait lors de la découpe des punchs avec une pince, lors de la phase pré-analytique.

Afin d'étudier cette possible contamination, nous découpons 3 punchs d'échantillons hyperleucocytaires (H) (donc activité NAGLU haute en DBS) et 3 punchs d'échantillons leucopéniques (B) (donc activité NAGLU basse en DBS) sans nettoyer la pince entre chaque *punch*. Nous répétons ce cycle 3 fois (Figure 31).

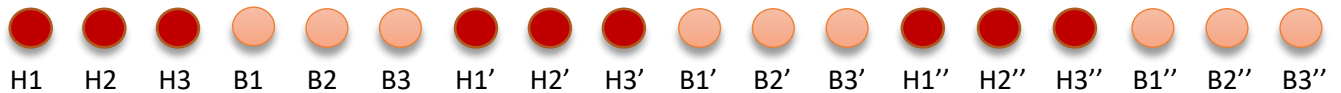


Figure 31 : Test de contamination inter-échantillons de la pince

Les H étant les échantillons hyperleucocytaires et B les échantillons leucopéniques

Le pourcentage de contamination est calculé selon la formule :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(\text{moyenne B1} - \text{moyenne B3})}{(\text{moyenne H} - \text{moyenne B3})} \times 100$$

Moyenne B1 : Moyenne des résultats de B1, B1' et B1''

Moyenne B3 : Moyenne des résultats de B3, B3' et B3''

Moyenne H : Moyenne des résultats de l'ensemble des H

La contamination de pince est estimée à **1 %**, elle est donc négligeable.

- Robustesse

La robustesse est la capacité d'une méthode à rester non affectée par des variations faibles, mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode. La robustesse d'une technique peut s'évaluer en divisant le CV de reproductibilité par le CV de répétabilité. Plus il est proche de 1, plus la technique est robuste. Pour la technique leucocytaire, ce rapport est de 0,99 (pour un niveau de concentration aux alentours de 10 nmol/h/mL). La technique sur DBS semble plutôt robuste.

- Stabilité

La stabilité des réactifs et tampons utilisés pour ce dosage a été évaluée en faisant des tests à intervalles de temps réguliers entre J0 et Jn.

Stabilité des réactifs de la technique DBS et de l'échantillon DBS

Nous étudions la stabilité du substrat (reconstitué) de la technique DBS (conservé à -80°C) ainsi que de l'échantillon DBS (conservé à 4°C) (Figure 32).

Plusieurs cartons de DBS ont été préparés à partir du prélèvement d'un témoin EFS et le substrat a été reconstitué, aliquoté et conservé à -80 °C, à J0. Un premier dosage à J0 est effectué et sera pris comme référence pour les dosages suivants.

Nous utilisons la même limite de stabilité que pour la technique leucocytaire (15 %).

Les résultats sont exprimés par l'écart du dosage à Jn par rapport à la valeur à J0 (Figure 32).

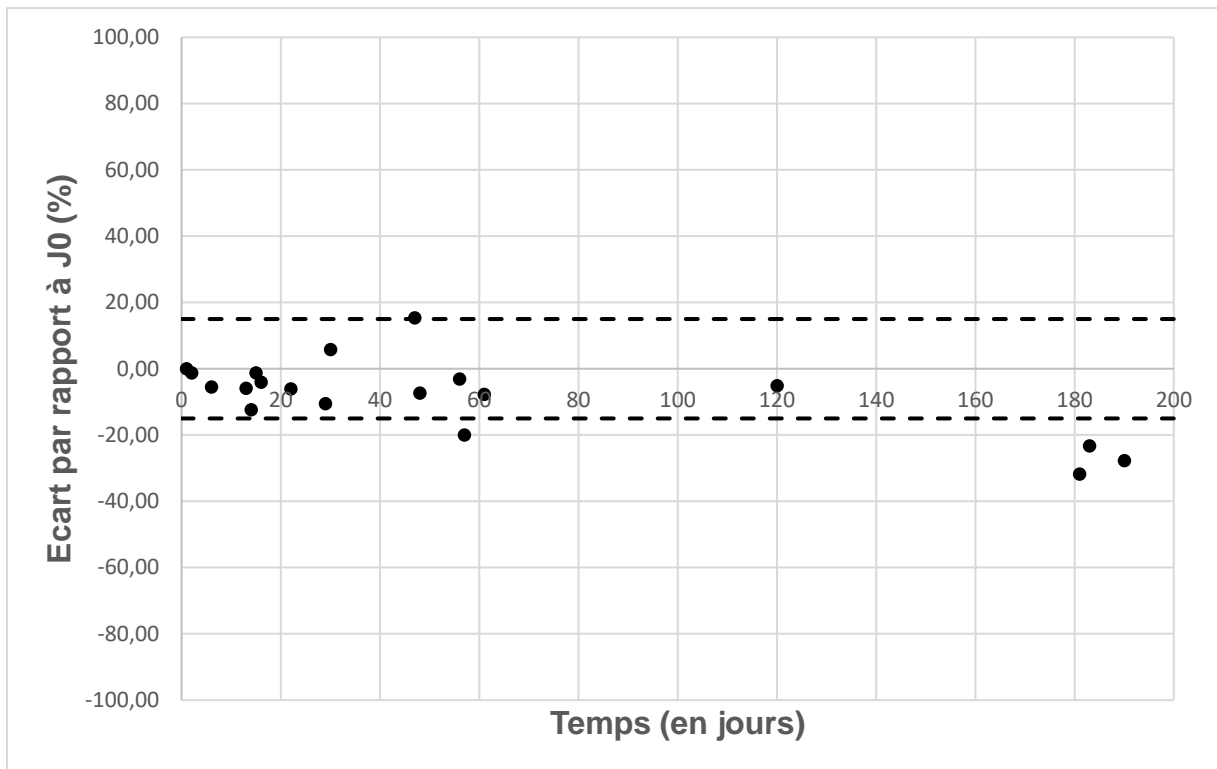


Figure 32 : Etude de la stabilité des réactifs de la technique DBS et de l'échantillon DBS

Nous observons deux points (à J47 et J57) qui sortent légèrement des bornes de stabilité mais les points suivants sont conformes à la limite de stabilité. Cela peut s'expliquer par le fait que la valeur à J0 a été déterminée grâce à une seule valeur de dosage et non grâce à une moyenne de plusieurs dosages à J0.

En revanche, les points réalisés à 6 mois sont en dessous de la borne inférieure de stabilité de façon répétée (à 3 reprises). Nous pouvons mettre en cause soit la stabilité du DBS soit la stabilité du substrat. Pour mettre en évidence la cause de cette perte d'activité, nous réalisons le dosage de ce même échantillon DBS avec un substrat du même lot fraîchement reconstituée en parallèle du substrat reconstitué à J0 (il y a 6 mois). Nous obtenons les mêmes résultats ce qui signifie que c'est l'échantillon DBS qui a perdu sa stabilité et non le substrat. La dernière valeur dans les bornes étant à 4 mois, nous définissons la stabilité des échantillons DBS à 4 mois pour cette technique. Nous avons poursuivi l'étude de stabilité du substrat de la technique DBS en réalisant en parallèle, sur le même échantillon, un dosage avec le substrat reconstitué à J0 et un substrat fraîchement reconstitué. Nous estimons

finalement que le substrat de la technique DBS est stable pendant 8 mois dans les conditions de conservation définies.

Stabilité de l'échantillon DBS à température ambiante :

Un des avantages du DBS est qu'il est possible de le réaliser en cabinet médicale ou à domicile et de l'amener dans le laboratoire le plus proche afin qu'il soit acheminé vers un laboratoire spécialisé. Nous avons vérifié que le résultat du dosage n'est pas modifié par les conditions de transport (à température ambiante en sachet plastique accompagné d'un dessiccant). Pour cela, nous déposons un carton DBS à J0. Un premier dosage à J0 permet d'avoir une valeur de référence. Nous réalisons des dosages sur cet échantillon DBS que nous conservons à température ambiante en sachet plastique accompagné d'un dessiccant. Nous utilisons la même limite de stabilité (15 %). Nous exprimons les résultats par l'écart du dosage à Jn par rapport à la valeur à J0 (Figure 33).

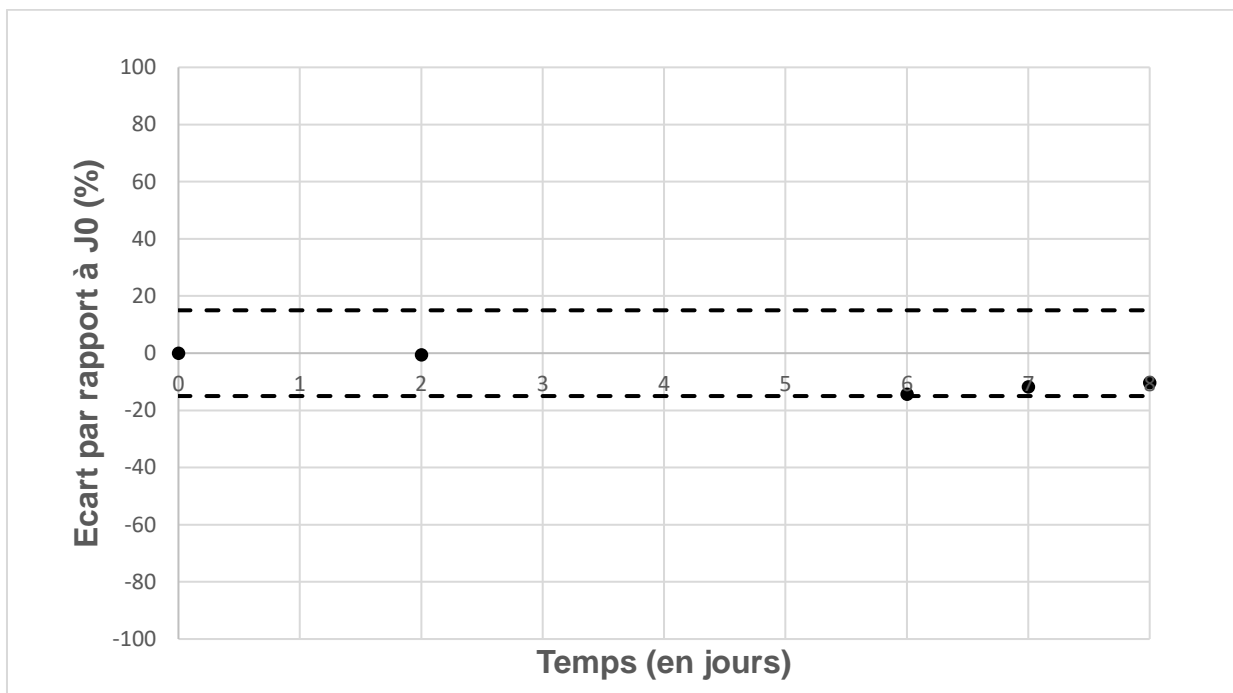


Figure 33 : Etude de la stabilité de l'échantillon DBS à température ambiante

L'étude est réalisée sur 8 jours (temps maximum de transport vers un laboratoire spécialisé). L'échantillon est stable sur ces 8 jours, les conditions de transport des échantillons DBS sont

donc conformes. Le DBS est transportable en sachet plastique avec un dessicant à température ambiante pendant 8 jours.

Stabilité du tampon d'arrêt glycine (1 M pH 10,5) :

Il a été étudié dans le sous processus 1 (gamme 4MU) et est stable 6 mois à température ambiante.

