



HAL
open science

Étude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur papier buvard

Samuel Amintas

► **To cite this version:**

Samuel Amintas. Étude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur papier buvard. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01876510

HAL Id: dumas-01876510

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01876510>

Submitted on 18 Sep 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.

Étude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur papier buvard

Samuel Amintas

► **To cite this version:**

Samuel Amintas. Étude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur papier buvard. Sciences pharmaceutiques. 2018. <dumas-01876510>

HAL Id: dumas-01876510

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01876510>

Submitted on 18 Sep 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.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE 2018

THESE N°57

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Tenant lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 29 juin 2018 par

AMINTAS Samuel

Né le 5 décembre 1988 à RENNES (35)

**Etude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur
tâche de sang séché sur papier buvard**

Directeur de thèse : Mr le Dr MESLI Samir

JURY

Mme le professeur DUFOURCQ Pascale

Président

Mr le professeur MOREAU-GAUDRY François

Assesseur

Mr le Docteur MESLI SAMIR

Assesseur

Mme le Docteur ROCHE Sandrine

Assesseur

Mme le Docteur GENNERO Isabelle

Assesseur

Remerciements :

Au Professeur Pascale DUFOURCQ,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Samir MESLI,

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordé en acceptant d'encadrer ce travail. Merci encore de m'avoir donné goût au métabolisme et de m'y avoir formé, toujours dans la bonne humeur et la complicité. C'est à regret que nos chemins professionnels s'éloignent mais sois assuré du souvenir heureux que je garderai de notre collaboration.

Au Professeur François MOREAU-GAUDRY,

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Merci également pour les précieux conseils que vous avez pu me donner durant mon année de Master 2. En espérant pouvoir poursuivre notre collaboration au sein de l'équipe « Biothérapies » dans le futur.

Au Docteur Sandrine ROCHE,

Je te remercie d'avoir accepté de prendre part ce jury et de toute l'attention que tu voudras accorder à ce travail. Cela a été un réel plaisir de te côtoyer et de collaborer avec toi au cours de mes stages en maladies métaboliques.

Au Docteur Isabelle Gennero,

Merci encore d'avoir accepté de prendre part à ce jury. Merci aussi pour ton encadrement, tes conseils et ta disponibilité durant mon semestre toulousain.

Aux sociétés IMAGENE et Perkin Elmer et plus particulièrement à Delphine Coudy, Sophie Tuffet et Marthe Colotte ainsi qu'à Marc-Antoine Foure, pour leur participation active à cette étude ainsi que pour leur aide matérielle et financière.

A mes parents,

Sans qui personne ne lirait ceci.

Pour m'avoir élevé, éduqué et surtout pour m'avoir toujours aimé et soutenu.

A Papi et Mamie,

Pour les mardis soir au Thabor à la sortie de l'école, la cuisine normande à la crème et celle antillaise plus épicée, les étés à Piriac et pour tout votre amour.

Mamie, enfin un pharmacien diplômé dans la famille.

A Mamie Angèle,

Pour les semaines en camping à Quiberon, les galettes trempées dans le lait ribot et surtout pour ta grande douceur qui malgré le temps passé reste dans mon souvenir.

J'aurais aimé te connaître un peu plus.

A mes oncles et tantes, cousins, cousines et au reste de ma famille,

Pour tous les bons moments que nous avons partagé.

A Marine,

Merci de partager ma vie au quotidien,

De supporter mes incessantes pitreries,

D'en rire la plupart du temps,

Et de m'aimer à chaque instant.

A Jean-Maurice alias « DJ Momo »,

La belle époque des matchs de basket, des soirées bar/fléchettes et des matchs de 2K.

Une belle amitié qui dure et qui durera malgré la distance.

A l'équipe médicale et technique du secteur des Maladies Héritaires du métabolisme du laboratoire de Biochimie du CHU de Bordeaux, en particulier à Samir et Isabelle.

Un grand merci pour votre accueil, votre gentillesse et la formation de qualité que vous m'avez dispensé. Les 2 semestres passés à vos côtés m'ont énormément apporté aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

A l'équipe de recherche « Biother ».

Une équipe où la bonne ambiance est toujours au rendez-vous. Un merci particulier à Sandrine pour ton encadrement, tes conseils et ton humour qui ont une part certaine dans la poursuite de mon parcours professionnel en recherche.

Aux autres biologistes et technicien(ne)s rencontrés au fil des stages de mon internat.

Merci pour toutes les connaissances que j'ai pu acquérir à vos côtés.

A tous les copains de la fac,

Lolo, Couguy, Korben, PM, Vice, Panpan, Fillot et tous les autres.

Pour les just dance yogging, les aprêms à (devant ?) la BU et le fameux « clergé pharmaceutique »

Les années étudiantes les plus « green » qui soient !!

Enfin, à tous les internes que j'ai pu côtoyer au cours de ces 5 années, en stage, à l'internat, au cours de ma vie associative à la FNSIP ou encore autour d'une partie de babyfoot.

La liste est longue, tellement que je n'en ferais pas de peur d'en oublier certains.

Vous avez tous contribué à faire de mon internat une des plus belles périodes de ma vie. Une page se tourne bientôt mais elle est remplie de jolis souvenirs.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	10
1 / Le dépistage néonatal.....	1
1.1 / Historique du dépistage néonatal.....	1
1.2 / Principe et critères	2
1.2.1 / Principe	2
1.2.2 / Critères de Wilson et Junger	3
1.3 / Le dépistage néonatal français.....	4
1.3.1 / Les acteurs du DNN.....	4
1.3.1.1 / Les associations régionales.....	4
1.3.1.2 / L'AFDPHE	5
1.3.1.3 / La tutelle et le financement.....	6
1.3.2 / Les pathologies dépistées	6
1.3.3 / Le prélèvement du DNN.....	8
1.3.4 / L'analyse biologique	10
1.3.4.1 / Les techniques de dosage.....	10
1.3.4.2 / La validation biologique, le rendu et la transmission des résultats.....	14
1.3.5 / Du test de dépistage à la prise en charge médicale du nouveau-né : Exemple de la PCU	15
1.3.6 / Bilan du dépistage français en 2016	17
1.3.7 / La nouvelle organisation nationale du DNN.....	17
1.3.8 / Évolution du DNN français	19
1.4 / Le dépistage néonatal en Europe et dans le monde.....	21
1.5 / Dépistage néonatal et progrès technologiques.....	24
2 / Conservation des tâches de sang résiduelles	27
2.1 / Intérêt et applications.....	27
2.2 / Questions éthiques de la conservation et de l'utilisation des tâches de sang résiduelles ...	28
2.3 / Conditions de conservations des tâches de sang résiduelles et stabilité des marqueurs biologiques.....	30

3 / Étude Stabiospot.....	32
3.1 / Objectifs.....	32
3.2 / Matériel et méthodes.....	34
3.2.1 / Plan expérimental.....	34
3.2.1.1 / Etudes 1 et 2 : études de dégradation accélérée.....	34
3.2.1.2 / Etude 3 : étude de conservation à long terme.....	35
3.2.2 / Biomarqueurs étudiés.....	37
3.2.3 / Matériels biologiques utilisés et préparation des échantillons.....	38
3.2.4 / Encapsulation des échantillons par la société IMAGENE®.....	39
3.2.5 / Contrôle et mesure du pourcentage d'humidité et de la température.....	40
3.2.6 / Techniques de dosage des différents biomarqueurs.....	40
3.2.7 / Analyses des résultats et statistiques.....	41
3.3 / Résultats.....	43
3.3.1 / Performances des méthodes analytiques.....	43
3.3.2 / Études 1 et 2 : Etudes de dégradation accélérée.....	47
3.3.2.1 / Étude 1 : Dégradation des biomarqueurs en atmosphère humide.....	47
3.3.2.2 / Étude 2 : Dégradation des biomarqueurs en atmosphère humide et chaude.....	61
3.3.2.3 / Comparaison des études 1 et 2.....	66
3.3.3 / Etude 3 : Etude de conservation à long terme.....	69
4 / Discussion.....	93
4.1 / Sensibilité des biomarqueurs à la température et l'hygrométrie.....	94
4.2 / Stabilité des biomarqueurs à long terme et conservation des buvards.....	97
4.3 / Performances de la capsule IMAGENE®.....	99
5 / Conclusion et perspectives.....	101
Bibliographie.....	104

Liste des abréviations

17OHP : 17-hydroxyprogésterone

A FDPHE : Association française prévention des handicaps de l'enfant

ARS : Agence régionale de santé

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CNAMTS : Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés

CNCDN : Centre national de coordination du dépistage néonatal

CRDN : Centre régional de dépistage néonatal

DGS : Direction générale de la santé

DNN : Dépistage néonatal

HC : Hypothyroïdie congénitale

HCS : Hypertrophie congénitale des surrénales

HSV : *Herpès simplex virus*

HTLV : *Human T-lymphotropic virus*

ISNS : International Society for Neonatal Screening

MCADD : Déficit en déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne

MHM : Maladies héréditaires du métabolisme

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

MSN : Mort subite du nouveau-né

NGS : Next generation sequencing

PCU : Phénylcétonurie

Phe : Phénylalanine

RBS : Residual blood spot

RUSP : Recommended Uniform Screening Panel

SACHDNC : Secretary of Health and Human Services Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children

SCADD : Déficit en déshydrogénase des acides gras à chaîne courte

SFBC : Société française de biologie clinique

SFEIM : Société française des erreurs innées du métabolisme

SFDN : Société française de dépistage néonatal

TA : Température ambiante

TIR : Trypsine immunoréactive

TSH : Thyroid-stimulating hormon / Thyréostimuline

VLCADD : Déficit en déshydrogénase des acides gras à très longue chaîne

Liste des figures

Figure 1 - Le dépistage néonatal : De l'information des parents à la prise en charge de l'enfant. _____	7
Figure 2 - Prélèvement sanguin sur carton Guthrie du dépistage néonatal par ponction capillaire au talon. ____	9
Figure 3 - Prélèvement sanguin sur carton Guthrie du dépistage néonatal au dos de la main. _____	9
Figure 4 - Arbre décisionnel pour le test biologique et la prise en charge des nouveau-nés suspects de phénylcétonurie. _____	16
Figure 5 - Schéma de la nouvelle organisation du dépistage néonatal français. _____	18
Figure 6 - Carte européenne du dépistage néonatal. _____	23
Figure 7 - La préparation des échantillons et les différents acteurs de l'étude STABIOSPOT. _____	33
Figure 8 - Plan expérimental des études 1, 2 et 3. _____	36
Figure 9 - Technologie de miniencapsulation d'échantillon biologique IMAGENE®. _____	39
Figure 10 - Concentrations résiduelles de l'acide aminé ornithine en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	47
Figure 11 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), acide aspartique (B), citrulline(C), glycine(D), leucine (E), et phénylalanine (F), tyrosine (G) et valine (H), en fonction des conditions de conservation au cours des études 1 et 2. _____	48
Figure 12 - Concentrations résiduelles des acides aminés arginine (A), acide glutamique (B) et méthionine (C), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	49
Figure 13 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre C0 en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	50
Figure 14 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne courte en C2(A), C3(B), C4(C) et C6(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	51
Figure 15 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne courte en C5(A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	52
Figure 16 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8(A), C10(B) et C12(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	53
Figure 17 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne longue en C14(A), C16(B) et C18(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	54
Figure 18 - Concentrations résiduelles de l'hémoglobine S en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	55
Figure 19 - Concentrations résiduelles des marqueurs 17OHP (A), IRT (B), TSH (C) et T4T (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	56
Figure 20 - Concentrations résiduelles des marqueurs TREC haut (A) et bas (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2. _____	57
Figure 21 - Pourcentages de perte finaux (J32) des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 1. _____	58

Figure 22 - Pourcentages de perte finaux (J32) des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 1. _____	59
Figure 23 - Pourcentages de perte finaux (J32) des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 2. _____	63
Figure 24 - Pourcentages de perte finaux (J32) des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 2. _____	64
Figure 25 - Pourcentages de perte finaux (J32) comparés des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte au cours des études 1 (PPF 1) et 2 (PPF2). _____	67
Figure 26 - Pourcentages de perte finaux (J32) comparés des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte au cours des études 1 (PPF 1) et 2 (PPF2). _____	68
Figure 27 - Concentrations résiduelles des acides aminés méthionine (A) et tyrosine (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3. _____	72
Figure 28 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), arginine (B), acide aspartique (C), citrulline (D), glutamine (E), glycine (F), leucine (G), phénylalanine (H), valine (I) et ornithine (J), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3. _____	73
Figure 29 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des acides aminés pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP). _____	74
Figure 30 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines en C5 (A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3. _____	75
Figure 31 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre (A) et des acylcarnitines à chaîne courte en C2 (B), C3 (C), C4 (D) et C6 (E), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3. _____	76
Figure 32 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8 (A), C10 (B) et C12 (C) et des acylcarnitines à chaîne longue en C14 (D), C16 (E) et C18 (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3. _____	77
Figure 33 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des acylcarnitines pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP). _____	78
Figure 34 - Concentrations résiduelles des marqueurs 17OHP (A), IRT (B), TSH (C) et T4T (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3. _____	79
Figure 35 - Concentrations résiduelles d'hémoglobine S en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3. _____	80
Figure 36 - Concentrations résiduelles des marqueurs TREC haut (A) et bas (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3. _____	81
Figure 37 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP). _____	82

Figure 38 - Concentrations résiduelles des acides aminés méthionine (A) et tyrosine (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	83
Figure 39 - Concentrations résiduelles des acides aminés glycine (A), phénylalanine (B), valine (C) et ornithine (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	84
Figure 40 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), arginine (B), acide aspartique (C), citrulline (D), acide glutamique (E) et leucine (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	85
Figure 41 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des acides aminés pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C) et congelés (PPF -20°C).	86
Figure 42 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines en C5 (A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	87
Figure 43 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre (A) et des acylcarnitines à chaîne courte en C2 (B), C3 (C), C4 (D) et C6 (E), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	88
Figure 44 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8 (A), C10 (B) et C12 (C) et des acylcarnitines à chaîne longue en C14 (D), C16 (E) et C18 (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.	89
Figure 45 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des acylcarnitines pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C) et congelés (PPF -20°C).	90
Figure 46 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP).	92