- Intervalle de référence

Dans le cadre d'une ligne de portée B, nous devons définir nos propres valeurs de référence. La mesure de l'activité NAGLU sur DBS chez 34 sujets sains (donneurs de sang à l'EFS) permet d'avoir une bonne représentation d'un intervalle de référence physiologique (Tableau 51).

Valeurs de référence DBS :

Nous définissons les bornes de l'intervalle de référence par la moyenne (M) +/- un écart type. Les résultats compris entre [M-1ET ; M+1ET] sont considérés comme physiologiques. Les résultats compris entre [M-2ET ; M-1ET[sont considérés comme douteux et devront toujours être contrôlés sur leucocytes (technique de diagnostic). Les valeurs comprises en dessous de M-2ET sont considérés comme probablement pathologiques et devront toujours être contrôlés sur leucocytes (technique de diagnostic) (Figure 34).

Tableau 51 : Intervalle de référence pour l'activité NAGLU dosée par la technique DBS

| | Activité en nmol/h/mL |
|--|------------------------------|
| Moyenne | 4,8 |
| Ecart type | 1,5 |
| M+/- 1ET (Intervalle physiologique) | [3,3 – 6,2] |
| M+/- 2ET | [1,8 – 7,7] |

L'intervalle de référence de l'activité de la NAGLU leucocytaire est de **[3,3 – 6,2] nmol/h/mL de sang total** (Tableau 51).

La Figure 34 présente les résultats obtenus pour les 34 témoins sains en fonction de leur fréquence relative. Nous obtenons une courbe de Gauss, les résultats sont distribués selon une loi normale.

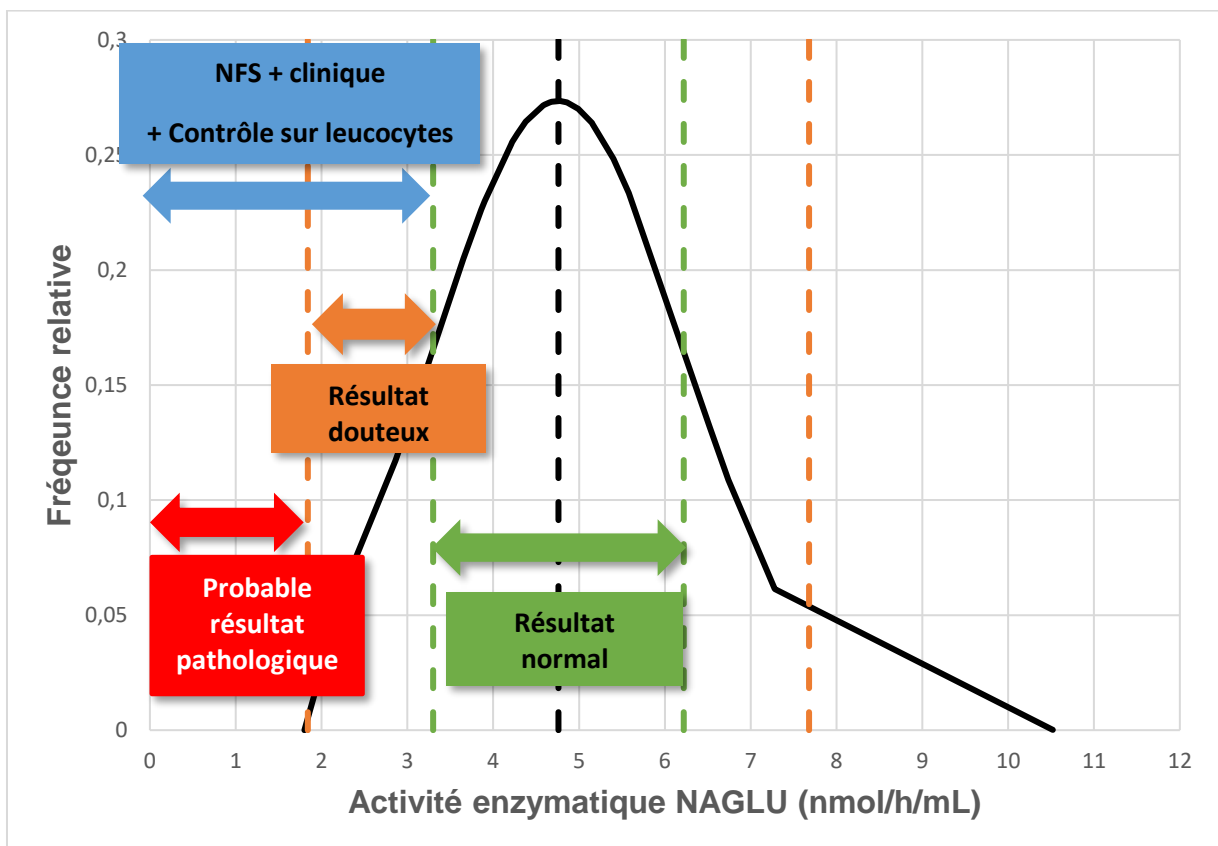


Figure 34 : Courbe de Gauss de l'activité de la NAGLU sur DBS et interprétation des résultats

Courbe noire : courbe de Gauss

Pointillés noirs : Moyenne

Pointillés verts : Moyenne +/- 1ET (valeurs de référence)

Pointillés orange : Moyenne +/- 2 ET

La technique sur DBS n'étant qu'une technique de dépistage, son résultat doit toujours être interprété en regard des signes cliniques et d'une numération-formule sanguine (si c'est

possible). Toute activité enzymatique abaissée sur DBS devra être contrôlée sur leucocytes (technique de confirmation).

- **Sensibilité et spécificité**

Ces paramètres sont non applicables à la mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur DBS car c'est une technique quantitative

- **Comparaison de méthode**

Pour ce paramètre, nous comparons la technique de dépistage de la maladie de Sanfilippo B (sur DBS) à la technique de diagnostic (sur culot leucocytaire). Cette étude est réalisée chez 34 témoins sains.

Il est possible de comparer l'interprétation biologique qu'il en est faite grâce aux droites de la M-1ET et M-2ET (seuils entre activité normale et abaissée).

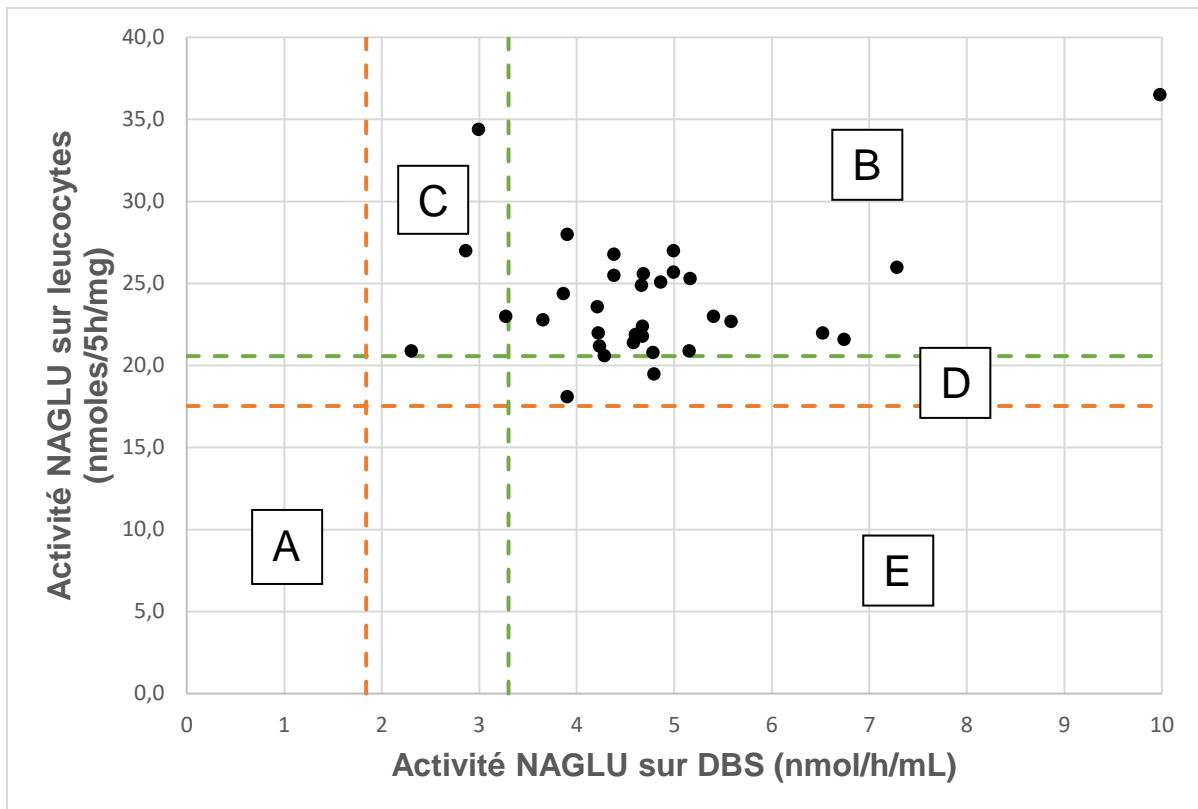


Figure 35 : Comparaison de méthode DBS (dépistage) et leucocytes (diagnostic)

Les lignes en pointillés vertes correspondent à la borne basse des valeurs de référence et les oranges correspondent à la moyenne de référence – 2 écart type (M-2ET).

Différentes zones du graphique sont délimitées par des lettres (A, B, C, D).

La zone A du graphique (Figure 35) correspond aux résultats abaissés en DBS et en leucocytes. Cette case correspond aux patients atteints par la maladie de Sanfilippo B. Aucun point n'est présent dans cette zone car nous ne disposons pas à ce jour d'échantillons de patients atteints.

La zone B correspond aux résultats normaux en DBS et sur leucocytes. La majorité des témoins sains sont présents dans cette catégorie.

La zone C correspond aux résultats douteux en DBS et normaux en leucocytes. Quatre témoins sains sont présents dans cette catégorie. La conduite à tenir en cas de DBS douteux est de refaire la technique puis, si le résultat est le même, de contrôler le résultat sur leucocytes.

La zone D correspond aux résultats normaux en DBS et légèrement abaissés sur leucocytes. En pratique, un résultat aussi peu abaissé sur leucocytes aurait été interprété comme normal. Un contrôle sur un deuxième prélèvement aurait pu être effectué.

L'important dans cette étude est de ne retrouver aucun point ayant un résultat normal en DBS et effondré en leucocytes (zone E).

La valeur prédictive négative du dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS est de 94% : 32 résultats sont normaux en DBS et en leucocytes. Les 2 patients restant sont légèrement abaissés en leucocytes et auraient été recontrôlés.

Finalement, nous avons montré que les deux techniques sont cohérentes entre elles.

- **Déclaration d'aptitude**

Nous déclarons la méthode de dépistage sur goutte de sang séchée de la maladie de Sanfilippo B conforme. La maîtrise des risques est présentée dans le « SH FORM 43 - Dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS » (Annexe 2).

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Judith DUCRUET

TITRE :

MISE AU POINT ET VALIDATION DE METHODE DU DOSAGE DE LA N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE (NAGLU) SUR LEUCOCYTES ET SUR GOUTTE DE SANG SECHEE : DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE SANFILIPPO TYPE B

CONCLUSION :

La maladie de Sanfilippo de type B est une maladie de faible prévalence mais dont la clinique peut être extrêmement sévère. Souvent confondue avec des troubles comportementaux tels que l'autisme ou l'hyperactivité, la prise en charge des patients souffre souvent d'un retard de diagnostic. De nouveaux traitements de la maladie de Sanfilippo de type B arrivant sur le marché, nous avons vu l'opportunité de développer des techniques de diagnostic et de dépistage performantes afin de mieux répondre aux besoins des cliniciens et des patients. Nous avons ainsi optimisé la technique de diagnostic par mesure de l'activité enzymatique de la N-actétylGlucosaminidase (ou NAGLU) sur leucocytes. Les conditions analytiques optimales de certains paramètres ont été définies (nature du tampon d'arrêt, nature et pH du tampon substrat, concentration en substrat et temps d'incubation). Le résultat du dosage sur leucocytes est rapporté à la quantité de protéines présentes dans le culot leucocytaire et permet de tenir compte du nombre de leucocytes présents dans l'échantillon.