Liste des tableaux

Tableau 1 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de la Phénylcétonurie selon la méthode de dosage utilisée.	12
Tableau 2 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de l'hypothyroïdie congénitale selon la méthode de dosage utilisée.	12
Tableau 3 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), selon la méthode de dosage utilisée et de l'âge du nouveau-né.	13
Tableau 4 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de la mucoviscidose, en fonction de la méthode de dosage utilisée.	13
Tableau 5 - Liste des pathologies héréditaires du métabolisme dont le diagnostic est possible via la réalisation d'un profil des acylcarnitines (AC) ou d'un profil des acides aminés (AA) par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).	26
Tableau 6 - Marqueurs biologiques inclus dans l'étude STABIOSPOT.	37
Tableau 7 - Origine des échantillons biologiques utilisés et marqueurs biologiques correspondants.	38
Tableau 8 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité (n = 20) pour les 12 acides aminés testés.	43
Tableau 9 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité (n = 20) pour la carnitine libre et les 12 acylcarnitines testées.	43
Tableau 10 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité (n = 20) pour les biomarqueurs HbS, 17OHP, TIR, TSH, T4T, TREC bas et haut.	44
Tableau 11 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour les biomarqueurs HbS, 17OHP, TIR et TSH.	45
Tableau 12 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour les 12 acides aminés testés.	45
Tableau 13 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour la carnitine libre et les 12 acylcarnitines testées.	45
Tableau 14 - Pourcentages de perte à J32 (PPF) et pourcentages protecteur IMAGENE® (PPI) pour chaque paramètre dans l'étude 1 de dégradation accélérée.	46
Tableau 15 - Pourcentages de perte à J32(PPF) et pourcentages protecteur IMAGENE® (PPI) pour chaque paramètre dans l'étude 2 de dégradation accélérée.	60
Tableau 16 - Pourcentages de perte à J32 (PPF) des échantillons en capsule ouvertes et pourcentages de dégradation attribuable à la chaleur calculé (PDAC) pour chaque paramètre au terme ses études 1 et 2 de dégradation accélérée.	65
Tableau 17 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des marqueurs TSH, 17OHP, TIR, HbS et SCID pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme.	69

Tableau 18 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des acides aminés pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme. _____ 70

Tableau 19 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des acylcarnitines pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme. _____ 71

1 / Le dépistage néonatal

1.1 / Historique du dépistage néonatal

En 1953, Horst Bickel, pédiatre allemand, montre l'utilité d'un régime appauvri en phénylalanine pour améliorer l'état des enfants phénylcétonuriques, à condition qu'il soit instauré précocement, dans les premières semaines de vie [1].

Quelques années plus tard, Robert Guthrie, bactériologiste américain et oncle d'une jeune malade phénylcétonurique, met au point un test de dosage de la phénylalanine sur échantillons de sang déposé sur papier buvard. Son nom est d'ailleurs donné aux mêmes papiers buvards toujours utilisés de nos jours pour la réalisation des prélèvements de sang destinés au dépistage néonatal. Le premier test de dépistage de la phénylcétonurie (PCU) repose sur l'inhibition de la croissance d'une souche bactérienne de *Bacillus Subtilis* par l'addition dans le milieu de culture d'un analogue de la phénylalanine, la β -2-thienylalanine. Le dépôt sur le milieu de culture d'un petit disque de sang de patient séché sur buvard, contenant de la phénylalanine, permet une levée de cette inhibition. La mesure de la pousse bactérienne consécutive à cette étape permet alors la quantification du taux de phénylalanine présent dans l'échantillon de sang séché par une simple conversion.

L'association de l'observation clinique de Bickel et du test biologique de Guthrie permet un diagnostic précoce des malades phénylcétonuriques et pose les bases du concept de dépistage néonatal (DNN).

Suite à la publication en 1963 par Robert Guthrie du premier test bactériologique de dépistage de la PCU [2], les premières actions de dépistage de la phénylcétonurie se développent à l'initiative des pédiatres. S'en suit la mise en place dans de nombreux pays de véritables programmes de dépistage systématique de cette pathologie. La phénylcétonurie devient alors la première arriération mentale traitable. Le « modèle » de la PCU sera ensuite utilisé pour établir les critères justifiant la mise en place du dépistage néonatal systématique d'autres pathologies.

Dans les années 1970, Jean Dussault lance le premier programme de dépistage néonatal de l'hypothyroïdie congénitale au Québec, par dosage de la thyroxine sur des prélèvements de sang séché sur papier buvard. Les enfants atteints, dépistés puis traités par thyroxine depuis la naissance

présentent un développement complètement normal. Pour l'anecdote, les différents éditeurs de dictionnaires ont alors l'obligation de supprimer de leurs ouvrages le terme « crétinisme », associé à cette époque à l'hypothyroïdie congénitale.

Depuis maintenant plus de 50 ans, les programmes de dépistage se développent au niveau international en élargissant constamment le panel des maladies dépistées, qu'elles soient d'origine métabolique, endocrinienne ou dysimmunitaire.

1.2 / Principe et critères

1.2.1 / Principe

Le dépistage néonatal est un dépistage de masse, systématique et intéressant l'ensemble des nouveau-nés d'un pays ou d'un état et dont le but est de détecter très précocement une ou plusieurs affections. Le test de dépistage n'a pas pour vocation de poser le diagnostic de la pathologie mais représente un test de repérage. En cas de positivité, il devra entraîner la réalisation d'exams complémentaires de confirmation, spécifiques de la pathologie suspectée et capables de poser un diagnostic de certitude. Le dépistage néonatal a pour but final d'apporter à l'enfant un bénéfice direct individuel. L'enfant aura alors accès à une prise en charge précoce de sa maladie permettant de modifier le cours de son évolution avant que n'apparaissent des lésions irréversibles. Véritable programme de santé publique, c'est une action de médecine préventive dont bénéficient à la fois les nouveau-nés et l'ensemble de la collectivité publique.

1.2.2 / Critères de Wilson et Junger

En 1968, L'Organisation mondiale de la santé (OMS) édite la nomenclature des critères de dépistage en population générale, connus également sous le nom de « critères de Wilson et Junger » [3]. Elle détermine les critères auxquels une maladie doit répondre pour justifier la mise en place de son dépistage systématique, sans se limiter au seul dépistage néonatal :

- La maladie doit être un problème important de santé
- On doit disposer d'un traitement efficace
- Il faut organiser le diagnostic et le traitement des malades
- La maladie doit être reconnue à un stade pré-symptomatique
- La confirmation du dépistage par des méthodes de certitude est obligatoire
- Le test doit être accepté par la population
- L'histoire naturelle de la maladie doit être comprise
- Le protocole de traitement doit être défini
- Le rapport économique coût/bénéfice doit être apprécié
- La pérennité du programme doit être assurée.

Plus tard, d'autres conférences de consensus ont repris ces critères en y ajoutant les notions d'exhaustivité (assurer le dépistage de l'ensemble des nouveau-nés), de la nécessité d'une information suffisante des familles, d'une confidentialité des résultats individuels, d'une prévalence suffisante de la maladie dépistée ainsi que d'un recueil simple de l'échantillon biologique nécessaire [4–6]. Ces critères ne sont pas figés et doivent s'adapter aux progrès médicaux ou technologiques ainsi qu'aux demandes de la population, l'apport d'un bénéfice réel pour le nouveau-né lui-même restant évidemment l'objectif principal du processus de dépistage.

1.3 / Le dépistage néonatal français

1.3.1 / Les acteurs du DNN

Le DNN s'articule sur 3 niveaux. Le Ministère de la Santé constitue l'instance de tutelle et la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS), le financeur. Ils ont confié l'organisation nationale du dépistage à l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE). Enfin, sous la coordination de l'AFDPHE, ce sont les associations régionales, en lien avec les multiples professionnels de santé (pédiatres, biologistes, sages-femmes, etc.), qui assurent le bon fonctionnement du DNN au niveau régional.

1.3.1.1 / Les associations régionales

Chaque région française possède une association qui assure l'organisation du dépistage au niveau de la région. Elles sont au nombre de 23 et coordonnent l'action des professionnels exerçant à chaque niveau du dépistage. Le secrétariat de l'Association régionale gère le fichier des prélèvements reçus, des résultats, du suivi des résultats "suspects" et assure les contacts avec :

- Les maternités pour les tests reçus et le rendu des résultats (exhaustivité),
- Les laboratoires pour les résultats normaux et anormaux des premiers tests, et pour la suite donnée aux demandes de contrôle (deuxième prélèvement) en cas de résultat anormal.
- Les médecins traitants pour les demandes d'un prélèvement de contrôle, les demandes de convocation d'un bébé dont le test est suspect.
- Les médecins spécialistes pour la confirmation du diagnostic et la prise en charge du bébé malade,

Avec l'aide de l'AFDPHE, les associations régionales assurent également l'information des professionnels concernés par le dépistage. Seuls des professionnels avertis pourront informer correctement les parents sur l'intérêt et les modalités de ce dépistage. Ainsi cette exigence impose de dispenser une information claire et précise aux parents (**Figure 1**).

1.3.1.2 / L'AFDPHE

L'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) a la responsabilité de la coordination du dépistage néonatal en France depuis plus de 40 ans. L'AFDPHE est garante de l'efficacité du programme de dépistage dont elle définit l'organigramme et dont elle assure la gestion administrative et financière :

- Elle centralise les données régionales en vue de fournir les statistiques annuelles et d'obtenir des données épidémiologiques sur les maladies dépistées ;
- Elle prépare les états financiers trimestriels remis à la CNAMTS qui vont permettre le remboursement des divers acteurs au prorata de leur activité ;
- Elle établit une comptabilité financière nationale, centralise les données comptables régionales et prépare la demande de budget annuel auprès de la CNAMTS.

L'AFDPHE coordonne ainsi les activités de dépistage régionales dans un but de cohésion et d'harmonisation nationale. Dans ce cadre, elle participe notamment à l'information des professionnels de santé et des parents. Pour cela, elle édite et fournit régulièrement des supports d'informations aux associations régionales. En qualité d'expert, elle possède également un rôle de conseil vis-à-vis des organismes de tutelle. L'AFDPHE est composée de plusieurs commissions et groupes de travail. La commission technique (CT) permet le suivi de la distribution des paramètres biologiques (valeurs normales de la population), évalue les nouveaux réactifs et systèmes analytiques, propose les algorithmes pour le dépistage des différentes pathologies, organise les Journée des laboratoires de dépistage néonatal... Plusieurs groupes de travail sont rattachés à la CT, comme le groupe « Qualité » et EEQ ANSM, le groupe « papier buvard » et enfin une commission spécialisée dans les questions d'ordre éthique.

En plus des critères de Wilson et Junger classiques, l'AFDPHE a également fixé 3 grands objectifs pour le DNN français :

- « l'égalité » avec un accès identique de tous les nouveau-nés aux tests de dépistage et à la prise en charge thérapeutique.
- « l'efficacité », avec la recherche d'une sensibilité et d'une spécificité maximales limitant les possibilités de faux négatifs et de faux positifs.
- « l'utilité », avec en priorité le bénéfice direct pour l'individu malade.

L'AFDPHE est également l'interlocutrice de la CNAMTS et de la Direction Générale de la Santé pour les programmes de dépistage néonatal.

L'organigramme de l'AFDPHE est disponible sur le site <http://www.afdphe.org>.

1.3.1.3 / La tutelle et le financement

La tutelle est représentée par le Ministère de la santé. C'est ce dernier qui pourra décider d'inclure au programme du DNN de nouvelles maladies sur avis des différentes commissions s'intéressant aux critères de sélection. Le financement est assuré par la CNAMTS. Il est organisé autour d'une convention spécifique, entre la CNAMTS et l'AFDPHE, renouvelée chaque année par voie d'avenant pour maximum 3 ans. L'AFDPHE est remboursée pour chaque dépistage sur une base forfaitaire définie pour chaque test. En plus des « tests de première ligne », la réalisation des tests complémentaires « de confirmation » est également prise en charge par la CNAMTS. Cette dotation est redistribuée par l'AFDPHE aux associations régionales au prorata de l'activité.

1.3.2 / Les pathologies dépistées

En France, cinq maladies sont dépistées systématiquement à la naissance : la phénylcétonurie (depuis 1972), l'hypothyroïdie congénitale (1978), l'hyperplasie congénitale des surrénales (1995), la mucoviscidose (2002) et la drépanocytose (1989). Le dépistage de la drépanocytose est mis en place dans le cadre d'un programme national. Il est fait chez tous les nouveau-nés dans les DOM : depuis 1989 aux Antilles, un peu plus tard en Guyane, puis à l'île de la Réunion et à Mayotte. En métropole où il a été introduit progressivement de 1995 à 2000 à l'ensemble du territoire, ce dépistage ne concerne que les enfants à risque en raison de l'origine de leurs parents. Cette maladie touche essentiellement les enfants originaires des Antilles, d'Afrique noire mais aussi d'Afrique du Nord.

A ces 5 maladies dépistées par des tests biologiques, s'ajoute le dépistage de la surdité néonatale, rendu obligatoire par arrêté en 2012 [7]. Contrairement aux autres pathologies, ce sont les agences régionales de santé (ARS), qui sont responsables de ce dépistage et non l'AFDPHE.

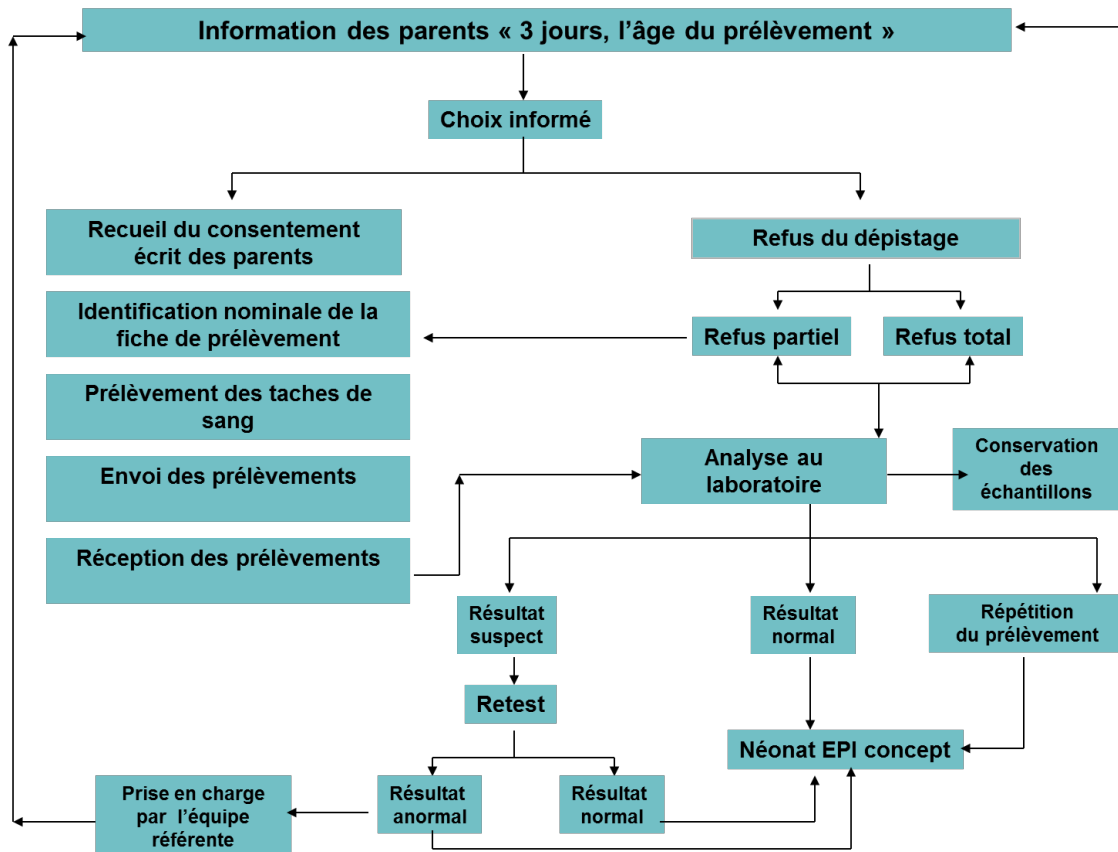


Figure 1 - Le dépistage néonatal : De l'information des parents à la prise en charge de l'enfant.

Néonat EPI Concept : Logiciel informatique pour la gestion des échantillons et des analyses biologiques du dépistage néonatal.

1.3.3 / Le prélèvement du DNN

Un document intitulé « 3 jours l'âge du dépistage » est remis aux parents pour les informer sur les étapes du dépistage néonatal et sur les pathologies dépistées (**Figure 1**). Le prélèvement sanguin est réalisé à J3 soit à 72h de vie, à la maternité ou dans un service de néonatalogie. Depuis le 1^{er} janvier 2015, le prélèvement du DNN doit se faire autour de 72 h de vie et impérativement au-delà de 48 h de vie. En cas de sortie précoce, il peut se faire à partir de 48h de vie à la maternité. Le prélèvement effectué consiste en une ponction capillaire à la face latéropostérieure du talon (**Figure 2**). Un prélèvement veineux n'est pas recommandé mais son utilisation peut s'avérer possible selon le contexte clinique [8] (**Figure 3**). Le carton buvard est acheté et fourni par les associations régionales aux maternités après une étape de validation préalable par la commission technique de l'AFDPHE. Les gouttes de sang sont recueillies sur un carton buvard en une seule fois. Les tâches de sang doivent avoir le même aspect sur les deux faces. Le carton est parfaitement identifié avec les éléments démographiques du nouveau-né. Après séchage, le prélèvement est acheminé par voie postale à l'aide d'une lettre T au secrétariat de l'agence régionale pour enregistrement et transmission au laboratoire pour analyse [9]. Le transport des buvards est exempté par la réglementation ADR, accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par la route [10]. Un consentement éclairé des parents est obligatoire pour la réalisation d'un éventuel test génétique de confirmation après un dépistage positif de la mucoviscidose.

1.3.4 / L'analyse biologique

1.3.4.1 / Les techniques de dosage

Dans un but d'harmonisation des résultats entre les laboratoires, la commission technique de l'AFDPHE évalue régulièrement les techniques et kits de dosages utilisés en France pour le dépistage néonatal. Elle établit également, selon les techniques utilisées et pour chaque pathologie dépistée les valeurs seuils recommandées (seuils pathologiques ou « seuils d'action » et seuils de retest).

Actuellement, la majorité des laboratoires régionaux en charge du DNN effectue le dosage de la phénylalanine (Phe) par une technique spectrofluorimétrique dite « maison », basée sur la méthode de McCaman-Robins, adaptée en microplaques depuis la fin des années 80 [11][12]. Plusieurs kits commerciaux sont également disponibles pour le dosage de la Phe :

- Le Kit Bio-Rad®, technique enzymocolorimétrique (Quantase)
- Le Kit Perkin Elmer®, enzymofluorimétrique adapté sur automate GSP, recommandé par la commission technique AFDPHE depuis 2014.
- Le Kit Lab-System®, technique fluoroenzymatique, recommandé par la commission technique AFDPHE depuis 2015.

Concernant le dépistage néonatal de L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), de l'hypothyroïdie congénitale (HC) et de la mucoviscidose : Les dosages de la 17 OH-progesterone (17OHP), de la thyroïdostimuline (TSH) et de la trypsine immunoréactive (TIR) se font à l'aide de 2 kits de dosage recommandés par la commission technique :

- Le kit Perkin Elmer®, adapté sur les automates Victor / Autodelfia (fluorimétrie) / GSP.
- Le kit Cisbio® (technique immunoradiométrique).

Une concentration de trypsine immunoréactive supérieure au seuil d'action impose une analyse génétique et éventuellement un test à la sueur. La recherche des 30 mutations les plus fréquentes du gène CFTR responsables de la mucoviscidose se fait à l'aide du kit de dépistage CF30v2 d'Elucigène® qui permet d'identifier 87 % des mutations du gène CFTR en population française.

Le dépistage néonatal ciblé de la drépanocytose permet un diagnostic précoce de toutes les formes de syndromes drépanocytaires majeurs (homozygote S, hétérozygote composite S/bêta-

thalassémie ou S/C). La recherche de variants de l'hémoglobine à partir d'une tache de sang déposé sur papier est réalisée par 2 techniques distinctes (Chromatographie liquide haute performance (HPLC) et électrophorèse capillaire). Une première analyse est réalisée par exemple par électrophorèse capillaire Sebia® ou iso-électro-focalisation Perkin Elmer®. La seconde analyse de confirmation est faite par une technique HPLC Biorad®. Une technique de quantification de l'hémoglobine S par système MALDI-TOF (spectromètre de masse en tandem largement utilisé par les laboratoires pour l'identification des souches bactériennes) est en cours de validation pour le dépistage de la drépanocytose [13].

Les seuils d'action et de retest établis par l'AFDPHE sont identiques pour l'ensemble des techniques de dépistage de la PCU (**Tableau 1**). Concernant, les autres pathologies, ces seuils varient en fonction du kit, de la technique utilisée et enfin en fonction l'âge du nouveau-né (prématuré ou non) (**Tableaux 2 ; 3 ; 4**).

Tableau 1 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de la Phénylcétonurie selon la méthode de dosage utilisée.

Phénylalanine	Seuil de retest	Seuil d'action
Fluorimétrie	150 µmol/L	180 µmol/L
Quantase (Biorad)	150 µmol/L	180 µmol/L
Perkin Elmer GSP	150 µmol/L	180 µmol/L

Tableau 2 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de l'hypothyroïdie congénitale selon la méthode de dosage utilisée.

TSH	Seuil de retest	Seuil d'action
Iba – Cis Bio	20 mU/L	25 mU/L
Victor / Autodelfia	15 mU/L	20 mU/L
Perkin Elmer GSP	12 mU/L	17 mU/L

Tableau 3 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS), selon la méthode de dosage utilisée et de l'âge du nouveau-né.

17OHP		Seuil de retest		Seuil d'action
Age du nouveau-né	Iba – Cis Bio	Perkin Elmer sur GSP / Victor / Autodelfia	Iba – Cis Bio	Perkin Elmer sur GSP / Victor / Autodelfia
< 32SA	125 nmol/L	60 nmol/L	180 nmol/L	90 nmol/L
32SA – 33SA+6j	125 nmol/L	60 nmol/L	180 nmol/L	90 nmol/L
34SA – 35SA+6j	85 nmol/L	35 nmol/L	120 nmol/L	50 nmol/L
36SA – 36+6j	40 nmol/L	17 nmol/L	60 nmol/L	25 nmol/L

Tableau 4 - Valeurs seuils recommandées par l'AFDPHE pour le dépistage de la mucoviscidose, en fonction de la méthode de dosage utilisée.

TIR	Seuil de retest	Seuil d'action		Seuil J21
Iba – Cis Bio	55 µg/L	65 µg/L	Réalisé si TIR J3 > 100 µg/L	40 µg/L
Victor / Autodelfia	55 µg/L	65 µg/L	Réalisé si TIR J3 > 100 µg/L	40 µg/L
Perkin Elmer GSP	50 µg/L	60 µg/L	Réalisé si TIR J3 > 90 µg/L	37 µg/L

Le seuil **J21** correspond à celui des dosages de contrôle réalisés systématiquement à 3 semaines de vie en cas d'anomalie du dosage à J3.

1.3.4.2 / La validation biologique, le rendu et la transmission des résultats

Tous les résultats rendus par le laboratoire sont systématiquement validés biologiquement après vérification analytique, en particulier des résultats des contrôles de qualités internes. Une fois les séries validées, les résultats sont intégrés aux dossiers des nouveau-nés dépistés, via un logiciel informatique (Neonat EPI concept) et sont transmis aux secrétariats des associations régionales. La détermination du statut du dosage est définie selon des seuils établis selon des critères nationaux et paramétrés dans le logiciel. Une phase de vérification analytique par un second dosage peut être nécessaire. Le rendu des résultats doit être le plus rapide possible, pour une prise en charge médicale du nouveau-né la plus précoce possible. Le secrétariat de l'association régionale a pour mission de transmettre les résultats du dépistage néonatal.

Le secrétariat de l'association régionale a pour mission de transmettre les résultats du dépistage néonatal. Tous les résultats négatifs sont communiqués mensuellement sous forme de listing au référent du DNN (cadre de santé sage-femme, pédiatre, chef de service gynéco-obstétricien) de chaque service préleveur. Les résultats anormaux donnent lieu à l'envoi d'un courrier individuel précisant le lieu de prise en charge du nouveau-né.

Les résultats chiffrés non nominatifs font l'objet d'un envoi mensuel à la Commission Technique de l'AFDPHE. La centralisation par l'AFDPHE des résultats des du DNN des différentes régions permet d'établir chaque année les statistiques épidémiologiques nationales des 5 maladies dépistées (rapport AFDPE).

1.3.5 / Du test de dépistage à la prise en charge médicale du nouveau-né : Exemple de la PCU

Concernant la phénylcétonurie, le dépistage est déclaré positif lorsque le taux de Phe est supérieur à 3 mg/dl (180 µmol/L). Cependant, la prise en charge immédiate dépend du niveau de Phe dosé lors de ce dépistage.

Schématiquement, 2 situations sont possibles :

1 / Le taux de dépistage est situé entre 3 et 5 mg/dL (180-300 µmol/L), le laboratoire de dépistage demande un prélèvement de contrôle sur buvard :

- Si le taux contrôle est inférieur à 3 mg/dl (180 µmol/L), le nouveau-né est classé dans les dépistages négatifs.
- Si le taux contrôle est supérieur à 3 mg/dl (180 µmol/L), le dépistage est alors déclaré positif et le nouveau-né rejoint le groupe des enfants pris en charge médicalement (cf. la situation suivante).

2 / Le taux de dépistage est supérieur à 5 mg/dl (300 µmol/L), le laboratoire de dépistage prévient immédiatement le centre médical responsable du traitement où l'enfant sera examiné et des examens de confirmation diagnostique seront réalisés.

L'arbre décisionnel de la prise en charge biologique et clinique des nouveaux nés suspects de PCU est illustré par la **Figure 4**. Une prise en charge rapide et adaptée des nouveau-nés atteints de PCU nécessite une communication et une coordination optimale entre les différents acteurs du DNN au niveau de la région (biologiste, pédiatre, secrétariat de l'association régionale).