D'autre part, et au vu de l'errance diagnostic dans cette pathologie, nous avons développé une technique de dépistage par mesure de l'activité enzymatique de la N-actétylGlucosaminidase (ou NAGLU) sur goutte de sang séchée ou *Dried Blood Spot* (DBS). Celle-ci présente l'avantage d'être moins contraignante et plus facile à réaliser que la méthode diagnostic sur leucocytes. Cela permettrait une utilisation plus large en routine, néanmoins cette technique ne se substituera pas à la technique de référence, mais permettra un diagnostic d'exclusion ou une orientation vers la méthode diagnostique de référence. Comme pour la technique sur leucocytes, un certain nombre de paramètres ont été déterminés au cours de cette thèse (condition d'élution du punch, nature et pH du tampon substrat et concentration en substrat). Le résultat du dosage sur DBS est rapporté à la quantité de sang total présent dans le punch de sang (un disque de 3 mm de diamètre est calibré pour contenir 3,6 µL de sang total). L'interprétation des résultats est donc réalisée en parallèle d'un hémogramme afin de tenir compte d'une éventuelle leucopénie ou hyperleucocytose.

En vue de leur accréditation au sein du laboratoire, nous avons réalisé la validation de méthode en portée B de ces deux examens, dans le respect des exigences normatives en vigueur pour les examens de biologie médicale (NF EN ISO 15189). Les méthodes de dépistage et de diagnostic de la maladie de Sanfilippo de type B ont été déclarées conformes aux exigences clinico-biologiques.

Le défi qu'il reste à relever concerne la sensibilisation des cliniciens à l'utilisation de ce nouveau test de dépistage, pour leur permettre de diagnostiquer plus précocement la maladie de Sanfilippo de type B. Ceci est la condition pour permettre aux patients de profiter pleinement des avancées thérapeutiques récentes et précoces dans ce domaine.

Les perspectives d'amélioration dans le dépistage des maladies lysosomales résident dans le multiplexage. Cette approche permettrait un dépistage de plusieurs maladies de surcharge lysosomales à partir d'un même échantillon (notamment une goutte de sang séchée). Le but serait de couvrir ainsi plus facilement un plus large spectre de pathologies et permettre des diagnostics d'exclusion et une meilleure orientation dans les examens complémentaires.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 24 avril 2018

LE DOYEN


Pr. Michel SÈVE

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

~~Service de Biochimie, Biologie Moléculaire
Toxicologie Environnementale (SB2TE)
Chef de service : Pr Patrice FAURE
Pôle de Biologie - CHU Grenoble Alpes
CS 10217 - 38043 GRENOBLE Cedex 9
T. 04 76 76 54 84 - F. 04 76 76 56 64~~
Pr. Patrice FAURE

Bibliographie

1. Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* févr 2018;17(2):133-50.
2. Wijburg FA, Węgrzyn G, Burton BK, Tylki-Szymańska A. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome) and misdiagnosis of idiopathic developmental delay, attention deficit/hyperactivity disorder or autism spectrum disorder. *Acta Paediatr.* 1 mai 2013;102(5):462-70.
3. COFRAC. SH GTA 04 Révision 01 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale.
4. Maire I. Maladies de surcharge lysosomale : classification fonctionnelle et principes thérapeutiques. 1 mars 2008
5. De Duve C, Pressman B, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1954;60:604-17.
6. Luzio JP, Hackmann Y, Dieckmann NMG, Griffiths GM. The Biogenesis of Lysosomes and Lysosome-Related Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. sept 2014
7. Bainton D. The discovery of lysosomes. *J Cell Biol.* déc 1981;91:66s-76s.
8. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 1 févr 2005;128(4):413-31.
9. Protocole National de Diagnostic et des Soins Mucopolysaccharidoses. In 2016.
10. Froissart R, Bekri S. Diagnostic et suivi des mucopolysaccharidoses. *Arch Pédiatrie.* juin 2014;21, Supplement 1:S27-31.
11. Héron B, Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Maire I, Caillaud C, et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *Am J Med Genet A.* 1 janv 2011;155(1):58-68.
12. Fedele AO. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *Appl Clin Genet.* 25 nov 2015;8:269-81.
13. Harris R. Mucopolysaccharides disorder : A possible new geno-type of Hurler's syndrome. *Am J Dis Child.* 1961;
14. Sanfilippo S, Podosin R, Langer L, Good R. Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type). *J Pediatr.* 1963;63:837-8.
15. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. juill 2011;3(7).

16. Fenzl C, Teramoto K, Moshirfar M. Ocular manifestations and management recommendations of lysosomal storage disorders l: mucopolysaccharidoses [Internet]. *Clinical Ophthalmology*. 2015
17. Héron B. Aspects neurologiques des mucopolysaccharidoses. *Arch Pédiatrie*. juin 2014;21, Supplement 1:S14-21.
18. Valstar MJ, Ruijter GJG, Diggelen OP van, Poorthuis BJ, Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: A mini-review. *J Inherit Metab Dis*. 1 avr 2008;31(2):240-52.
19. Valstar MJ, Marchal JP, Grootenhuis M, Colland V, Wijburg FA. Cognitive development in patients with Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Orphanet J Rare Dis*. 20 juin 2011;6:43.
20. Moog U, van Mierlo I, van Schrojenstein Lantman-de Valk HMJ, Spaapen L, Maaskant MA, Curfs LMG. Is Sanfilippo type B in your mind when you see adults with mental retardation and behavioral problems? *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 15 août 2007;145C(3):293-301.
21. Kamp JJPVD, Niermeijer MF, Figura KV, Giesberts M a. H. Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clin Genet*. 1 août 1981;20(2):152-60.
22. Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Llarena M, Couce ML. Sanfilippo syndrome: Overall review. *Pediatr Int*. 1 juin 2015;57(3):331-8.
23. Delgadillo V, O'Callaghan M del M, Gort L, Coll MJ, Pineda M. Natural history of Sanfilippo syndrome in Spain. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:189.
24. Valstar MJ, Bruggenwirth HT, Olmer R, Wevers RA, Verheijen FW, Poorthuis BJ, et al. Mucopolysaccharidosis type IIIB may predominantly present with an attenuated clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis*. 1 déc 2010;33(6):759-67.
25. Bouzidi H, Khedhiri S, Laradi S, Ferchichi S, Daudon M, Miled A. La mucopolysaccharidose IVA (syndrome de Morquio A) : aspects clinique, biologique et thérapeutique. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 janv 2007;65(1):5-11.
26. Mahalingam K, Janani S, Priya S, Elango EM, Sundari RM. Diagnosis of mucopolysaccharidoses: how to avoid false positives and false negatives. *Indian J Pediatr*. janv 2004;71(1):29-32.
27. Kurt I, Sertoglu E, Okur I, Tapan S, Uyanık M, Kayadibi H, et al. Serum dipeptidyl peptidase-IV: A better screening test for early detection of mucopolysaccharidosis? *Clin Chim Acta*. 20 avr 2014;431:250-4.
28. Beesley CE, Young EP, Finnegan N, Jackson M, Mills K, Vellodi A, et al. Discovery of a new biomarker for the mucopolysaccharidoses (MPS), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD26), by SELDI-TOF mass spectrometry. *Mol Genet Metab*. 1 avr 2009;96(4):218-24.

29. Randall DR, Colobong KE, Hemmelgarn H, Sinclair GB, Hetty E, Thomas A, et al. Heparin cofactor II–thrombin complex: A biomarker of MPS disease. *Mol Genet Metab.* août 2008;94(4):456-61.
30. King B, Savas P, Fuller M, Hopwood J, Hemsley K. Validation of a heparan sulfate-derived disaccharide as a marker of accumulation in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab.* févr 2006;87(2):107-12.
31. Natale PD, Domenico CD, Napoli DD. Serum MIP-1 α level: a biomarker for the follow-up of lentiviral therapy in mucopolysaccharidosis IIIB mice. *J Inherit Metab Dis.* 1 avr 2010;33(2):159-65.
32. Reuser AJ, Verheijen FW, Bali D, van Diggelen OP, Germain DP, Hwu W-L, et al. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders — Current status and perspectives. *Mol Genet Metab.* sept 2011;104(1–2):144-8.
33. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, et al. Direct Multiplex Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Clin Chem.* oct 2004;50(10):1785-96.
34. Briand G. Spectrométrie de masse et diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015;73:93-106.
35. Caillaud C. Principes des approches thérapeutiques pour les mucopolysaccharidoses. *Arch Pédiatrie.* juin 2014;21, Supplément 1:S39-45.
36. Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Langford-Smith A, Brown JR, Crawford BE, et al. Genistein Improves Neuropathology and Corrects Behaviour in a Mouse Model of Neurodegenerative Metabolic Disease. *PLOS ONE.* 1 déc 2010;5(12):e14192.
37. Roberts ALK, Thomas BJ, Wilkinson AS, Fletcher JM, Byers S. Inhibition of Glycosaminoglycan Synthesis Using Rhodamine B in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Pediatr Res.* sept 2006;60(3):309-14.
38. Sands MS, Haskins ME. CNS-directed gene therapy for lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. avr 2008;97(457):22-7.
39. Ghosh A, Shapiro E, Rust S, Delaney K, Parker S, Shaywitz AJ, et al. Recommendations on clinical trial design for treatment of Mucopolysaccharidosis Type III. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 26 juin 2017;12.
40. Guffon N. Evaluation of Miglustat Treatment in Patients with Type III Mucopolysaccharidosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Pediatr.* 2011;159(5).
41. Tardieu M, Zérah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, et al. Intracerebral Administration of Adeno-Associated Viral Vector Serotype rh.10 Carrying Human SGSH and SUMF1 cDNAs in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIA Disease: Results of a Phase I/II Trial. *Hum Gene Ther.* 13 févr 2014;25(6):506-16.

42. Jones SA, Breen C, Heap F, Rust S, de Ruijter J, Tump E, et al. A phase 1/2 study of intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Genet Metab.* 2016;118(3):198-205.
43. Aoyagi-Scharber M, Crippen-Harmon D, Lawrence R, Vincelette J, Yogalingam G, Prill H, et al. Clearance of Heparan Sulfate and Attenuation of CNS Pathology by Intracerebroventricular BMN 250 in Sanfilippo Type B Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 6 juin 2017;6:43-53.
44. Moscerdam. Protocole MIIIB. 2009.
45. Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta.* oct 2006;372(1–2):98-102.
46. Oemardien LF. Hemoglobin precipitation greatly improves 4-methylumbelliferone-based diagnostic assays for lysosomal storage diseases in dried blood spots. *Mol Genet Metab.* 2011;102:44-8.
47. Franco PG. Update on the fluorometric measurement of enzymatic activities for Lysosomal Storage Disorder detection : The example of MPS VI. *J Rare Dis Res Treat.* 2017;2:56-61.