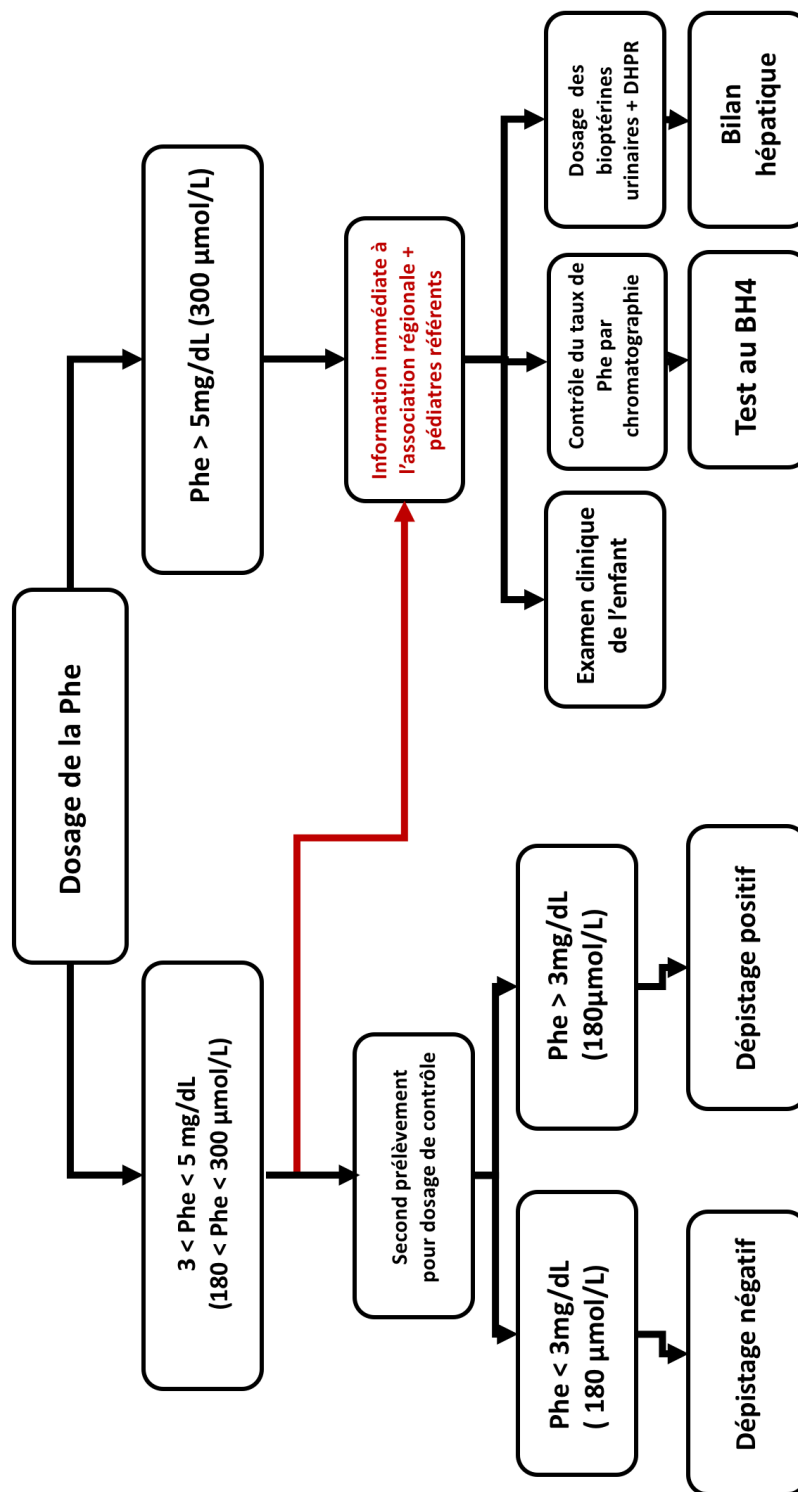


Figure 4 - Arbre décisionnel pour le test biologique et la prise en charge des nouveau-nés suspects de phénylcétonurie.

Le test au BH4 (ou tetrahydrobioptérine, cofacteur essentiel de la phénylalanine hydroxylase) permet à la fois de différencier les déficits enzymatiques vrais des déficits en biopptérides. DHPR : dihydroptéridine-réductase

1.3.6 / Bilan du dépistage français en 2016

Chaque année, l'AFDPHE publie le bilan d'activité du dépistage néonatal [14]. En 2016, 791387 nouveau-nés ont été testés pour le groupe PCU/HCS/HC, 773559 pour la mucoviscidose et 332 220 pour le dépistage ciblé de la drépanocytose (39349 en DOM-TOM et 292871 nouveau-nés en France métropolitaine). Seul 277 refus ont été répertoriés en 2016. Sur l'ensemble des nouveau-nés testés, 38 cas de PCU ont été dépistés et diagnostiqués, 321 cas d'HC, 33 cas d'HCS, 431 cas de drépanocytose et 127 cas de mucoviscidose, soit des fréquences moyennes respectives d'environ 1/21000 (PCU), 1/2500 (HC), 1/24000 (HCS), 1/1800 (Drépanocytose, en population générale DOM-TOM et France métropolitaine) et 1/6000 (Mucoviscidose). La fréquence cumulée toute pathologie confondue est de 1/833. Depuis plus de 40 ans, près de 19 000 nouveau-nés dépistés en France ont bénéficié d'un traitement adéquat avant l'apparition des symptômes de la maladie.

Le coût du DNN est de 10,8 € par nouveau-né correspondant au dépistage biologique, aux frais de fonctionnement de l'AFDPHE ainsi qu'aux charges communes). Le budget global de 2016 représente 8,5 millions d'euros soit un coût moyen par malade dépisté d'environ 9000€.

1.3.7 / La nouvelle organisation nationale du DNN

Depuis 2016, le ministère chargé de la santé a engagé une restructuration de l'organisation du programme national de dépistage, en passant d'une gestion associative à une gestion hospitalière sous l'égide des agences régionales (ARS). L'arrêté de février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant aux examens de biologie médicale décrit les nouvelles modalités d'organisation [15]. A partir du 1er mars 2018, le dépistage sera assuré par des centres régionaux de dépistage néonatal (CRDN) rattachés à des établissements de santé. Le nombre de centres régionaux et de laboratoires responsables du dépistage (21 actuellement) sera réduit après regroupement de l'activité du DNN sur une quinzaine de laboratoires. Au niveau national, l'AFDPHE laissera place à un centre national de coordination du dépistage néonatal (CNCDN), en lien avec deux commissions (épidémiologie et biologie). L'ensemble du programme sera suivi par un comité national de pilotage sous l'égide du ministère (**Figure 5**).

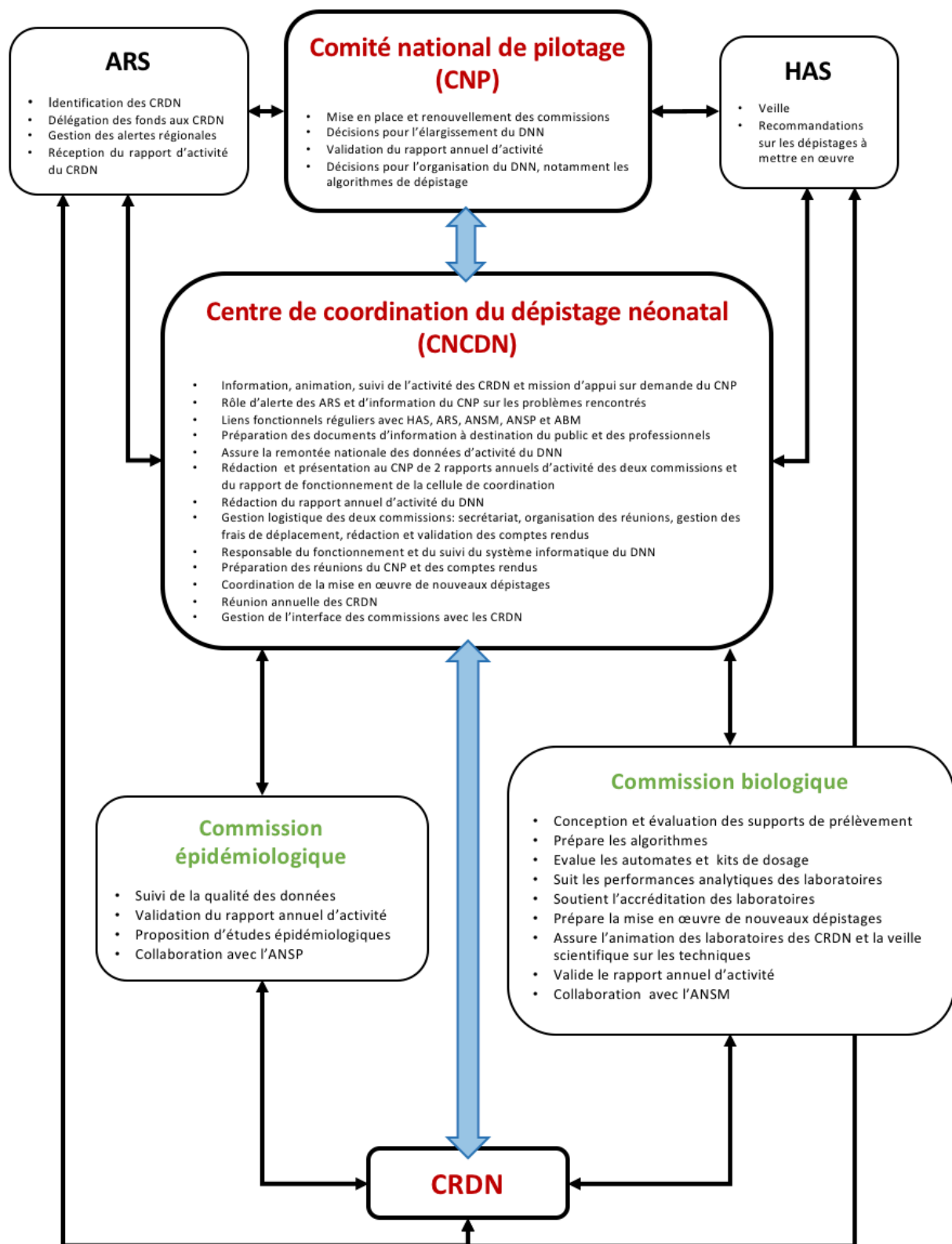


Figure 5 - Schéma de la nouvelle organisation du dépistage néonatal français.

CRDN : Centre régional de dépistage néonatal ; ARS : Agence régionale de santé ; HAS : Haute autorité de santé

1.3.8 / Évolution du DNN français

Le dépistage néonatal s'adapte comme les autres domaines médicaux aux progrès scientifiques et technologiques. Depuis l'arrivée en 2002 du dépistage systématique de la mucoviscidose, le programme français de DNN n'a pas été modifié. La mise en place, à partir de 2019, du dépistage du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCADD) constitue un changement majeur pour le DNN français.

La prévalence du déficit en MCAD est comprise entre 1/8 000 et 1/25 000 naissances dans les pays européens. Elle n'est pas connue avec précision en France. Le dépistage de la MCADD est fait par l'analyse du profil acylcarnitines par une technique de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Un nombre important de pays développés utilise la MS/MS dans le cadre du dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme. L'introduction de cette technologie s'est faite progressivement, à des rythmes différents selon les états et pour un panel de maladies plus ou moins large.

En 2008, la Direction générale de la santé (DGS), l'AFDPHE, la Société française de biologie clinique (SFBC) et la Société française des erreurs innées du métabolisme (SFEIM), ont saisi l'HAS afin que celle-ci évalue la pertinence de l'extension du DNN aux erreurs innées métaboliques par la technique MS/MS. En 2011, l'HAS a émis des recommandations favorables à la mise en place du dépistage de la MCADD [16]. Les recommandations de l'HAS sont basées sur plusieurs études cliniques internationales. La mortalité due à un déficit en MCAD est 4 fois moindre parmi les enfants dépistés. En l'absence de dépistage, deux tiers à trois quarts des patients développent une crise métabolique qui entraîne le décès dans 20 % des cas et des séquelles neurologiques dans 10 % des cas [17–19].

Une modélisation de l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD couplé au passage à la MS/MS pour le dépistage de la PCU en France suggère que la mise en place de ce dépistage de manière systématique permettrait d'éviter chaque année 5 décès chez des enfants de moins de 5 ans et de prévenir le développement de séquelles neurologiques chez 2 autres enfants. Le ratio coût-efficacité serait inférieur à 10000 € par année de vie sauvée et par année de vie ajustée sur la qualité (QALY). Une analyse médico-économique du projet de dépistage de la MCADD réalisée en France a été et publiée en 2012. Les auteurs estiment que le coût supplémentaire total à 1 millions d'euros par an et concluent à une efficacité économique du projet [20]. Une étude pilote a été initiée dans deux centres régionaux du DNN (Caen et Lyon) et un consensus national pour le dépistage, le diagnostic et

la prise en charge de la MCADD a été rédigé par un groupe de pédiatres et biologistes métaboliciens [21].

Comme cela sera expliqué ultérieurement, l'analyse pas MS/MS du profil acylcarnitines permet potentiellement le dépistage de nombreuses autres maladies héréditaires du métabolisme. L'HAS a donc maintenant pour mission d'évaluer la pertinence de l'extension du DNN aux autres pathologies dépistables par MS/MS. C'est dans ce cadre qu'elle édite en février 2018, une feuille de route proposant les orientations méthodologiques préliminaires à toute évaluation [22]

Depuis maintenant un peu plus de 10 ans, le dépistage des syndromes de déficit immunitaire combinés sévères est possible grâce à la quantification des T-cells receptor excision circles ou TRECS par « polymerase chain reaction » (PCR) à partir de taches de sang déposé sur papier buvard. Les TRECS sont des fragments d'ADN produits lors du réarrangement somatique des gènes du récepteur membranaires T des lymphocytes. Un taux bas ou nul de TRECS signe donc l'absence de lymphocytes T fonctionnels et donc la présence d'un déficit immunitaire [23,24]. Plusieurs études américaines et anglaises ont d'ores et déjà confirmé la faisabilité de la technique de quantification des TRECS sur papier buvard en démontrant de très bonnes sensibilité et spécificité [25–27]. Une étude médico-économique pilote « DEPISTREC » a été mise en place en 2013 par la CHU de Nantes (Dr M. Audrain, Laboratoire d'immunologie) en partenariat avec l'AFDPHE et le centre de référence des déficits immunitaires héréditaires (CEREDIH, Pr A. Fisher, Hôpital Necker, Paris). DEPISTREC a pour but de déterminer le ratio coût-efficacité de la mise en place de ce dépistage au niveau national [28]. La faisabilité du dépistage généralisé du SCID en France, ainsi que Les premiers résultats de l'étude présentés en décembre 2017 au congrès de la Société Française de dépistage néonatal (SFDN) paraissent prometteurs. Une réflexion sur la pertinence de l'extension du dépistage systématique aux SCID devrait donc logiquement être menée dans les années à venir.