Annexes

ANNEXE 1 : SH FORM 43 « Diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur culot leucocytaire » (réalisé en collaboration avec le Dr Lysiane Boulet)

UM « Biochimie des Enzymes et des Protéines »

Portée : A B
 Examen : routine spécialisé

*Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale***

| EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE |
|---|
| Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Diagnostic de la maladie de Sanfilippo type B sur leucocytes |
| Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : 3) |

| DESCRIPTION DU PROCESSUS | | |
|---|--|--|
| Dosage des protéines totales | Cf SH FORM « Diagnostic de la maladie de Fabry sur leucocytes » | |
| Gamme de 4-Méthylumbéllifèrone | Éléments à vérifier | Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence |
| Activité de la N-acétyl- α -Glucosaminidase (NAGLU) sur leucocytes | Éléments à vérifier | Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence |

Pour chaque étape, le laboratoire procédera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

SOUS-PROCESSUS 1 : Dosage des protéinesPortée A ; Portée B Cf SH Form **Diagnostic de la maladie de Fabry sur leucocytes****SOUS-PROCESSUS 2 : Gamme de 4-méthylumbelliféron**Portée A ; Portée B (méthode maison)**DESCRIPTION DE LA METHODE**

| | |
|--|--|
| Analyte / Mesurande : | 4-méthylumbelliféron |
| Principe de la Méthode : | Fluorescence |
| Type d'échantillon primaire : | Solution de 4-méthylumbelliféron en tampon glycine |
| Type de récipient, additifs : | NA |
| Prétraitement de l'échantillon : | NA |
| Unités : | nmol de 4MU/L |
| Critères d'interprétation¹ : | Sous processus ne donnant pas lieu à un rendu de résultat, mais permettant le calcul des activités (sous processus 3). Pas de critères d'interprétation. |
| Marquage CE (Oui/Non) : | NA |
| Codage C.N.Q. (s'il existe) : | NA |
| Équipement (instrument, analyseur, etc.) : | Mithras LB 940 BERTHOLD Technologies |
| Référence du réactif : | Tampons maisons à partir de glycine (ref 50046 SIGMA) et de pastilles de NaOH (ref 28244.295 VWR Chemicals) |
| Matériau d'étalonnage (références) : | 4-méthylumbelliféron (M1381 SIGMA) |
| Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs : | Étalonnage linéaire en 9 points : 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6 et 8 nmol de 4-MU/prise d'essai jusqu'au 27/02/17 Puis étalonnage linéaire en 11 points : 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 1.05, 1.5, 1.95, 2.55 et 3 µmol de 4-MU/L |

MISE EN ŒUVRE

| | |
|--|--|
| Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode : | Morgane Fournier, Aurélie Servais, Delphine Brodin, Aline Abel, Osiris Khalfa, Judith Ducruet |
| Procédure de validation/mode opératoire : | Vérification/validation des performances des méthodes analytiques quantitatives GBAQANA.PRO.004 |
| Procédure de gestion de la portée flexible : | GBAQANA.FOR.008 |
| Période d'étude : | Du : 26/04/16 au 20/09/2017 |
| Date de 1^{ère} utilisation : | 21/04/16 (passage en plaque) |

¹ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ² | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) |
|-------------------------------|---|-----------------------------------|--|--|
| Matière (échantillons) | NA car sous-processus n'incluant aucun échantillon patient | | | |
| Milieu | Conditions de conservation des échantillons (t°, ...) | NA car instantanée | Métrologie/suivi des enceintes | <ul style="list-style-type: none"> - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) - Fiches fournisseurs - Gamme de 4-MU en tampon glycine (BEPEPA.FTE.063) |
| | Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...) | 1 / 2 2 | | |
| | Exigences environnementales pour le matériel | 1 / 1 1 | Température comprise entre 15 et 40°C Humidité < 80% | Pièce avec température modulée |
| Matériel (équipements) | Surveillance des dérives | 2 / 2 4 | Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...) | <ul style="list-style-type: none"> - Enregistrements des maintenances par le service biomédical - Suivi des CIQ dans l'URT : Gestion des CIQ en Enzymopathie (BEPEPA.PRO.004) |
| | Contamination | 1 / 4 4 | Respect des conditions opératoires | Utilisation de matériel à usage unique |
| | Informatique embarquée (paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données) | 1 / 1 1 | Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ... | <ul style="list-style-type: none"> Pas d'informatique connectée. Utilisation d'un programme bloqué Impression de chaque manipulation et archivage avec le dossier patient (Archivage des résultats d'examen du secteur EPAT ((BEPEPA.FTE.062)) |
| Matériel (réactifs) | Conservation et conditions d'utilisation | 2 / 2 4 | Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) | <ul style="list-style-type: none"> - Fiches fournisseur - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) - Gamme de 4-MU en tampon glycine (BEPEPA.FTE.063) |
| | Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks | 2 / 2 4 | Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks | <ul style="list-style-type: none"> - Procédure de commande des réactifs, consommables de laboratoire et contrôles qualité pour la biologie médicale du CHUG (GBAQACH.PRO.002) - Procédure de réception des réactifs et consommables de laboratoire pour la biologie médicale (GBAQACH.PRO.004) - Gestion des stocks par l'utilisation du logiciel Sapanet (GBAQPRE.MOP.002) |

² A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ² | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|--|--|
| | Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles | 2 / 2 4 | Métrologie des pipettes, des balances et du pH-mètre Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation) | - Pipettes de laboratoire : Organisation des contrôles et maintenances (BIOMEDBIO.PRO.001) - Balance : Entretien courant d'une balance de laboratoire (GBAQENT.PRO.005) - pHmètre : suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion 510 (BEPTVS.FOR.010), Etalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) - Instructions de réalisation : Gamme de 4-MU en tampon glycine (BEPEPA.FTE.063) - Formulaire de traçabilité des réactifs (BEPEPA.FOR.039) |
| Méthode | Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...) | 1 / 1 1 | Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité | Validation/Vérification des performances des méthodes analytiques quantitatives (GBAQANA.PRO.004) |
| | Causes d'incertitude de mesure | 1 / 1 1 | Calcul des incertitudes de mesure | Vérification du coefficient de variation de fidélité intermédiaire annuelle |
| Main d'œuvre (Personnel) | Compétence et maintien de compétence du personnel | 2 / 4 8 | Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective) | -Fiche d'habilitation Poste activités enzymatiques en EPAT (hors biopsie musculaire) (BEPEPA.FDH.003) -Fiche de poste technicien, poste activités enzymatiques en EPAT hors biopsie musculaire (BEPEPA.FDP.032) -Fiche d'habilitation validation biologique du secteur EPAT (BEPEPA.FDH.005) -Fiche de poste biologiste du secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.028) -Fiche de poste interne secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.029) |

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (coefficient directeur) | Ecart-type | CV (%) | CV (%) retenu par le laboratoire (estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ³ |
|---|--------------------------------------|---------------------------------|------------|--------|---|-------------------------|
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 9 points | 5 gammes de 9 points, soit 45 points | 91685 | 1609 | 1.8 | 10% | CV acceptable |
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 11 points | 24 gammes de 11 points | 224151 | 9559 | 4.3 | 10% | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité de la méthode est conforme aux recommandations.

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne | Ecart-type | CV (%) | CV (%) retenu par le laboratoire estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ⁵ |
|---|-----------------------------------|---------|------------|--------|--|-------------------------|
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 9 points | 21. Suivi de la pente de la gamme | 96460 | 5274 | 5.5 | 15% | CV acceptable |
| Solution de 4-MU en tampon glycine, 11 points | 30. Suivi de la pente de la gamme | 243514 | 12675 | 5.2 | 15% | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire de la méthode est conforme aux recommandations.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable ; non applicable

| | |
|---------------------------------------|--|
| Opérateur évalué 1 (Morgane Fournier) | Essai sur site à partir des résultats de 8 gammes. Etude statistique réalisée grâce à un test ANOVA. F calculé à 2.45 pour un F théorique (table de Fisher) à 2.92 |
| Opérateur évalué 2 (Aurélie Servais) | |
| Opérateur évalué 3 (Aline Abel) | |
| Opérateur évalué 4 (Delphine Brodin) | |

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateurs est négligeable pour l'ensemble de notre personnel technique.

³ Conforme/non conforme

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
Applicable ; non applicable (pas de CIQ externalisé)

Argumentaire de la conclusion : Non applicable. Absence de CIQ externalisé pour ce sous-processus. Sous-processus ne donnant pas lieu à un rendu de résultat, mais permettant de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée par d'autres sous-processus.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)
Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Non applicable. Absence de contrôle externe ponctuel pour ce sous-processus. Sous-processus ne donnant pas lieu à un rendu de résultat, mais permettant de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée par d'autres sous-processus.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Non applicable.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ; calcul

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Non applicable. Sous-processus ne donnant pas lieu à un rendu de résultat, mais permettant de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée par d'autres sous-processus.

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable

| | |
|--|---------------------|
| Limite de détection (réalisée sur site) | 0.001 µmol de 4MU/L |
|--|---------------------|

Argumentaire de la conclusion : Limite de détection compatible avec notre utilisation clinico-biologique.

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable ; non applicable (absence de 2^{ème} automate ou de 2^{ème} méthode)

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|---|---------------------|
| Limite de détection : (réalisée sur site) | 0.001 µmol de 4MU/L |
| Limite de quantification : (réalisée sur site) | 0.003 µmol de 4MU/L |
| Limite supérieure de linéarité : (réalisée sur site) | 3 µmol de 4MU/L |

Argumentaire de la conclusion : Etendue de mesure compatible avec notre utilisation clinico-biologique.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
 (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
 Applicable ; non applicable (échantillon pure de 4-MU)

Argumentaire de la conclusion : Non applicable. Solution aqueuse réalisée au laboratoire. Pas d'interférence possible.

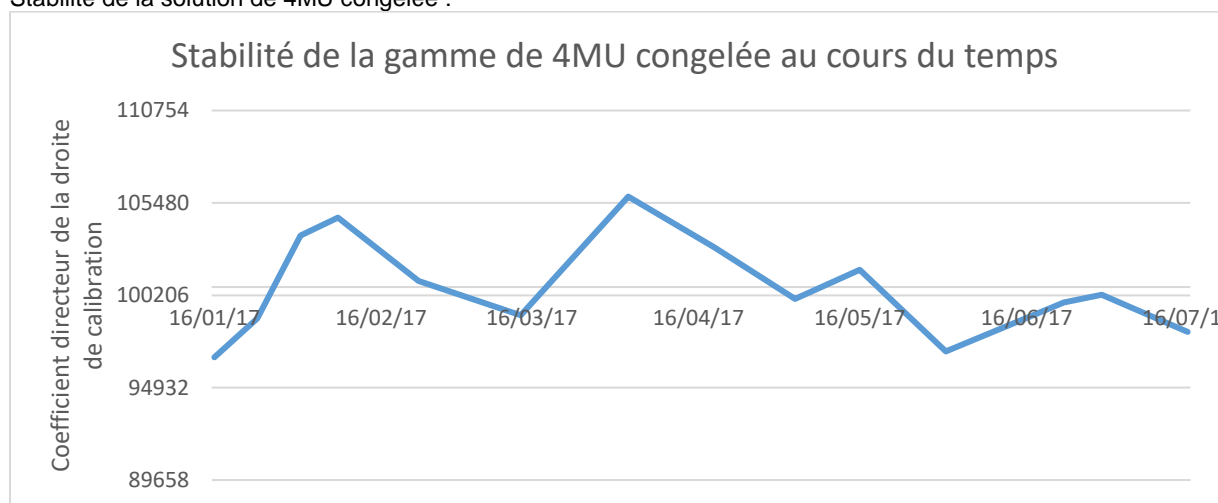
CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)
 (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Utilisation de matériel à usage unique.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS
 (étude expérimentale indispensable en portée B)
 (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|---|--|
| Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...) | - Mesures des pH des tampons réalisées à l'aide d'un pH mètre raccordé NIST (Étalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) et Suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion (510 BEPTVS.FOR.010)) - Stabilités des tampons vérifiées |
| Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ... | La gamme de 4-MU à 1 mM est stable 6 mois une fois congelée à -20°C Le tampon glycine1M pH 10.5 est stable 6 mois. Cf sous processus 3 |

Stabilité de la solution de 4MU congelée :



Argumentaire de la conclusion : Nos réactifs sont réalisés et stockés selon la procédure en vigueur. Dans ces conditions, ils sont robustes et stables.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Sous-processus ne donnant pas lieu à un rendu de résultat, mais permettant de réaliser une courbe d'étalonnage utilisée par d'autres sous-processus.

Effet de bord des microplaques
Applicable ; non applicable

Nombre de points donnant des résultats > 3 ET

0

Argumentaire de la conclusion : Absence d'effet de bord des microplaques

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme

Autorisée par : Dr Sabrina Vergnaud
Signature

SOUS-PROCESSUS 3 : Activité de la N-acétyl- α -Glucosaminidase (NAGLU) sur culot leucocytairePortée A ; Portée B (méthode maison)**DESCRIPTION DE LA METHODE**

| | |
|--|---|
| Analyte / Mesurande : | α -N-acétylglucosaminidase (NAGLU) |
| Principe de la Méthode : | Fluorescence : libération de 4-méthylumbelliférol par l'action enzymatique de l' α -N-acétylglucosaminidase |
| Type d'échantillon primaire : | Suspension leucocytaire issue d'un culot leucocytaire |
| Type de récipient, additifs : | Tube EDTA |
| Prétraitement de l'échantillon : | Séparation des leucocytes (sédimentation, centrifugations, lyse hypotonique), cf BEPEPA.FTE.003 : Préparation des leucocytes |
| Unités : | nmol 4MU / 5h / mg de protéines |
| Critères d'interprétation⁴ : | 20,6 et 26,6 nmol 4MU/5h/mg de protéines Réalisé au laboratoire sur 34 sujets sains |
| Marquage CE (Oui/Non) : | Non |
| Codage C.N.Q. (s'il existe) : | NA |
| Équipement (instrument, analyseur, etc.) : | Mithras LB 940 BERTHOLD Technologies |
| Référence du réactif : | Substrat: 4-Méthylumbelliféryl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside (Carbosynth réf : EM06426) Tampon Citrate phosphate maison à partir de Di-Sodium hydrogénophosphate dodécahydrate (28028.298 VWR chemicals) et de Citric acid monohydrate (1.00244.0500 Merck) |
| Matériau d'étalonnage (références) : | Poudre de 4-MU: 4-Méthylumbelliférol (M1381 Sigma-Aldrich) |
| Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs : | Étalonnage linéaire en 9 points : 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6 et 8 nmol de 4-MU/prise d'essai jusqu'au 27/02/17 Puis étalonnage linéaire en 11 points : 0, 0,15, 0,3, 0,45, 0,6, 0,75, 1,05, 1,5, 1,95, 2,55 et 3 μ mol de 4-MU/L |

MISE EN ŒUVRE

| | |
|--|--|
| Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode : | Morgane Fournier, Aurélie Servais, Delphine Brodin, Aline Abel, Judith Ducruet |
| Procédure de validation/mode opératoire : | Vérification/validation des performances des méthodes analytiques quantitatives GBAQANA.PRO.004 |
| Procédure de gestion de la portée flexible : | GBAQANA.FOR.008 |
| Période d'étude : | Du : 07/03/17 au 20/10/2017 |
| Date de 1^{ère} utilisation : | |

⁴ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁵ | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|---|--|
| Matière (échantillons) | Identité | 1 / 4 4 | Formation et information du personnel | <ul style="list-style-type: none"> - Charte d'identitovigilance au CHU de Grenoble (IDENT.MAQ.001) -Recommandations générales pour la réalisation des prélèvements biologiques (BIOLPRELEV.PRO.002) -Recommandations Prélèvements Biologiques (BIOLPRELEV.FTE.017) - Réception et enregistrement d'un dossier en EPAT (BEPEPA.PRO.001) -e-learning « Bonnes pratiques de prélèvement et transport des échantillons biologiques » accessible sur : http://theia.learnos.fr/ |
| | Préparation du patient | 1 / 1 1 | Information des patients et préleveurs | <ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHU. - Recommandations générales pour la réalisation des prélèvements biologiques (BIOPRELEV.PRO.002) - e-learning « Bonnes pratiques de prélèvement et transport des échantillons biologiques » accessible sur : http://theia.learnos.fr/ |
| | Type de contenants | 2 / 2 4 | Formation des préleveurs | <ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHU. |
| | Nature et volume de l'échantillon | 2 / 1 2 | Contrôle à réception | <ul style="list-style-type: none"> - Réception et enregistrement d'un dossier en EPAT (BEPEPA.PRO.001) |
| | Délai et température avant traitement analytique | 1 / 1 1 | Gestion logistique (navettes, enceintes de transport) | <ul style="list-style-type: none"> - Procédure de gestion des non-conformités (GBAQPRES.PRO.006) - Gestion des réclamations et non-conformités au sein du LBM du CHU de Grenoble (GBAQGRI.PRO.002) - Modalités de transport des échantillons biologiques entre les unités de soins et le CHUGA (BIOLTRSP.PRO.016) |
| | Prétraitement : centrifugation, ... | 3 / 2 6 | Sédimentation, centrifugations et lyse hypotonique | <ul style="list-style-type: none"> - Préparation des leucocytes (BEPEPA.FTE.003) - Gestion des échantillons biologiques pour les demandes d'analyses réceptionnées durant les périodes de garde au LCG (PLATLCG.MOP.001) - Traitement pré-analytique des prélèvements en EPAT (BEPEPA.FTE.030) |
| | Interférences | | Formation des préleveurs Contrôle à réception | NA (travail sur suspension leucocytaire) |

⁵ A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁵ | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|--|--|
| Milieu | Conditions de conservation des échantillons (t°, ...) | 1 / 4 4 | Métrologie/suivi des enceintes | <ul style="list-style-type: none"> - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) - Fiches fournisseurs - Instructions de conservation et d'utilisation sur FTE Mucopolysaccharidose III type B – détermination de l'activité de la N-acétyl-α-glucosaminidase (NAGLU) sur culot leucocytaire |
| | Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...) | 1 / 2 2 | | |
| | Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur | 1 / 1 1 | Température comprise entre 15 et 40°C Humidité < 80% | Pièce avec température modulée |
| Matériel (équipements) | Surveillance des dérives | 2 / 2 4 | Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...) | <ul style="list-style-type: none"> - Enregistrements des maintenances par le service biomédical - Suivi des CIQ dans l'URT : Gestion des CIQ en Enzymopathie (BEPEPA.PRO.004) |
| | Contamination | 1 / 4 4 | Respect des conditions opératoires du fournisseur | Utilisation de matériel à usage unique |
| | Informatique embarquée | 1 / 1 1 | Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ... | <ul style="list-style-type: none"> Pas d'informatique connectée. Utilisation d'un programme bloqué Impression de chaque manipulation et archivage avec le dossier patient (Archivage des résultats d'examen du secteur EPAT (BEPEPA.FTE.062)) |

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁵ | Éléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|--|---|
| Matériel (réactifs) | Conservation et conditions d'utilisation | 2 / 2 4 | Métrieologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) | <ul style="list-style-type: none"> - Instructions de conservation : fiches fournisseur - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) |
| | Gestion des stocks | 2 / 2 4 | Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks | <ul style="list-style-type: none"> - Procédure de commande des réactifs, consommables de laboratoire et contrôles qualité pour la biologie médicale du CHUG (GBAQACH.PRO.002) - Procédure de réception des réactifs et consommables de laboratoire pour la biologie médicale (GBAQACH.PRO.004) - Gestion des stocks par l'utilisation du logiciel Sapanet (GBAQPRE.MOP.002) |
| | Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles | 2 / 2 4 | Métrieologie des pipettes, des balances et du pH-mètre Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation) | <ul style="list-style-type: none"> - Pipettes de laboratoire : Organisation des contrôles et maintenances (BIOMEDBIO.PRO.001) - Balance : Entretien courant d'une balance de laboratoire (GBAQENT.PRO.005) - pHmètre : suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion 510 (BEPTVS.FOR.010) et étalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) - Instructions de reconstitution : FTE Mucopolysaccharidose III type B – détermination de l'activité de la N-acétyl-α-glucosaminidase (NAGLU) sur culot leucocytaire - Formulaire de traçabilité des réactifs (BEPEPA.FOR.039) |
| Méthode | Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...) | 2 / 2 4 | Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité | Validation/Vérification des performances des méthodes analytiques quantitatives : GBAQANA.PRO.004 |
| | Causes d'incertitude de mesure | 2 / 2 4 | Calcul des incertitudes de mesure | NA car pas d'EEQ ni de matériaux de référence pour le moment |
| Main d'œuvre (Personnel) | Compétence et de du personnel | 2 / 4 8 | Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective) | <ul style="list-style-type: none"> -Fiche d'habilitation Poste activités enzymatiques en EPAT (hors biopsie musculaire) (BEPEPA.FDH.003) -Fiche de poste technicien, poste activités enzymatiques en EPAT hors biopsie musculaire (BEPEPA.FDP.032) -Fiche d'habilitation validation biologique du secteur EPAT (BEPEPA.FDH.005) -Fiche de poste biologiste du secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.028) -Fiche de poste interne secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.029) |

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/5h/mg) | Ecart-type (nmol 4MU/5h/mg) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ⁶ |
|--|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|--------|--------------------|--|-------------------------|
| Solution leucocytaire issue de témoin EFS N1 | 20 | 31.9 | 1.37 | 4.3 | NA | 10 % | CV acceptable |
| Solution leucocytaire issu de témoin EFS N1 dilué au 1/2 | 22 | 19.9 | 1.55 | 7.8 | NA | 10 % | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité de la méthode est conforme aux recommandations.

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/5h/mg) | Ecart-type (nmol 4MU/5h/mg) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ⁵ |
|---|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|--------|--------------------|--|-------------------------|
| Suspension leucocytaire issue d'une poche EFS | 20 | 22.5 | 1.76 | 7.9 | NA | 15 % | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire de la méthode est conforme aux recommandations.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable ; non applicable

| | |
|---------------------------------------|---|
| Opérateur évalué 1 (Delphine Brodin) | Essai sur site le 10/04/2017 à partir de 8 échantillons témoins EFS. Etude statistique réalisée grâce à un test ANOVA. F calculé à 0.78 pour un F théorique (table de Fisher) à 3,47. |
| Opérateur évalué 2 (Morgane Fournier) | |
| Opérateur évalué 3 (Aurélie Servais) | |

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateurs est négligeable pour notre personnel technique.

⁶ Conforme/non conforme

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
Applicable ; non applicable (absence de CIQ externalisé)

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)
Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Non applicable car pas de contrôles externes

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable (technique quantitative)

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ; calcul

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Non applicable car pas d'EEQ ni de matériaux de référence

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable

Limite de détection : 8 nmol de 4-MU/L

Argumentaire de la conclusion : La limite de détection correspond à notre utilisation clinico-biologique.