1.4 / Le dépistage néonatal en Europe et dans le monde

La majorité des pays développés ont depuis 30 ans mis en place des programmes de dépistage néonatal systématique. Les modes d'organisation sont variables, dépendants des systèmes de santé, des modes de financement et des législations respectives de chaque pays ou état. Il existe également une disparité dans les panels de maladies dépistées, les méthodes et techniques de dosage utilisées ainsi que dans les valeurs seuil des différents tests de dépistage.

L'ensemble des pays européens possèdent à ce jour un programme de DNN. Seul quatre juridictions de taille réduite ne possèdent pas un système complet de DNN et font appel à un autre pays pour « sous-traiter » l'activité biologique du dépistage. Il s'agit du Liechtenstein et des principautés d'Andorre, de San Marino et de Monaco. Il n'y a actuellement pas de recommandations globales pour le DNN établies au niveau européen. Cependant, un guide des bonnes pratiques du dépistage de la mucoviscidose [29] ainsi que des directives de prise en charge néonatale de la mucoviscidose et de l'hypothyroïdie congénitale (HC) ont été publiés récemment [30,31]. En l'absence de consensus, chaque pays ou juridiction est laissé libre dans les choix des laboratoires chargés du dépistage, des pathologies dépistées et du modèle d'organisation du dépistage. Selon les pays, le nombre de maladies dépistées par chaque programme varie de 1 (Albanie) à plus de 40 (Espagne). L'ensemble des juridictions ou état européens dépiste la PCU. L'hypothyroïdie congénitale et l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) sont dépistées respectivement dans 45 et 19 pays. La mucoviscidose est dépistée seulement dans 16 pays européens. Les maladies héréditaires du métabolisme sont dépistées par ordre croissant de fréquence. Les déficits primaires du métabolisme des acides aminés (pathologies du cycle de l'urée principalement) sont dépistés dans un peu moins de la moitié des pays et juridictions (22/48). Les déficits primaires de la β -oxydation mitochondriale des acides gras sont dépistés dans seulement 17 pays. Une organisation nationale et centralisée du DNN est mise en place dans la plupart des pays européens. Seuls quelques pays comme la Belgique et l'Espagne possèdent des programmes décentralisés et gérés de manière autonome au niveau régional ou provincial. Cette décentralisation du DNN a notamment comme conséquence délétère une couverture du dépistage inférieure à 100% pour certaines pathologies

Aux États-Unis, ce sont des laboratoires de dépistage néonatal de santé publique qui ont la charge de réaliser les examens biologiques. La gestion du dépistage néonatal se fait au niveau des

états, provinces ou même des territoires et aucune politique nationale globalisée n'a encore été mise en place. Le dépistage est obligatoire dans plusieurs états et contrairement à la majorité des pays européens, il est le plus souvent à la charge des parents. Depuis une dizaine d'années, on observe une volonté d'homogénéisation des pratiques du DNN au U.S.A. En 2008, sous l'impulsion de l'*American Academy of Pediatric*, le congrès américain a voté une loi affirmant l'intérêt du DNN [32] et la nécessité de son organisation au plan national. Une instance nationale a été créée, intitulée "le *Secretary of Health and Human Services Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children (SACHDNC)*" et un panel national de pathologies à dépister, le RUSP (Recommended Uniform Screening Panel) a été recommandé par l'*American College of Medical Genetics* [33,34].

Le Canada, le Japon et l'Australie font également partie des pays pionniers en matière de dépistage néonatal. Le DNN canadien ne s'organisant pas au niveau national, le panel de pathologies dépistées est variable selon les provinces. Le Japon et l'Australie possèdent des organisations gouvernementales du DNN avec de larges panels nationaux de pathologies dépistées, incluant notamment les aminoacidopathies, les déficits de la bêta-oxydation des acides gras ainsi que les aciduries organiques. Dans les pays en voie de développement, des expériences de programme de prévention voient le jour, comme en Amérique du sud et en Asie, aidées majoritairement par les ONG et autres organisations internationales. L'ISNS (International Society for Neonatal Screening) a été créée en 1991 avec pour but la globalisation de l'information, l'amélioration et l'harmonisation du DNN au niveau mondial [35].

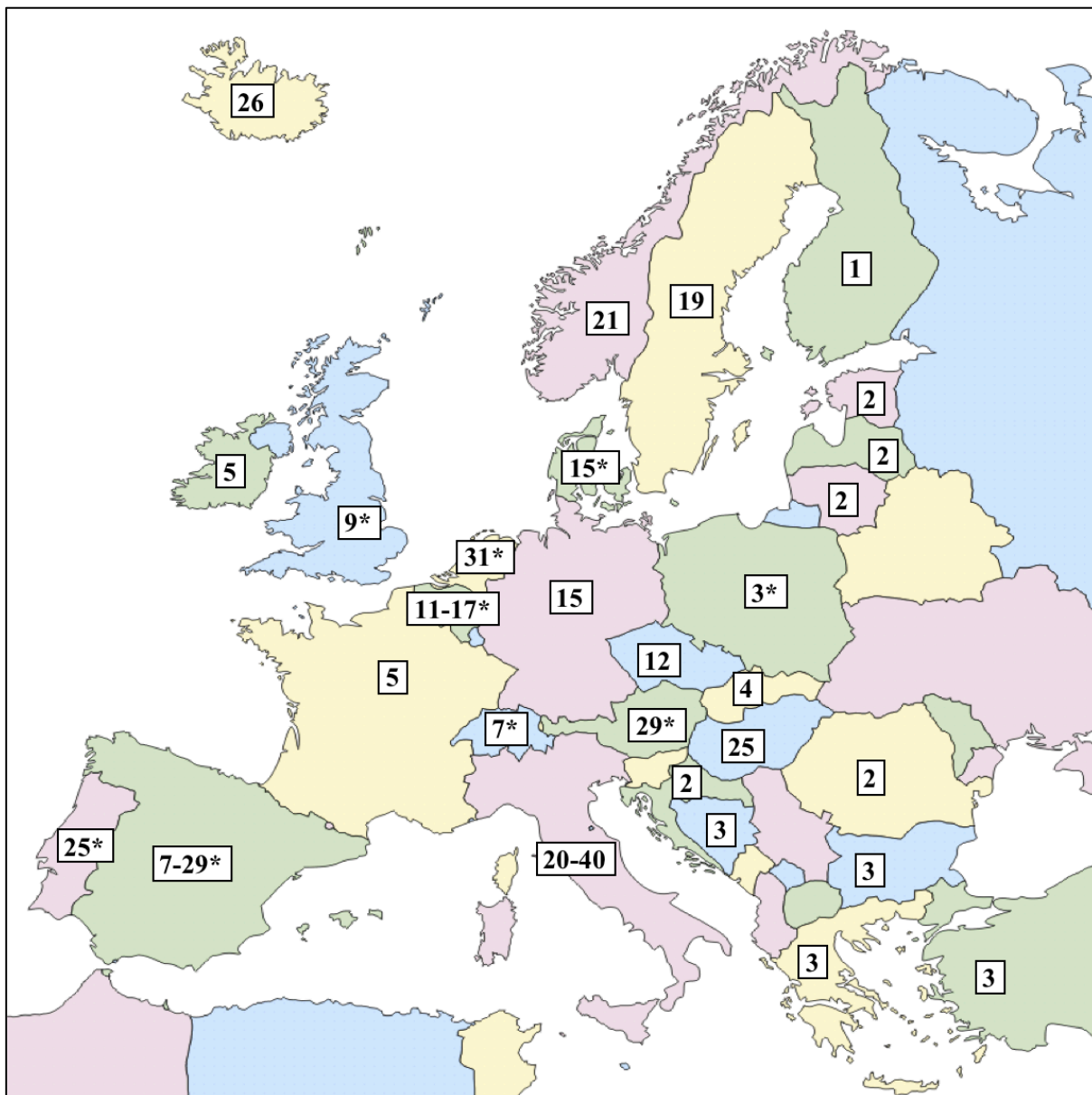


Figure 6 - Carte européenne du dépistage néonatal.

Chaque chiffre représente le nombre de maladies dépistées au niveau national. Les couples de chiffres espacés par un tiret représentent les nombres minimum et maximum de maladie dépistées au niveau régional dans l'ensemble du pays. Les astérisques indiquent l'intégration de la MS/MS au sein du programme de dépistage néonatal.

1.5 / Dépistage néonatal et progrès technologiques

Depuis sa création, le dépistage néonatal a constamment évolué en parallèle des nouveaux développements technologiques dans les domaines de la médecine, de la biologie et de la physique. Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, et avec l'apparition des techniques dites de « criblage haut débit » ou « high-throughput screening », le dépistage néonatal connaît une période de changements importants aussi bien sur les plans techniques et biologiques que sur le plan éthique.

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et de quantifier de très nombreux métabolites biologiques ou molécules chimiques au sein de mélanges complexes. L'identification de ces métabolites repose sur la mesure de la masse des molécules et de leurs fragments ionisés qui sont séparés et quantifiés sur la base de leur ratio masse moléculaire/charge (m/z). Cette technologie est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie organique, biologie, médecine etc. En un seul passage analytique et dans un intervalle de temps retreint, il est possible d'identifier et de mesurer les concentrations de centaines de composés biologiques différents. C'est cette possibilité de « screening » qui présente un grand intérêt dans le cadre du dépistage néonatal puisqu'elle permet l'identification simultanée de nombreux biomarqueurs, spécifiques de pathologies métaboliques ou endocriniennes [36,37]

Deux applications de la spectrométrie de masse en tandem ont permis d'améliorer le diagnostic et le dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme : Le profil des acylcarnitines et le dosage des acides aminés.

La première permet de faire le diagnostic des déficits de l'oxydation mitochondriale des acides gras et de certaines aciduries organiques. La seconde permet pour sa part de diagnostiquer des aminoacidopathies et des déficits du cycle de l'urée. Ces 4 groupes de pathologies sont caractérisés par la présence d'un blocage d'une ou plusieurs voies métaboliques avec accumulation secondaire de métabolites spécifiques et notamment des acides aminés ou acylcarnitines. L'apport fondamental de la MS/MS pour ces deux analyses est la possibilité de les réaliser de manière simultanée sur de faibles quantités de prélèvement comme par exemple une tache de sang déposé sur papier buvard. L'analyse commune du profil des acides aminés (AA) et des acylcarnitines (AC) permet ainsi le dépistage combiné de plus d'une trentaine erreurs innées du métabolisme. Les maladies héréditaires du métabolisme

pouvant être diagnostiquées par MS/MS sur un prélèvement de sang déposé sur papier buvard sont résumées dans le **Tableau 5** (Cheillan et al, 2004) ; la liste n'est pas exhaustive.

De très nombreux pays comme les États-Unis, le Canada, l'Australie, une majorité des pays de l'Europe occidentale [38], certaines provinces chinoises ou encore le Koweït [39] et le sultanat d'Oman [40], ont d'ores et déjà intégré l'utilisation de la spectrométrie de masse pour leur programme de DNN. Cette technique est utilisée majoritairement pour le dépistage des anomalies de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras (MCADD, VLCADD...) et de celles du métabolisme des acides aminés (PCU, Tyrosinémie, anomalies du cycle de l'urée...). A ces 2 grands groupes de MHM peuvent également s'ajouter les anomalies lysosomales et peroxysomales (Fabry, Pompe...) [41,42], les déficits du transport et de la synthèse de la créatine [43], et plus récemment de nouvelles classes de maladies héréditaires comme par exemple le syndrome ADA-SCID (déficits immunitaires combinés sévère par déficit en adénosine déaminase 1) [44]. Le dépistage français entrera dans l'ère de la MS/MS après sa réorganisation et avec la mise en place du dépistage de la MCADD.

L'émergence des techniques biomoléculaires de séquençage « nouvelle génération » (NGS) et leur application potentielle au dépistage néonatal tend à profondément modifier l'organisation de ce dernier. Elles permettent de séquencer et d'analyser rapidement un génome ou un exome entier (ou « whole-genome/exome sequencing »), ouvrant ainsi la possibilité de dépister l'ensemble des pathologies héréditaires, génétiques ou métaboliques. De plus, ces techniques sont parfaitement compatibles avec l'utilisation des prélèvements de sang déposé sur papier buvard [45]. A l'heure actuelle, aucun programme de dépistage n'utilise le NGS comme examen biologique de première intention. Plusieurs auteurs ont d'ores et déjà proposé son incorporation en seconde ligne du dépistage biologique de certaines pathologies [46–48], notamment pour la confirmation génétique de la mucoviscidose avec l'analyse du panel des mutations du gène *CFTR* les plus fréquemment rencontrées [49,50]. La technologie NGS pourrait également ouvrir la voie au dépistage néonatal des déficits immunitaires primaires, un groupe hétérogène de pathologies d'origine génétique ne possédant pour la plupart aucun biomarqueur spécifique. L'analyse génétique directe par séquençage de l'exome serait alors l'examen biologique de référence et de première intention [51].