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable ; non applicable (absence de 2^{ème} méthode ou de 2^{ème} automate)

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|--|-------------------|
| Limite de détection (sur 20 blancs réactifs) | 8 nmol de 4-MU/L |
| Limite de quantification (sur 20 blancs réactifs) | 28 nmol de 4-MU/L |
| Limite supérieure de linéarité : (cf sous processus gamme de 4-MU) | 3 µmol de 4-MU/L |

Argumentaire de la conclusion : La limite supérieure de linéarité correspond à la limite de linéarité du spectrofluorimètre (impossibilité technique d'utiliser un échantillon patient). L'étendue de mesure réalisée correspond à nos besoins clinico-biologique (recherche d'un déficit).

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| Hémolyse | NA (lyse des globules rouges) |
| Turbidité | NA |
| Bilirubine, ictère | NA |
| Médicaments | NA |
| ... | NA |

Argumentaire de la conclusion : Travail à partir d'un culot leucocytaire ne permettant pas la vérification de ces interférences

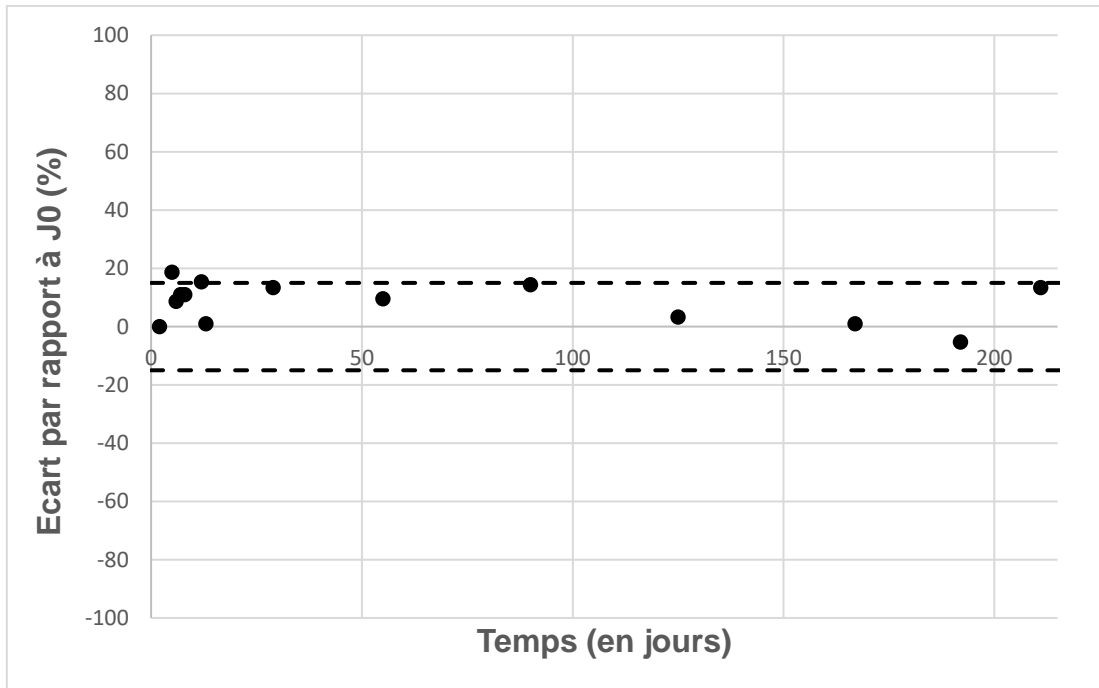
| CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/> | |
|--|----|
| Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...): | NA |
| Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...): | NA |

Argumentaire de la conclusion : Non applicable car tous les matériaux utilisés sont à usage unique.

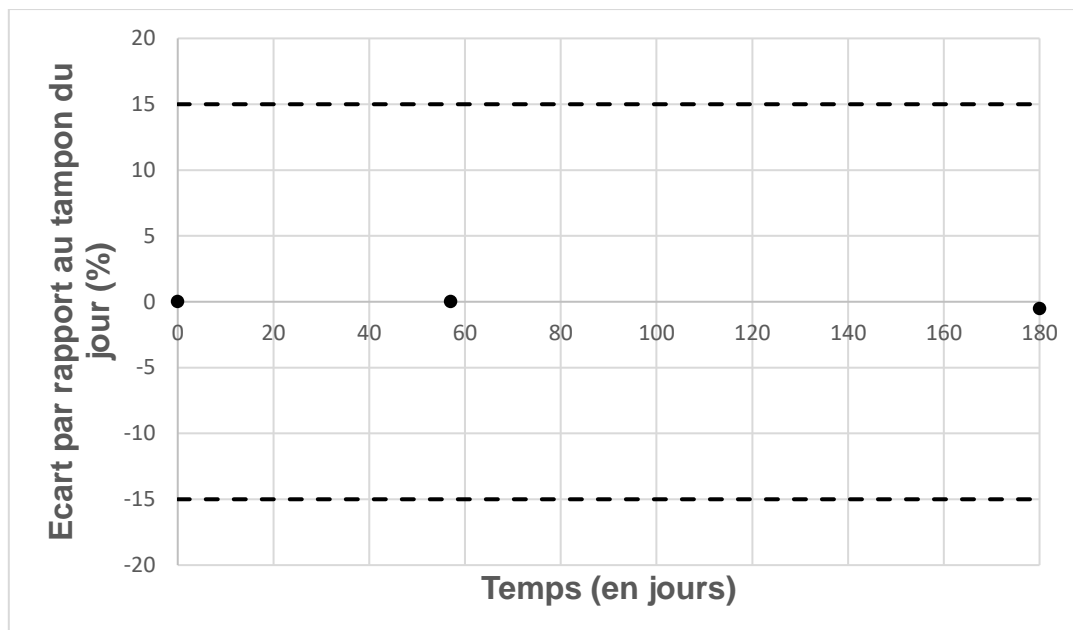
| ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/> | |
|--|--|
| Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...) | - Mesures des pH des tampons réalisées à l'aide d'un pH mètre raccordé NIST (Etalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) et Suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion 510 (BEPTVS.FOR.010)) - Stabilités des tampons vérifiées |
| Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ... | Le substrat reconstitué, le culot leucocytaire et la BSA congelés sont stables 9 mois Le tampon glycine est stable 6 mois |

Argumentaire de la conclusion : Les réactifs sont stables et robustes selon notre utilisation au laboratoire.

Stabilité des réactifs (substrat et BSA congelés) et du culot leucocytaire : Nous effectuons à intervalle de temps régulier des dosages de l'activité NAGLU leucocytaire sur des culots et des réactifs préparés à J0. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à J0. Nous avons fixé la limite de stabilité à +/- 15 % (même CV que pour la reproductibilité)



Stabilité du tampon glycine : Nous effectuons des dosages de l'alpha galactosidase A (maladie de Fabry) avec un tampon d'arrêt glycine préparé à J0 en parallèle d'un tampon glycine préparé le jour même. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au dosage avec tampon glycine frais. Nous avons fixé la limite de stabilité à +/- 15 % (même CV que pour la reproductibilité).



INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)
 Applicable ; non applicable

Valeurs de référence

20,6 à 26,6 nmol/5h/mg de protéines
 Réalisé sur site à partir de 34 témoins

Effet de bord des microplaques
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Identique à l'effet de bord de la gamme de 4-MU.

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme

Autorisée par : Dr Sabrina Vergnaud
 Signature

ANNEXE 2 : SH FORM 43 « Dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS »

(réalisé en collaboration avec le Dr Lysiane Boulet)

UM «Biochimie des Enzymes et des Protéines»

Portée : A B

Examen : routine spécialisé

*Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale***

| |
|--|
| EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE |
| Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS (Dried Blood Spot = papier Guthrie) |
| Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : 2) |

| DESCRIPTION DU PROCESSUS | | |
|---|-------------------------------------|--|
| Gamme de 4-méthylumbéllifèrone | Éléments à vérifier (argumentation) | Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 14. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 15. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 16. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 17. Justesse <input type="checkbox"/> 18. Exactitude <input type="checkbox"/> 19. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 20. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 21. Etendue de mesure <input type="checkbox"/> 22. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 23. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 24. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 25. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 26. Intervalle de référence |
| Activité de l'alpha-N acétylglucosaminidase sur DBS | Éléments à vérifier (argumentation) | Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 14. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 15. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 16. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 17. Justesse <input type="checkbox"/> 18. Exactitude <input type="checkbox"/> 19. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 20. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 21. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 22. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 23. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 24. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 25. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 26. Intervalle de référence |

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

SOUS-PROCESSUS 1 : Gamme de 4-méthylumbelliféronPortée A ; Portée B (méthode maison)

Cf SH FORM « Diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur leucocytes »

SOUS-PROCESSUS 2 : Activité de l'alpha-N acétylglucosaminidase sur DBSPortée A ; Portée B (technique et réactifs maisons)**DESCRIPTION DE LA METHODE**

| | |
|--|---|
| Analyte / Mesurande : | α -N-acétylglucosaminidase (NAGLU) |
| Principe de la Méthode : | Fluorescence : libération de 4-méthylumbelliféron par l'action enzymatique de l' α -N-acétylglucosaminidase |
| Type d'échantillon primaire : | Sang total déposé sur papier Guthrie (= DBS) |
| Type de récipient, additifs : | Possibilité d'utiliser du sang total prélevé sur tube EDTA ou héparinate de lithium, déposé ensuite sur papier buvard |
| Prétraitement de l'échantillon : | Aucun |
| Unités : | nmol de 4-MU/h/mL |
| Critères d'interprétation⁷ : | 3,3 – 6,2 nmol de 4-MU/h/mL de sang total Réalisé au laboratoire sur 34 sujets sains |
| Marquage CE (Oui/Non) : | Non |
| Codage C.N.Q. (s'il existe) : | NA |
| Équipement (instrument, analyseur, etc.) : | Mithras LB 940 BERTHOLD Technologies |
| Référence du réactif : | Substrat: 4-Méthylumbelliféryl 2-acétamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside (Carbosynth réf : EM06426) Tampon acétate de sodium maison préparé à partir d'acide acétique glacial (n° 607-002-00-6), d'acétate de sodium anhydre (n°CAS : 127-09-3) et d'eau MilliQ |
| Matériau d'étalonnage (références) : | Poudre de 4-Méthylumbelliféron (M1381 Sigma-Aldrich) |
| Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs : | Étalonnage linéaire en 12 points : 0, 0.025, 0.05, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 2, 3, 4 et 5 μ mol de 4-MU/L jusqu'au 27/02/17 Puis étalonnage linéaire en 11 points : 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 1.05, 1.5, 1.95, 2.55 et 3 μ mol de 4-MU/L |

MISE EN ŒUVRE

| | |
|--|--|
| Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode : | Morgane Fournier, Aurélie Servais, Delphine Brodin, Aline Abel, Judith Ducruet |
| Procédure de validation/mode opératoire : | Vérification/validation des performances des méthodes analytiques quantitatives GBAQANA.PRO.004 |
| Procédure de gestion de la portée flexible : | GBAQANA.FOR.008 |
| Période d'étude : | Du 14/12/16 |
| Date de 1^{ère} utilisation : | |

⁷ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁸ | Éléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|---|--|
| Matière (échantillons) | Identité | 1 / 4 4 | Formation et information du personnel | <ul style="list-style-type: none"> - Charte d'identitovigilance au CHU de Grenoble (IDENT.MAQ.001) -Recommandations générales pour la réalisation des prélèvements biologiques (BIOLPRELEV.PRO.002) -Recommandations Prélèvements Biologiques (BIOLPRELEV.FTE.017) - Réception et enregistrement d'un dossier en EPAT BEPEPA.PRO.001 -e-learning « Bonnes pratiques de prélèvement et transport des échantillons biologiques » accessible sur : http://theia.learneos.fr/ |
| | Préparation du patient | 1 / 1 1 | Information des patients et préleveurs | <ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHU. - Recommandations générales pour la réalisation des prélèvements biologiques (BIOPRELEV.PRO.002) - e-learning « Bonnes pratiques de prélèvement et transport des échantillons biologiques » accessible sur : http://theia.learneos.fr/ |
| | Type de contenants | 2 / 2 4 | Formation des préleveurs | <ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHU. |
| | Nature et volume de l'échantillon | 2 / 2 4 | Contrôle à réception | <ul style="list-style-type: none"> - Réalisation d'un dried blood spot (DBS) à l'attention des cliniciens (BEPEPA.FTE.035) |
| | Délai et température avant traitement analytique | 1 / 1 1 | Gestion logistique (navettes, enceintes de transport) | <ul style="list-style-type: none"> - Réception et enregistrement d'un dossier en EPAT (BEPEPA.PRO.001) - Procédure de gestion des non-conformités (GBAQPRE.PRO.006) - Gestion des réclamations et non-conformités au sein du LBM du CHU de Grenoble (GBAQGRI.PRO.002) |
| | Prétraitement : centrifugation, ... | 1 / 1 1 | Dépôt de sang total sur DBS | <ul style="list-style-type: none"> -Réalisation d'un Dried Blood Spot (Guthrie) en EPAT (BEPEPA.FTE.045) - Gestion des échantillons biologiques pour les demandes d'analyses réceptionnées durant les périodes de garde au LCG (PLATLCG.MOP.001) - Traitement pré-analytique des prélèvements en EPAT (BEPEPA.FTE.030) |
| | Interférences | | Formation des préleveurs Contrôle à réception | NA |

⁸ A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁸ | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|--|---|
| Milieu | Conditions de conservation des échantillons (t°, ...) | 1 / 4 4 | Métrologie/suivi des enceintes | <ul style="list-style-type: none"> - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) - Conditions de conservations : fiches fournisseurs - Conditions de conservation et d'utilisation : Maladie de Sanfilippo B sur DBS |
| | Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...) | 1 / 2 2 | | |
| | Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur | 1 / 1 1 | Température comprise entre 15 et 40°C Humidité < 80% | Pièce avec température modulée |
| Matériel (équipements) | Surveillance des dérives | 2 / 2 4 | Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...) | <ul style="list-style-type: none"> - Enregistrements des maintenances par le service biomédical - Suivi des CIQ dans l'URT : Gestion des CIQ en Enzymopathie (BEPEPA.PRO.004) |
| | Contamination | 1 / 4 4 | Respect des conditions opératoires | Utilisation de matériel à usage unique |
| | Informatique embarquée | 1 / 1 1 | Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ... | <ul style="list-style-type: none"> - Pas d'informatique connectée. - Utilisation d'un programme bloqué - Impression de chaque manipulation et archivage avec le dossier patient (Archivage des résultats d'examen du secteur EPAT (BEPEPA.FTE.062)) |
| Matériel (réactifs) | Conservation et conditions d'utilisation | 2 / 2 4 | Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) | <ul style="list-style-type: none"> - Conditions de conservation : fiches fournisseur - Politique de métrologie du LBM (BIOMEDBIO.PRO.004) - Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (BIOMEDBIO.PRO.005) - Enregistrements métrologiques via le logiciel Sirius (GBAQGRI.MOP.002) |
| | Gestion des stocks | 2 / 2 4 | Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks | <ul style="list-style-type: none"> - Procédure de commande des réactifs, consommables de laboratoire et contrôles qualité pour la biologie médicale du CHUG (GBAQACH.PRO.002) - Procédure de réception des réactifs et consommables de laboratoire pour la biologie médicale (GBAQACH.PRO.004) - Gestion des stocks par l'utilisation du logiciel Sapanet (GBAQPRE.MOP.002) |
| | Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles | 2 / 2 4 | Métrologie des pipettes, des balances et du pH-mètre Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation) | <ul style="list-style-type: none"> - Pipettes de laboratoire : Organisation des contrôles et maintenances (BIOMEDBIO.PRO.001) - Balance : Entretien courant d'une balance de laboratoire (GBAQENT.PRO.005) - pHmètre : suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion 510 (BEPTVS.FOR.010) et étalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) - Instructions de reconstitution : Maladie de Fabry sur DBS (BEPEPA.FTE.022) - Formulaire de traçabilité des réactifs (BEPEPA.FOR.039) |
| Méthode | Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...) | 2 / 2 4 | Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité | Validation/Vérification des performances des méthodes analytiques quantitatives (GBAQANA.PRO.004) |

MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

| 5M | Points critiques | Echelle de criticité ⁸ | Eléments à maîtriser | Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire |
|-----------------------------|--|-----------------------------------|--|--|
| | Causes d'incertitude de mesure | 2 / 2 4 | Calcul des incertitudes de mesure | NA car pas d'EEQ ni matériaux de référence |
| Main d'œuvre (Personnel) | Compétence et de maintien de compétence du personnel | 2 / 4 8 | Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective) | <ul style="list-style-type: none"> -Fiche d'habilitation Poste activités enzymatiques en EPAT (hors biopsie musculaire) (BEPEPA.FDH.003) -Fiche de poste technicien, poste activités enzymatiques en EPAT hors biopsie musculaire (BEPEPA.FDP.032) -Fiche d'habilitation validation biologique du secteur EPAT (BEPEPA.FDH.005) -Fiche de poste biologiste du secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.028) -Fiche de poste interne secteur enzymopathies (EPAT) (BEPEPA.FDP.029) |

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE

Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4-MU/h/mL) | Ecart-type (nmol 4-MU/h/mL) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire (estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ⁹ |
|--|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|--------|--------------------|---|-------------------------|
| DBS issu d'un patient N1 (normoleucocytaire) | 20 | 10.2 | 0.62 | 6.1 | NA | 10 % | CV acceptable |
| DBS issu d'un patient N2 (leucopénique) | 23 | 1.0 | 0.05 | 5.2 | NA | 10 % | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité de la méthode est conforme aux recommandations.

FIDELITE INTERMEDIAIRE

Applicable ; non applicable (à justifier)

| Echantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne (nmol 4MU/h/mL) | Ecart-type (nmol 4MU/h/mL) | CV (%) | CV (%) fournisseur | CV (%) retenu par le laboratoire (estimation selon les tables de RICOS) | Conclusion ⁵ |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|--------|--------------------|---|-------------------------|
| DBS issu d'un témoin EFS | 20 | 4.7 | 0.28 | 6.0 | NA | 15 % | CV acceptable |

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire de la méthode est conforme aux recommandations

VARIABILITE INTER-OPERATEURS

Applicable ; non applicable

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Opérateur évalué 1 (Morgane Fournier) | Essai en cours au laboratoire |
| Opérateur évalué 2 (Aurélie Servais) | |
| Opérateur évalué 3 (Aline Abel) | |
| Opérateur évalué 4 (Delphine Brodin) | |

Argumentaire de la conclusion : en cours au laboratoire

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)

Applicable ; non applicable (absence de CIQ externalisé)

⁹ Conforme/non conforme

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)

Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Non applicable car pas de contrôle externe de la qualité.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE

(étude expérimentale indispensable en portée B)

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)

Applicable ; non applicable (technique quantitative)

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :

Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ; calcul

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : NA car pas d'EEQ ni de matériaux de référence

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)

Applicable ; non applicable

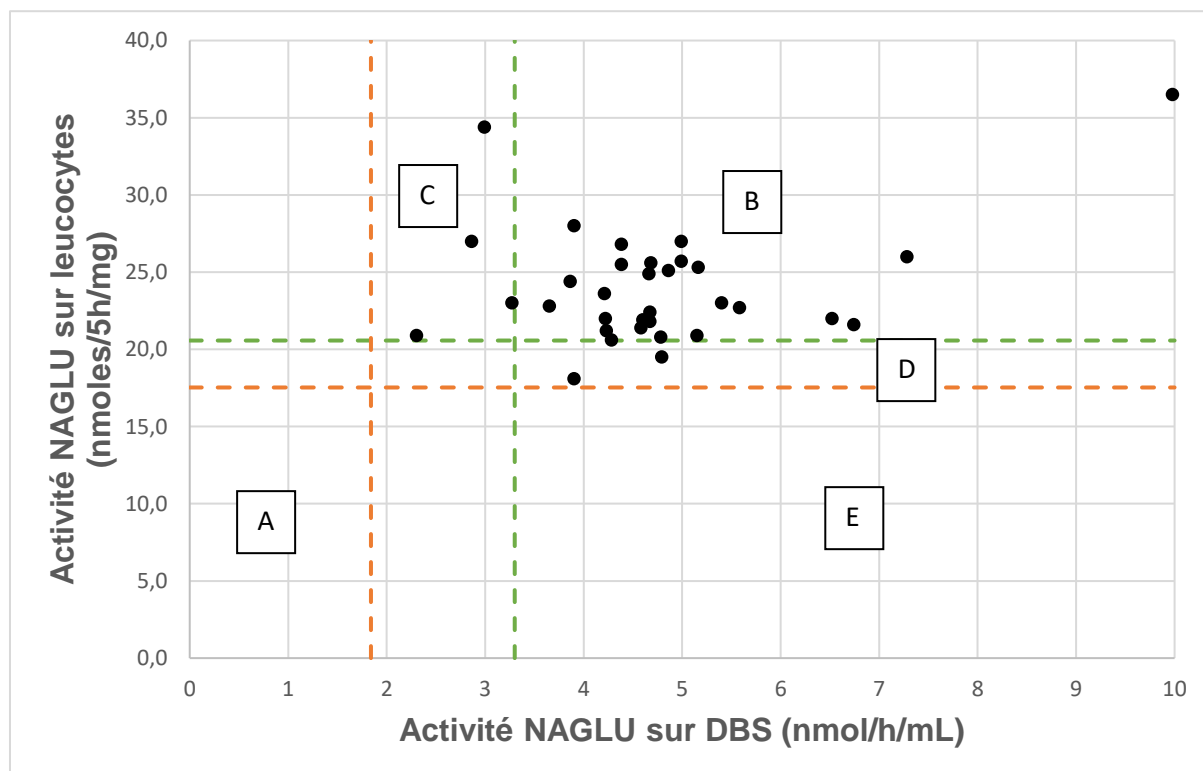
Limite de détection :

0.061 μmol de 4-MU/mL

Argumentaire de la conclusion : La limite de détection est compatible avec notre utilisation clinico-biologique.

COMPARAISON DE METHODES :

Applicable ; non applicable (absence de 2^{ème} méthode ou 2^{ème} automate)



Comparaison de méthode DBS (dépistage) et leucocytes (diagnostic) chez 34 individus sains

Les lignes en pointillés vertes correspondent à la borne basse des valeurs de référence et les oranges correspondent à la moyenne de référence – 2 écart type (M-2ET).
Différentes zones du graphique sont délimitées par des lettres (A, B, C, D).

La zone A du graphique correspond aux résultats abaissés en DBS et en leucocytes. Cette case correspond aux patients atteints par la maladie de Sanfilippo B. Aucun point n'est présent dans cette zone car nous ne disposons pas à ce jour d'échantillons de patients atteints.

La zone B correspond aux résultats normaux en DBS et sur leucocytes. La majorité des témoins sains sont présents dans cette catégorie.

La zone C correspond aux résultats douteux en DBS et normaux en leucocytes. Quatre témoins sains sont présents dans cette catégorie. La conduite à tenir en cas de DBS douteux est de refaire la technique puis, si le résultat est le même, de contrôler le résultat sur leucocytes.

La zone D correspond aux résultats normaux en DBS et légèrement abaissés sur leucocytes. En pratique, un résultat aussi peu abaissé sur leucocytes aurait été interprété comme normal. Un contrôle sur un deuxième prélèvement aurait pu être effectué.