Tableau 5 - Liste des pathologies héréditaires du métabolisme dont le diagnostic est possible via la réalisation d'un profil des acylcarnitines (AC) ou d'un profil des acides aminés (AA) par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Groupe / Maladies	MS/MS	Fréquence	Amélioration sous traitement
Aminoacidopathies			
PCU	AA	1 /14000 (a)	Oui
Leucinose	AA	1 /85000 (a)	Oui
Homocystinurie	AA	1 /200000 – 335000 (a)	Oui
Tyrosinémie type I	AA	1 /100000 – 120000 (a)	Oui
Hyperglycinémie sans cétose	AA	1 /200000 (b)	Non
Déficits du cycle de l'urée			
Citrullinémie	AA	1/57000 (a)	Oui
Acidurie argininosuccinique	AA	1/70000 (a)	Oui
Argininémie	AA	1/363000 (a)	+/-
Aciduries organiques			
Acidurie propionique	AC	1/87000 – 137000 (a)	Oui
Acidurie isovalérique	AC	ND (> 200 cas) (b)	Oui
Acidurie méthylmalonique	AC	1/48000 – 61000 (b)	Oui
Acidurie glutarique de type I	AC	1/50000 (b)	+/-
Déficits de la bêta-oxydation des acides gras			
Déficit de transport de la carnitine	AC	ND (> 100 cas) (b)	Oui
Déficit en CPTI	AC	ND (> 30 cas) (b)	+/-
Déficit en CPTII	AC	ND (> 200 cas) (b)	+/-
Déficit en CAT	AC	ND (> 50cas) (b)	+/-
Déficit en LCAD	AC	ND (> 200 cas) (b)	+/-
Déficit en LCHAD	AC	ND (> 200cas) (b)	+/-
Déficit en MCAD	AC	1/15000 – 100000 (a)	Oui
Déficit en SCAD	AC	ND (> 50 cas) (b)	+/-
Déficit en MAD	AC	ND (> 200 cas) (b)	+/-

(a) Les fréquences ont été obtenues d'après Scriver et al. [52].

(b) ND : non déterminé, les chiffres représentent la somme des données de la littérature.

CPTI : carnitine palmitoyltransférase de type I ; CPTII : carnitine palmitoyltransférase de type II ; CAT : Carnitine-acylcarnitine translocase ; LCAD : Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue ; LCHAD : Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue hydroxylées ; MCAD : Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne ; SCAD : Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte ; MAD : Multiple acyl-CoA dehydrogénase.

2 / Conservation des tâches de sang résiduelles

2.1 / Intérêt et applications

Après la réalisation des examens biologiques du dépistage néonatal, des échantillons surnuméraires de tâches de sang séchées sur buvard (tâches de sang résiduelles) sont stockés et conservés pour une période variable selon les pays et l'organisation du programme de dépistage néonatal.

En France l'AFDPHE recommande le stockage des tâches de sang résiduelles durant 1 an minimum alors que certains états ou pays les conservent plus de 21 ans (ex : Indiana) voire indéfiniment (ex : Danemark) [53]. Les tâches de sang résiduelles sont détruites immédiatement après la réalisation des tests de dépistage dans d'autres pays.

La conservation et le stockage de ces échantillons présente plusieurs intérêts. Les prélèvements sont majoritairement conservés dans un but de vérification ou de comparaison ultérieure. Cette conservation offre la possibilité de redoser le marqueur biologique (phénylalanine, TSH, 17OH progestérone, acylcarnitines...) de la pathologie dépistée sur la tâche de sang résiduelle. Il est alors nécessaire qu'un lien entre les prélèvements et les identités des nouveau-nés soit conservé. A titre exceptionnel, un prélèvement du dépistage néonatal pourra également être utilisé pour le diagnostic d'une autre pathologie, mais uniquement sur prescription médicale et avec le consentement des parents.

Dans un cadre médico-légal, l'analyse du buvard de naissance peut permettre d'identifier la cause d'une mort subite du nouveau-né (MSN). La MSN est le décès brutal et inattendu avant l'âge de 1 an d'un enfant considéré jusque-là comme bien portant, décès qu'aucun examen, y compris l'autopsie n'a pu expliquer. Environ 3 à 6% des MSN seraient dues aux déficits héréditaires de la β -oxydation mitochondriale des acides gras [54,55]. La responsabilité du déficit en MCAD dans un cas de mort subite du nourrisson a été rapportée pour la première fois il y a une trentaine d'années [56]. Depuis, d'autres auteurs ont montré l'implication des déficits en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (VLCADD), en 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (LCHAD), et en transporteur de la carnitine dans ces morts subites [57,58]. Dans le cas où le buvard prélevé en post-mortem est non-informatif, l'analyse des acylcarnitines sur les tâches de sang

résiduelles peut dans certains cas permettre l'identification d'une anomalie de la β -oxydation des acides gras et d'expliquer ainsi la cause de mort subite inexplicée de l'enfant.

La bonne stabilité de l'ADN sur les tâches de sang déposé sur papier buvard font des « banques » de prélèvements néonataux de formidables sources d'échantillons biologiques pouvant être utilisées à des fins de recherche clinique, technique ou encore épidémiologique [59]. De nombreuses études ayant eu recours à l'analyse de ces banques de buvards ont d'ores et déjà été publiées dans différents domaines. Par exemple, une équipe suédoise a effectué la recherche de l'ADN de l'Herpès simplex virus à partir des tâches de sang résiduelles afin de vérifier la possibilité d'identifier précocement et de prendre en charge rapidement les infections néonatales à HSV [60]. Un test de détection des anticorps anti-HTLV a également été mis au point à partir de sang séché sur papier buvard par une équipe anglaise dans le but d'établir la séroprévalence pour ce virus au sein de la population londonienne [61]. Ces banques sont aussi d'un grand intérêt pour les recherches épidémiologiques génétiques comme par exemple pour l'identification de mutations ou polymorphismes responsables de prédispositions à certaines pathologies. Le génotypage du gène de la glutathion-S-transférase par PCR à partir de tâches de sang résiduelles (400 buvards fournis par le Utah Department of Health) a permis l'identification des polymorphismes corrélés à un risque accru de développer certains cancers [62]. Plus récemment en Australie, une étude clinique a permis, par analyse de plus de 500 buvards issus du dépistage, de mettre en évidence un lien entre le statut néonatal de méthylation de certaines régions génomique et la survenue à 5 ans de syndromes métaboliques [63].

2.2 / Questions éthiques de la conservation et de l'utilisation des tâches de sang résiduelles

Si l'utilité du stockage et de la conservation des buvards du dépistage néonatal dans le cadre de la confirmation, de l'assurance qualité ou de la médecine légale n'est pas remise en cause, elle soulève de nombreuses interrogations. Ces échantillons sanguins représentent des spécimens précieux pourvoyeurs d'ADN. Ils peuvent être utilisés à des fins expérimentales pour effectuer par exemple des tests de dépistage pré-symptomatique ou de prédisposition à certaines pathologies, révélant ainsi des informations sur l'enfant. Cette démarche n'est pas nécessairement dans l'intérêt de l'enfant et elle est contraire à la plupart des lignes directrices émises par les sociétés internationales sur les tests génétiques prédictifs [64–66]. L'emploi de ces échantillons à des fins judiciaires (ex : test

de paternité) représente également une utilisation potentielle dans laquelle l'intérêt pour l'enfant est discutable et non évident. L'existence de ces banques d'échantillons suscite des questions éthiques face à leur accès par les assureurs, les employeurs, les familles ou les organismes chargés d'appliquer la loi. Il est par conséquent recommandé que les échantillons soient stockés et que les informations associées soient conservés de façon sécurisée afin de prévenir des accès non autorisés et des utilisations secondaires d'échantillons identifiés ou identifiables [67]. De même, l'utilisation de ces échantillons à des fins de recherche épidémiologiques ou de santé publique doit nécessairement se faire de manière anonymisée pour éviter toute menace sur la vie privée des enfants. En effet, l'emploi d'échantillons codés ouvrirait la porte à la possibilité de recontacter les patients lors de suivis d'études, suscitant alors des enjeux éthiques. Un encadrement strict de l'utilisation de ces banques est donc nécessaire.

Une des questions éthiques majeures concernant la conservation des échantillons du DNN porte sur la nécessité d'obtenir le consentement des parents pour la conservation et l'utilisation à des fins de recherche des échantillons après la période requise. Actuellement, une majorité des programmes de DNN n'exige pas l'obtention d'un consentement parental écrit pour le stockage des échantillons mais organisent une information claire aux parents sur les pratiques et les modalités de conservation [68–70]. Le comité de travail sur le dépistage des nouveau-nés de l'American Academy of Pediatrics recommande que soit développé un modèle de formulaire de consentement parental pour la conservation des taches de sang résiduelles [71]. En France, Les taches de sang résiduelles ne peuvent être utilisés à des fins de recherche sauf si une collection a été constituée (déclaration et consentement des parents). Au Danemark, c'est une politique de refus éclairé qui a été mise en place concernant la conservation des buvards du DNN. Au moment du dépistage, les parents ont la possibilité de refuser que soient conservés les prélèvements de leur enfant.

Il paraît donc nécessaire qu'une information claire et précise soit donnée aux parents sur la durée, la finalité et les méthodes de conservations des tâches de sang résiduelles au-delà de la période nécessaire à la réalisation des tests biologiques et des contrôles de qualité. L'exigence d'obtention d'un consentement parental écrit pourrait alors constituer un gage supplémentaire de transparence.

2.3 / Conditions de conservations des tâches de sang résiduelles et stabilité des marqueurs biologiques

L'utilisation des tâches de sang résiduelles dans un but de vérification, pour le diagnostic d'une autre pathologie ou bien dans un cadre de recherche n'est possible que si elles sont stockées dans des conditions permettant leur conservation et assurant la stabilité de leur contenu moléculaire et protéique. Ceci est d'autant plus vrai si l'utilisation de ces prélèvements doit se faire plusieurs années après le début de leur stockage. Actuellement, 3 conditions de conservation des buvards sont en vigueur au niveau international. Dans les deux cas, les buvards sont conservés dans des sachets plastiques hermétiques et « zippés » contenant un produit dessicant afin d'éliminer l'humidité résiduelle. Selon les laboratoires, les sachets sont stockés à température ambiante, à +4°C ou bien congelés à -20°C. En France, l'AFDPHE recommande depuis 2013, une conservation des buvards résiduels à +4°C pour un an minimum, ceci afin de garantir la stabilité des biomarqueurs testés pendant cette période uniquement [53]. Dans l'optique d'un stockage des tâches de sang résiduelles à plus long terme, il est tout de même largement reconnu qu'une conservation à minimum -20°C est à privilégier [72].

La stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâches de sang séché déposé sur papier buvard est largement influencée par les conditions (température / humidité) et la durée de conservation. La présence d'éventuelles moisissures est également un paramètre pouvant rentrer en ligne de compte, de même que la valeur de l'hématocrite ou encore la position du poinçon sur la tâche de sang (centre ou bordure) lors de la réalisation du punch [73]. La stabilité de biomarqueurs dans des échantillons sériques ou plasmatiques a été largement étudiée. A ce jour, très peu de travaux se sont intéressés à la stabilité des biomarqueurs du dépistage néonatal sur tâches de sang séché déposé sur papier buvard. Un des premiers articles portant sur le sujet et évaluant la stabilité de la TSH et des hormones thyroïdiennes sur sang séché déposé sur buvard, est paru en 1987 [74]. Depuis, plusieurs équipes ont évalué la stabilité des acylcarnitines et acides aminés [75–78] mais également de l'hémoglobine S [79] ou des enzymes lysosomales [80,81]. Une étude nord-américaine a permis de déterminer la stabilité de l'ensemble des paramètres dosés au sein des différents programmes de DNN aux États-Unis [82].

En raison de la facilité d'obtention et de transport de l'échantillon ainsi que l'espace de stockage réduit, de nombreux dosages biologiques sont mis au point sur des prélèvements de sang séché déposé sur buvard. On peut citer par exemple la mesure de l'activité enzymatique de la Glucose-

6-phosphate déshydrogénase érythrocytaire [83], le suivi thérapeutique et pharmacologique d'anticancéreux comme le tenofovir [84] ou encore la quantification de microARNs spécifiques pour la surveillance et le suivi des cancers pulmonaires [85]. Dans les années à venir, l'utilisation des prélèvements de sang séché sur buvard pourrait donc se démocratiser dans différents domaines de la biologie. En conséquence, de manière plus large et sans se limiter aux seuls marqueurs du dépistage néonatal, la stabilité au sein de prélèvements tâches de sang séché déposé sur papier buvard de nombreux autres métabolites, protéines ou enzymes a également été évaluée. Une équipe suédoise s'est intéressée à la stabilité des protéines au sein des tâches de sang séché déposé sur papier buvard en comparant les profils protéiques pour des délais de conservation des buvards pouvant atteindre 40 ans [86].

3 / Étude Stabiospot

La société IMAGENE® (Pessac, France) a breveté un procédé industriel d'encapsulation de matériel biologique pour une conservation à température ambiante. La technologie de stockage IMAGENE® est basée sur le confinement étanche de molécules d'ADN ou ARN purifié et déshumidifié sous atmosphère contrôlée, anoxique anhydre et inerte (mélange de gaz neutres : 90% Ar et 10% He). Les facteurs d'altération (humidité, air et chaleur) sont éliminés, l'espace de stockage est réduit et la traçabilité est assurée. Plusieurs études ont montré une stabilité à long terme de l'ADN et de l'ARN stocké selon le procédé IMAGENE® [87,88].

Les sociétés IMAGENE® et Perkin Elmer (Turku, Finlande) ont proposé un partenariat à l'AFDPHE et à plusieurs laboratoires impliqués dans le dépistage néonatal (CHU de Bordeaux, CHU de Reims, CHU de Nantes, CHRU de Lille, Hospices civils de Lyon) pour participer à une évaluation de la stabilité d'un large panel de biomarqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang déposé sur papier buvard (**Figure 7**).

3.1 / Objectifs

Cette étude multicentrique a été conçue avec 3 objectifs principaux et se divise en 3 études distinctes : Deux études de dégradation accélérée (études 1 et 2) et une étude de conservation à long terme (étude 3) :

- 1- Le premier objectif consiste à déterminer la sensibilité des différents marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché, à deux facteurs d'altérations : l'humidité et de la température (études 1 et 2).
- 2- Le second objectif a pour but d'évaluer les performances de la technologie de minienapsulation d'échantillon biologiques développée par la société IMAGENE®®, pour la conservation des échantillons de sang séché sur buvard (études 1, 2 et 3).
- 3- La validation des recommandations AFDPHE sur la conservation des buvards résiduels du dépistage néonatal (minimum un an, si possible à +4°C en sachet zippé avec dessicant) constitue le 3ème objectif de l'étude (étude 3).

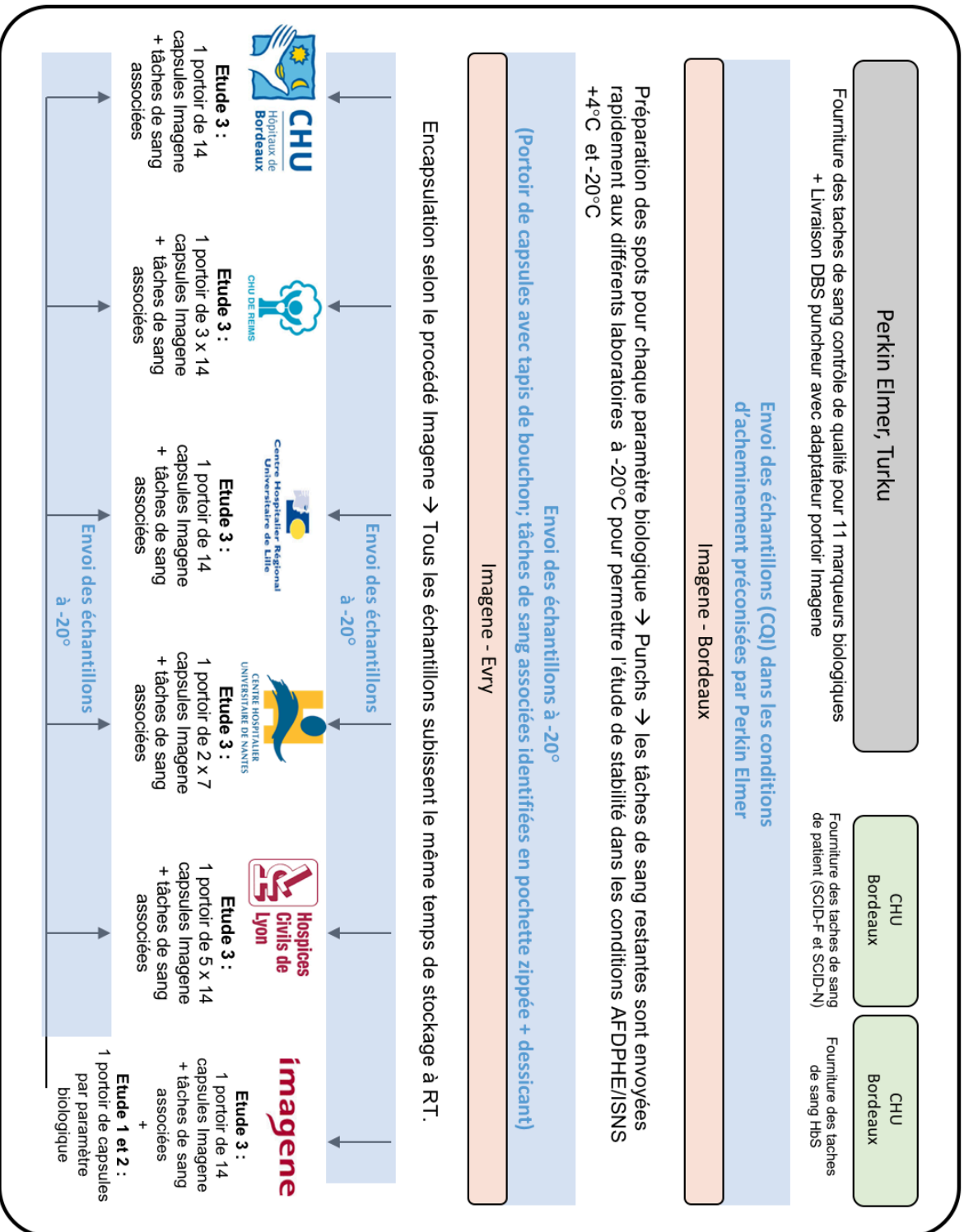


Figure 7 – La préparation des échantillons et les différents acteurs de l'étude STABIOSPOT.

3.2 / Matériel et méthodes

3.2.1 / Plan expérimental

Le plan expérimental des 3 études est illustré par la **Figure 8**. Pour les 3 études, les marqueurs biologiques sont dosés en duplicat ou en triplicat pour le marqueur TREC.

3.2.1.1 / Etudes 1 et 2 : études de dégradation accélérée

Deux études de dégradation accélérée sont réalisées. L'objectif des études 1 et 2 est de déterminer la sensibilité des différents marqueurs vis-à-vis de deux facteurs d'altérations : l'humidité et de la température, mais également d'évaluer les performances protectrices de la technologie de minienapsulation d'échantillon biologique développée par la société IMAGENE®. Le taux important d'humidité et la température élevée du milieu de conservation du permettent d'accélérer la dégradation des biomarqueurs et ainsi de raccourcir la durée des études.

Étude 1 : Les paires ou trio (TREC) de punchs sont stockés pour une période de 32 jours (28 jours pour les marqueurs TREC) à température ambiante dans une atmosphère à 75% d'humidité. Lors du stockage, les échantillons sont soit encapsulés par le procédé IMAGENE® soit déposés dans les mêmes capsules ouvertes en, en contact permanent avec l'atmosphère du milieu de conservation. L'ensemble des marqueurs sont quantifiés en début d'étude puis à intervalle régulier pour obtenir un total de 10 points de mesure sur l'ensemble de la durée de l'étude (5 points de mesure pour le TREC).

Étude 2 : Les paires ou trio (TREC) de punchs sont stockées pour une période de 32 jours (28 jours pour les marqueurs TREC) à température contrôlée de 37°C dans une atmosphère à 75% d'humidité. Les échantillons sont soit encapsulés par le procédé IMAGENE® soit déposés dans les mêmes capsules ouvertes, en contact permanent avec l'atmosphère du milieu de conservation. L'ensemble des marqueurs sont quantifiés en début d'étude puis à intervalle régulier pour obtenir un total de 10 points de mesure sur l'ensemble de la durée de l'étude (5 points de mesure pour le TREC).

3.2.1.2 / Etude 3 : étude de conservation à long terme

L'étude 3 ou étude de conservation à long terme a pour objectif d'évaluer la stabilité des marqueurs biologiques du DDN dans des conditions « classiques » de conservation des buvards (+4° et -20°C). Ces conditions de conservation classiques sont comparées à un mode de conservation innovant dans une capsule fermée IMAGENE® afin d'évaluer l'apport potentiel de cette technologie pour la conservation sur le long terme des tâches de sang déposé sur buvard.

Les paires ou trio (TREC) de punchs de tâches de sang déposé sur buvard (échantillons CIQ niveau II, sang de patients anonymisés ...) sont stockés sur une période totale de 2 ans soit en sachets plastiques hermétiquement « zippés » et contenant un sachet dessicant à +4° ou à -20°C, soit dans une minicapsule IMAGENE® scellée et conservée à température ambiante. Une quantification des 30 marqueurs est réalisée mensuellement pendant 1 an. Deux autres mesures ont ensuite été réalisées à 18 et 24 mois de stockage pour obtenir un total de 14 points de mesure sur l'ensemble des 2 ans de stockage.

Concernant le biomarqueur du SCID (TREC), seulement 7 mesures sont réalisées (0,3,6,9,12,18 et 24 mois). Pour les points de mesure à 18 et 24 mois, le dosage des acides aminés et des acylcarnitines sont réalisés uniquement pour les conditions de stockage en sachet « zippés » avec dessicant à +4° et -20°C. La stabilité de la thyroxine (T4T) est évaluée dans les 3 conditions de stockage uniquement durant les 9 premiers mois de l'étude.

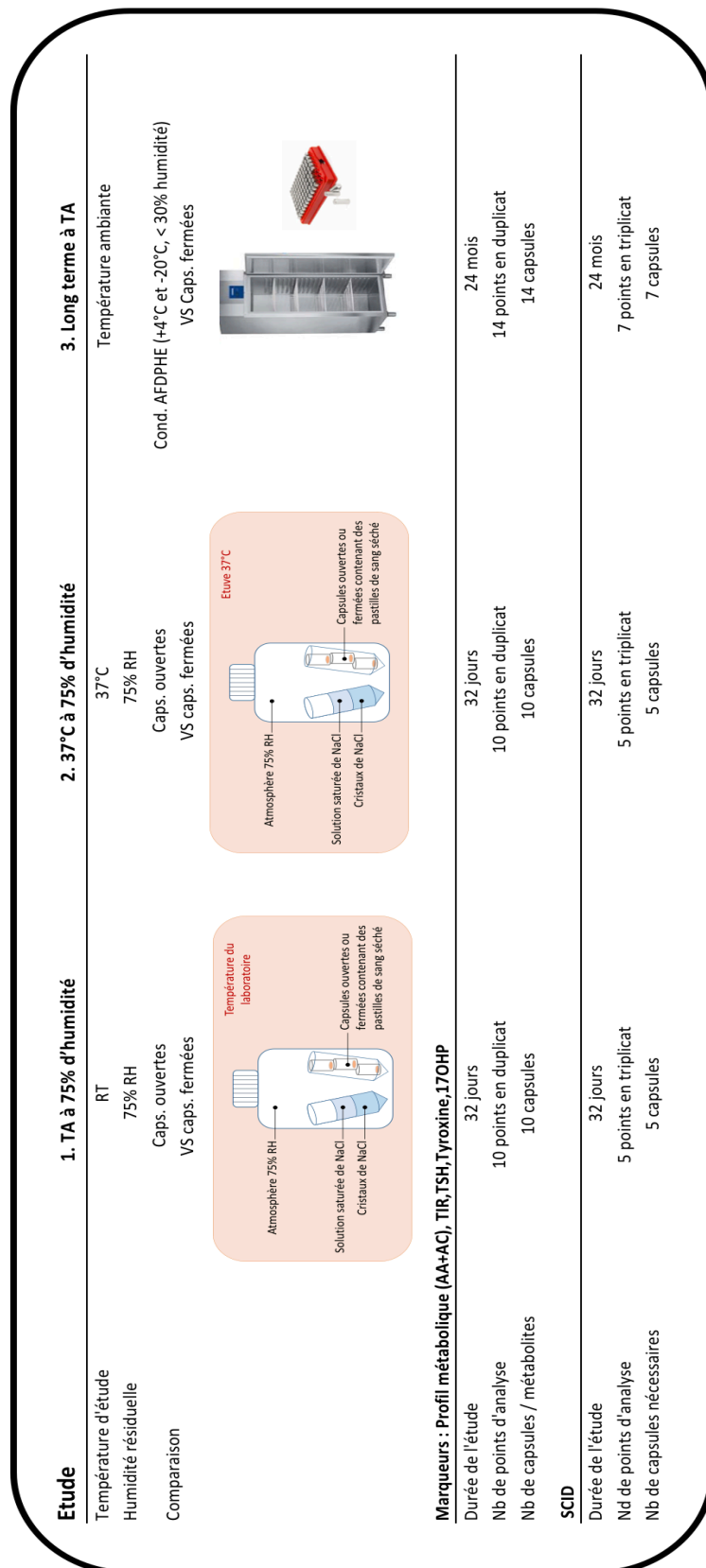


Figure 8 - Plan expérimental des études 1, 2 et 3.

3.2.2 / Biomarqueurs étudiés

Pour les 3 études, une quantification des 30 marqueurs a été réalisée sur des tâches de sang séché déposé sur papier buvard et stockés selon différentes conditions de conservation. Une cinétique de dégradation a été analysée pour l'ensemble des 30 marqueurs biologiques (**Tableau 6**). Outre les biomarqueurs inclus actuellement dans le programme du DNN français (phénylalanine (Phe), TSH, 17OHP, TIR, HbS), l'étude inclut plusieurs acides aminés (alanine (Ala), arginine (Arg), acide aspartique (Asp), citrulline (Cit), acide glutamique (Glu), glycine (Gly), leucine (Leu), méthionine (Met), ornithine (Orn), tyrosine (Tyr) et valine (Val), la carnitine libre (CO) ainsi que les acylcarnitines en C2, C3, C4, C5, C5DC, C6, C8, C10, C12, C14, C16 et C18. Le dosage des TREC, biomarqueur des SCID ainsi que celui de la thyroxine totale (T4T) ont également été intégrés à l'étude.

Tableau 6 - Marqueurs biologiques inclus dans l'étude STABIOSPOT.

Marqueurs biologiques d'intérêt inclus dans l'étude et pathologies dépistées	
DREP	Drépanocytose
SCID, 2 niveaux d'expression (normal et faible)	Déficits immunitaires combinés sévères
17-OHP (17- α -hydroxyprogestérone)	Hyperplasie congénitale des surrénales
TIR (Trypsine immunoréactive)	Mucoviscidose
TSH (Thyréostimuline)	Hypothyroïdie congénitale
TYX (thyroxine ou T4)	Hypothyroïdie congénitale
Acides aminés (Ala, Arg, Cit, Glu, Gly, Leu, Met, Orn, Phe, Tyr, Val) carnitine libre et acylcarnitines (C2, C3, C4, C5, C5DC, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18).	Maladies métaboliques dont la phénylcétonurie, tyrosinémie, leucinose, MCAD, GA I, GA II, MMA...

MCAD : Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne ; GA I : Acidurie glutarique de type I ; GA II : Acidurie glutarique de type II ; MMA : Acidurie méthylammonique.