L'important dans cette étude est de ne retrouver aucun point ayant un résultat normal en DBS et effondré en leucocytes (zone E).

La valeur prédictive négative du dépistage de la maladie de Sanfilippo B sur DBS est de 94 % : 32 résultats normaux en DBS sont normaux en leucocytes. Les 2 patients restant sont légèrement abaissés en leucocytes et auraient été recontrôlés.

Finalement, nous avons montré que les deux techniques sont cohérentes entre elles.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour :
troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|--|----------------------|
| Limite de détection (sur 20 blancs réactifs) | 0.061 µmol de 4-MU/L |
| Limite de quantification (sur 20 blancs réactifs) | 0.202 µmol de 4-MU/L |
| Limite supérieure de linéarité | 3 µmol de 4-MU/L |

Argumentaire de la conclusion : La limite supérieure de linéarité correspond à la limite de linéarité du spectrofluorimètre (impossibilité technique d'utiliser un échantillon patient). L'étendue de mesure réalisée correspond à nos besoins clinico-biologique (recherche d'un déficit).

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|---------------------------|---|
| Hémolyse | NA |
| Turbidité | NA |
| Bilirubine, ictère | NA |
| Médicaments | NA |
| Hémoglobine | Interférence spectroscopique avec l'hème de l'hémoglobine. Effet de quenching de fluorescence |

Argumentaire de la conclusion : Travail à partir d'un spot de sang total déposé sur buvard, ne permettant pas la vérification de certaines interférences (turbidité, ictère...). Interférence avec l'hémoglobine : L'interprétation des résultats de dépistage sur DBS est réalisée en parallèle d'une numération sanguine, ce qui permet de s'affranchir de cette interférence. En cas d'anémie sévère ou de polyglobulie, un dépistage par DBS n'est pas recommandé et un diagnostic sur leucocytes sera réalisé.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
Applicable ; non applicable (à justifier)

| | |
|--|--|
| Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) : | Essai sur site de la contamination de la pince sur la manipulation des MPS III. Contamination inférieure au coefficient de variation de fidélité intermédiaire de la technique. |
|--|--|

Argumentaire de la conclusion : Tous les matériaux utilisés sont à usage unique hormis la pince pour laquelle il n'existe pas de contamination.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS
(étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

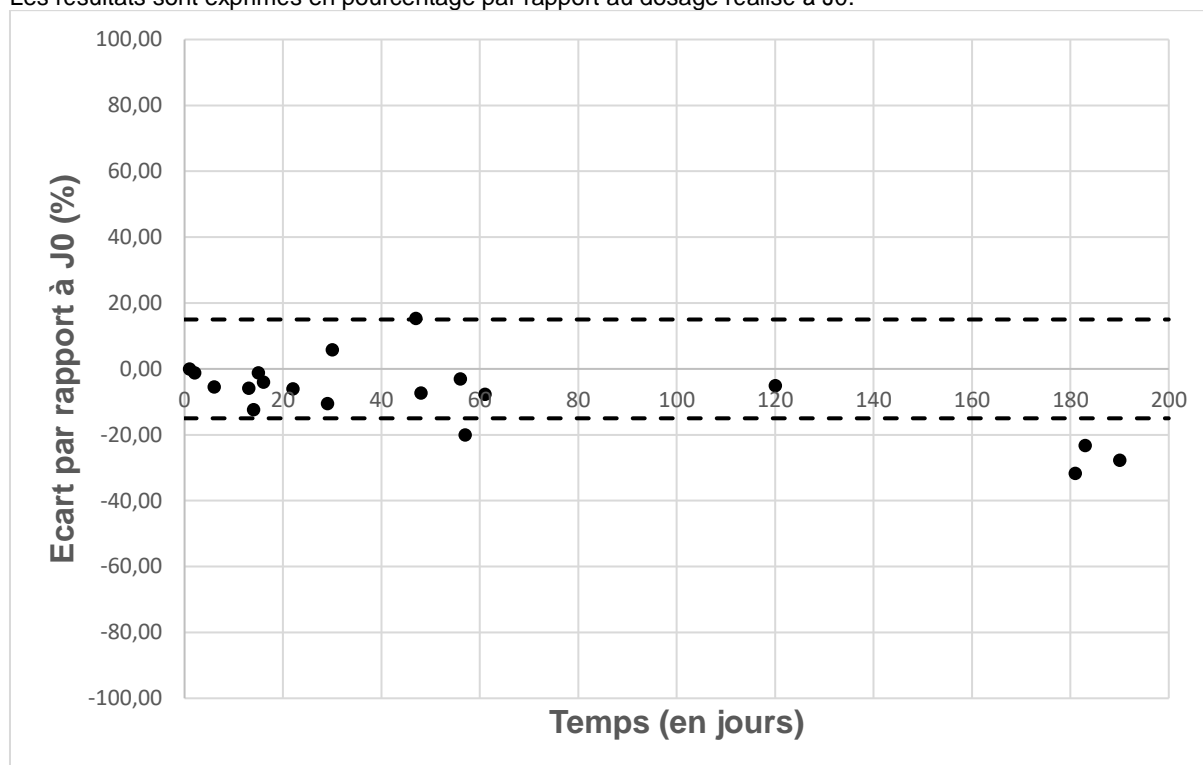
| | |
|---|--|
| Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...) | - Mesures des pH des tampons réalisées à l'aide d'un pH mètre raccordé NIST (Etalonnage d'un pH-mètre (GBAQMMM.MOP.002) et Suivi étalonnage du pHmètre Cyberscan Ion 510 (BEPTVS.FOR.010)) - Stabilités des tampons vérifiées |
| Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ... | Le substrat reconstitué est stable 8 mois L'échantillon DBS est stable 4 mois. Le tampon glycine est stable 6 mois (cf SH FORM diagnostic de la maladie de Sanfilippo B sur culot leucocytaire) |

Argumentaire de la conclusion : Les réactifs sont stables et robustes selon notre utilisation au laboratoire.

Etude de la stabilité des réactifs de la technique DBS et de l'échantillon DBS :

Nous déposons plusieurs cartons de DBS à partir d'un témoin EFS et nous reconstituons le substrat qui est aliquoté et conservé à -80 °C, à J0. Un premier dosage à J0 est effectué et sera pris comme référence pour les dosages suivants.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au dosage réalisé à J0.



Nous observons deux points (à J47 et J57) qui sortent légèrement des bornes de stabilité mais les points suivants sont conformes à la limite de stabilité. Cela peut s'expliquer par le fait que la valeur à J0 a été déterminée grâce à une seule valeur de dosage et non grâce à une moyenne de plusieurs dosages à J0.

En revanche, les points réalisés à 6 mois sont en dessous de la borne inférieure de stabilité de façon répétée (à 3 reprises). Nous pouvons mettre en cause soit la stabilité du DBS soit la stabilité du substrat. Pour mettre en évidence la cause de cette perte d'activité, nous réalisons le dosage de ce même échantillon DBS avec un substrat du même lot fraîchement reconstituée en parallèle du substrat reconstitué à J0 (il y a 6 mois). Nous obtenons les mêmes résultats ce qui signifie que c'est l'échantillon DBS qui a perdu sa stabilité et non le substrat. La dernière valeur dans les bornes étant à 4 mois, nous définissons la stabilité des échantillons DBS à 4 mois pour cette technique. Nous avons néanmoins continué à suivre la stabilité du substrat de la technique DBS en réalisant en parallèle, sur le même échantillon, un dosage avec le substrat reconstitué à J0 et un substrat

fraichement reconstitué. Nous estimons finalement que le substrat de la technique DBS est stable pendant 8 mois dans les conditions de conservation définies.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)
Applicable ; non applicable

Valeurs de référence

3,3 – 6,2 nmol de 4-MU/h/mL
Réalisé au laboratoire sur 34 sujets sains

Effet de bord des microplaques
Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Absence d'effet de bord (cf effet de bord de la gamme de 4-MU).

DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme

Autorisée par : Dr Sabrina Vergnaud
Signature

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Judith DUCRUET

Mise au point et validation de méthode du dosage de la N-acétylGlucosaminidase (NAGLU) sur leucocytes et sur goutte de sang séchée : diagnostic de la maladie de Sanfilippo type B

Résumé : La maladie de Sanfilippo de type B est une maladie de faible prévalence mais dont la clinique peut être extrêmement sévère. Souvent confondue avec des troubles comportementaux tels que l'autisme ou l'hyperactivité, la prise en charge des patients souffre souvent d'un retard de diagnostic. De nouveaux traitements de la mucopolysaccharidose de type III B arrivant sur le marché, nous avons vu l'opportunité de développer des techniques de diagnostic et de dépistage performantes afin de mieux répondre aux besoins des cliniciens et des patients. Au cours de ce travail, nous avons ainsi optimisé la technique de diagnostic par mesure de l'activité enzymatique de la N-acétylGlucosaminidase (ou NAGLU) sur leucocytes. D'autre part, et au vu de l'errance diagnostic dans cette pathologie, nous avons développé une technique de dépistage par mesure de l'activité enzymatique de la NAGLU sur goutte de sang séchée ou Dried Blood Spot (DBS). Celle-ci présente l'avantage d'être moins contraignante et plus facile à réaliser que la méthode diagnostic sur leucocytes. Cela permettrait une utilisation plus large en routine, néanmoins cette technique ne se substituera pas à la technique de référence (dosage de la NAGLU sur leucocytes), mais permettra un diagnostic d'exclusion ou une orientation vers la méthode diagnostique de référence. En vue de leur accréditation au sein du laboratoire, nous avons réalisé la validation de méthode en portée B de ces deux examens, dans le respect des exigences normatives en vigueur pour les examens de biologie médicale (NF EN ISO 15189). Ces travaux ont permis de démontrer la conformité de ces méthodes vis-à-vis des exigences clinico-biologiques.

Mots clés : Sanfilippo, Mucopolysaccharidose type III, N-acétylGlucosaminidase, NAGLU, goutte de sang séchée, DBS

Filière : Pharmacie (Biologie médicale)

Method development and validation for the measure of N-acetylGlucosaminidase (NAGLU) on leukocytes and on dried blood spots : diagnosis of Sanfilippo syndrome type B

Abstract : Sanfilippo syndrome type B is a rare disease with sometimes extremely severe clinical signs. The patient care is often delayed as the disease diagnostic is often mistaken with behavioural disorders such as autism or hyperactivity. As new treatments for mucopolysaccharidosis type III B syndrome are currently reaching the market, we aimed to develop effective diagnostic and screening techniques to best meet the patients and clinicians meets. We optimized in this study the diagnostic method by measuring the enzymatic activity of N-acetylGlucosaminidase (or NAGLU) produced by leukocytes. Furthermore, considering the diagnostic wandering in this pathology, we developed a screening technique by measuring the enzymatic activity of NAGLU on Dried Blood Spot (DBS). This technique has the advantage of being less restrictive and easier to perform than the leukocyte diagnostic method, and would allow a wider use in routine. However this technique will not replace the standard technique (NAGLU leukocyte assay), but will exclude a diagnosis of Sanfilippo syndrome type B or drive the patient to the reference diagnostic method. In the view of their accreditation process for routine laboratory work, we performed the validation in scope B of these two exams, in compliance with the normative applicable requirements in the field of medical biology examinations (NF EN ISO 15189). This work demonstrated that these methods comply with clinical and biological requirements.

Keywords : Sanfilippo, Mucopolysaccharidosis type III, N-acetylGlucosaminidase, NAGLU, dried blood spot, DBS