3.2.3 / Matériels biologiques utilisés et préparation des échantillons

Les échantillons biologiques utilisés au cours de l'étude sont de différentes origines (**Tableau 7**). Les échantillons utilisés pour l'étude de stabilité des acides aminés et des acylcarnitines sont fournis par la société PerkinElmer® et correspondent aux « contrôles haut » ou niveau II inclus dans le kit NeoBase non-dérivatisé MSMS. Les échantillons utilisés pour l'étude de stabilité de la 17OHP, T4T, TSH et TIR sont également fournis par la société PerkinElmer® et correspondent aux « contrôles haut » ou niveau II inclus dans les kit Autodelfia Neonatal 17 α -OHP ; TSH ; T4T et IRT. Pour le marqueur du SCID (TREC), des buvards « niveau haut » et « niveau bas » ont été préparés respectivement à partir d'échantillons anonymes de sang total d'adultes et d'enfants. Concernant la drépanocytose, les buvards destinés au dosage du taux d'hémoglobine S ont été préparés à partir d'échantillons anonymisés de sang total provenant de patients atteints de drépanocytose.

Pour l'ensemble des 3 études, des punchs de 3,2mm sont faits à l'aide du DBS puncher, pour le dosage de l'ensemble des biomarqueurs, excepté pour le marqueur du SCID (TREC) pour lequel le diamètre du punch est de 1,5mm.

Tableau 7 - Origine des échantillons biologiques utilisés et marqueurs biologiques correspondants.

Marqueurs biologiques	Echantillons utilisés
DREP	Sang patient anonymisé HBSS
SCID, 2 niveaux d'expression (normal et faible)	Sang patients anonymes
17-OHP (17- α -hydroxyprogestérone)	CIQ Niveau II AutoDELFIÀ Neonatal 17OHP kit
TIR (Trypsine immunoréactive)	CIQ Niveau II AutoDELFIÀ Neonatal TIR
TSH (Thyréostimuline)	CIQ Niveau II AutoDELFIÀ Neonatal hTSH kit
TYX (thyroxine T4)	CIQ Niveau II AutoDELFIÀ Neonatal T4
Acides aminés (Ala, Arg, Cit, Glu, Gly, Leu, Met, Orn, Phe, Tyr, Val) carnitine libre et acylcarnitines (C2, C3, C4, C5, C5DC, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18, C18:1).	CIQ Niveau II NeoBase non-dérivatisé MSMS

DREP : Hémoglobine S, marqueur biologique de la drépanocytose.

3.2.4 / Encapsulation des échantillons par la société IMAGENE®

En début d'étude, les échantillons de sang séché sur buvard destinés à être stockés au sein des minicapsules IMAGENE® sont punchés puis déposés au fond d'un insert en verre de 0,3ml (2 punchs de buvard par capsule). Un film « respirant » est ensuite placé sur le portoir contenant les multiples inserts afin d'éviter que les punchs de buvard ne s'envolent lors des étapes d'échange de gaz et de mise sous vide qui suivront. Les inserts sont ensuite placés dans les capsules IMAGENE® en acier inoxydable. Une mise sous vide des capsules encore ouvertes est alors effectuée. Les capsules sont ensuite remplies avec de l'argon anhydre et anoxique (<1 et 0,5 ppm pour l'eau et l'oxygène respectivement). Toujours sous atmosphère exempte d'air, un couvercle en acier inoxydable est finalement soudé hermétiquement sur chaque capsule à l'aide d'un laser (**Figure 9**).

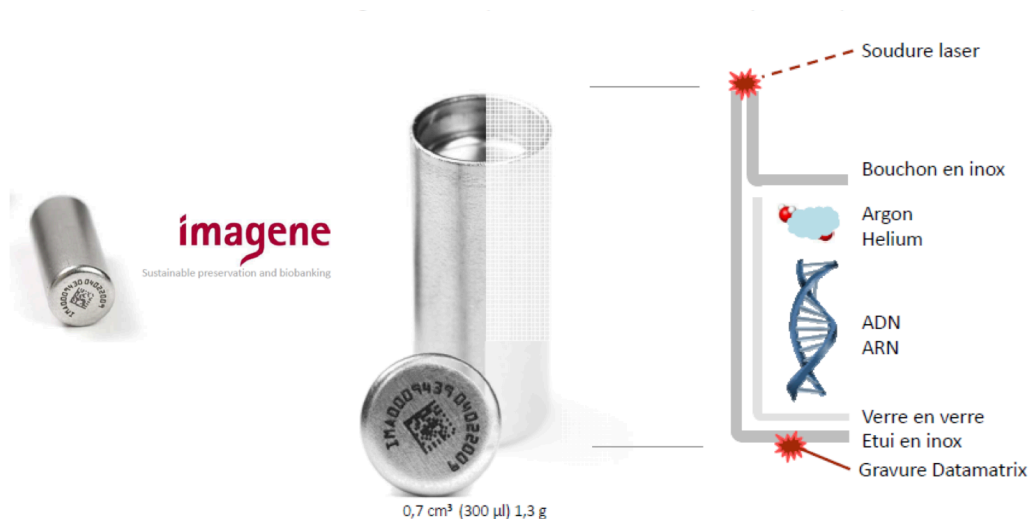


Figure 9 – Technologie de minicapsulation d'échantillon biologique IMAGENE®.

3.2.5 / Contrôle et mesure du pourcentage d'humidité et de la température

Au cours des études 1 et 2 de dégradation accélérée, les échantillons sont conservés pendant 32 jours en capsule ouverte et dans une atmosphère humide (75%), soit à température ambiante (étude 1), soit à 37°C dans une étuve (étude 2). En parallèle, une partie de ces échantillons sont conservés en capsule fermée et stockés dans les mêmes conditions. L'atmosphère humide à 75% est créée à l'aide de solutions saturées de chlorure de sodium. Durant ces 2 études, l'hygrométrie ainsi que la température sont continuellement vérifiées par un thermo-hygromètre.

3.2.6 / Techniques de dosage des différents biomarqueurs

STABIOSPOT est une étude multicentrique impliquant des laboratoires du dépistage néonatal Français. L'analyse et le dosage des biomarqueurs du dépistage néonatal est répartie sur plusieurs laboratoires de Centre Hospitaliers Universitaires (CHU) français. Le profil métabolique (acides aminés et des acylcarnitines) est fait par le laboratoire de Biochimie du CHU de Bordeaux (Secteur maladies héréditaires du métabolisme, dépistage néonatal et nutrition, Dr Samir Mesli et Dr Isabelle Redonnet-Vernhet). Le profil métabolique est réalisé à l'aide de la trousse « Mass Chrom® Aminoacids and acylcarnitines from dried blood spots Non-derivatized » Chromsystem (Munich, Allemagne) et installée sur spectromètre de masse en tandem Quattro Micro Waters®. Le dosage des paramètres 17OHP, TSH et TIR sont faits par le laboratoire de Biochimie du CHU de Reims (Dr Roselyne Garnotel) par une technique immuno-fluorimétrique sur automate AutoDELFIÀ, à l'aide des trousse « DELFIA® Neonatal 17- α OHP kit », « DELFIA® Neonatal TSH kit » et « DELFIA® Neonatal IRT kit » PerkinElmer. La stabilité de la T4T est évaluée par le laboratoire de Biochimie des Hospices civils de Lyon (Dr David Cheillan) à l'aide du kit commercial « DELFIA® Neonatal Thyroxine kit » PerkinElmer, sur automate AutoDELFIÀ. Le dosage des TREC, biomarqueur du SCID, est effectué au laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes (Dr Marie Audrain) à l'aide des trousse commerciales et automate « EnLite Neonatal TREC » PerkinElmer. Le laboratoire de Biochimie du CHU de Lille (Dr Jean-Marc Perrini) a mesuré le pourcentage d'hémoglobine S par électrophorèse sur un automate Capillarys 2 Neonat Fast Sebia (Lisses, France).

Une étude de performance par analyse de répétabilité des différentes méthodes analytiques est réalisée au début de l'étude. La quantification de la concentration de départ (T0) de chaque biomarqueur [HbS, 17OHP, TIR, TSH, T4T, TREC bas et haut, 12 acides aminés, carnitine libre et 12 acylcarnitines] est réalisée 20 fois lors d'un même passage analytique.

Une étude de performance par analyse de reproductibilité des différentes méthodes analytiques est réalisée à partir des résultats des contrôles de qualité internes (n = 30) propre à chaque méthodologie.

3.2.7 / Analyses des résultats et statistiques

L'analyse des résultats de l'étude de conservation au long cours (étude 3) et des deux études de dégradation accélérée (étude 1 et 2) ont pour objectifs :

1 - de déterminer la stabilité des biomarqueurs du dépistage néonatal en fonction des différentes conditions de conservation.

2 - de déterminer leur sensibilité aux facteurs d'altération que sont la chaleur et l'humidité par l'analyse d'une cinétique de dégradation.

Dans les 3 études et pour chaque point de mesure, une moyenne des 2 dosages (duplicat) est calculée. Les pourcentages de perte de chaque biomarqueur dans l'échantillon à un temps de mesure donné X (PPX) sont calculés selon l'**équation 1**. Le pourcentage de perte à J32 (étude 1 et 2) et 24 mois (étude 3) sera nommé pourcentage de perte final (PPF).

Équation 1 - Calcul du pourcentage de perte de concentration pour un biomarqueur à un temps X de conservation de l'échantillon.

$$PPX = 100 \times \left\{ \frac{\left[\text{Moyenne des mesures à } J0 - \left(\frac{\text{Mesure n}^\circ 1 \text{ à } JX + \text{Mesure n}^\circ 2 \text{ à } JX}{2} \right) \right]}{\text{Moyenne des mesures à } J0} \right\}$$

La température est la seule variable entre les études 1 (température ambiante) et 2 (37°C). Nous avons considéré que la dégradation des biomarqueurs aux cours de l'étude 1 était uniquement attribuable à humidité. L'effet de la température sur la conservation des échantillons et la stabilité des biomarqueurs en fin d'étude 2 peut ainsi être estimé pour chaque paramètre en calculant le « pourcentage de dégradation attribuable à la chaleur » ou PDAC par soustraction du PPF de l'étude 1 au PPF de l'étude 2 (**Équation 2**). Ce pourcentage correspond donc théoriquement au pourcentage de

dégradation du biomarqueur lié à l'augmentation de la température entre les études 1 et 2. Plus le PDAC est proche du PPF de l'étude 2, plus la dégradation du composé est en lien avec la température.

Équation 2 - Calcul du pourcentage de perte attribuable à la chaleur ou PDAC, pour un biomarqueur au terme des études 1 et 2 de dégradation accélérée.

$$PDAC = PPF \text{ étude 1} - PPF \text{ étude 2}$$

Le pouvoir protecteur de la minicapsule IMAGENE® vis-à-vis de la dégradation des échantillons et son impact sur la stabilité des biomarqueurs sont estimées dans les études 1 et 2 par le calcul du « pourcentage protecteur IMAGENE® » ou PPI. Ce pourcentage correspond à la différence entre les PPF des échantillons « capsule ouverte » et encapsulés pour chaque étude (1 et 2) (**Équation 3**). Plus le PPI est proche du PPF de l'échantillon « capsule ouverte », plus le pouvoir protecteur de la capsule est important.

Équation 3 - Calcul du pourcentage protecteur IMAGENE® ou PPI, pour un biomarqueur au terme des études 1 ou 2 de dégradation accélérée.

$$PPI = PPF \text{ capsule ouverte} - PPF \text{ capsule fermée}$$

Pour chacune des 3 études, l'influence du délai de conservation de l'échantillon a été évaluée de manière indépendante pour chaque couple [biomarqueur / conditions de stockage] en utilisant un test de comparaison de variance ANOVA à un facteur variable. Nous avons comparé la moyenne des concentrations de chaque biomarqueur à T0 par rapport aux moyennes de concentrations des points de mesure (J32 pour les études 1 et 2 ; 12 et 24 mois pour l'étude 3) à l'aide d'un test multiple de comparaison de Dunnett pour un risque α de 5%. Les pourcentages de perte significativement différents de zéro signent une variation de concentration du biomarqueur et sont annotés d'un * ($P < 0,05$) ou d'un ** ($P < 0,01$).

3.3 / Résultats

3.3.1 / Performances des méthodes analytiques

Les moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité sont présentés pour chaque biomarqueur dans les **tableaux 8, 9 et 10**.

Tableau 8 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité ($n = 20$) pour les 12 acides aminés testés.

Acide aminé	Ala	Arg	Asp	Cit	Glu	Gly	Leu	Met	Orn	Phe	Val	Tyr
Moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	951,8	5,4	5,45	311,4	132,5	1559,2	657,6	330	97,5	734,1	1352,1	579,7
Ecart-type ($\mu\text{mol/l}$)	46,9	0,4	0,4	20,4	8,3	144,4	34,7	16,5	10,2	40,5	67,51	30,9
CV (%)	4,9	8,2	8,2	6,6	6,2	9,3	5,3	5	10,4	5,5	5	5,3

Tableau 9 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité ($n = 20$) pour la carnitine libre et les 12 acylcarnitines testées.

Acylcarnitine	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
Moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	279,4	147,9	26,1	6,3	2,6	2,2	1,3	1,6	2,3	4,7	4,4	29,6	4
Ecart-type ($\mu\text{mol/l}$)	21,3	7,5	1,4	0,4	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	1,6	0,2
CV (%)	7,6	5,1	5,2	6,4	6,8	13,2	6,8	5,8	6,5	5,1	5	5,3	5,3

Tableau 10 - Moyennes, écarts-types et coefficients de variation analytiques de répétabilité (n = 20) pour les biomarqueurs HbS, 17OHP, TIR, TSH, T4T, TREC bas et haut.

Biomarqueur	HbS	17OHP	TIR	TSH	T4T	TREC bas	TREC haut
Moyenne	73,08 %	143,50 nmol/l	83,46 µg/l	64,80 mUI/l	170,45 nmol/l	71,90 copies/µl	487,20 copies/µl
Ecart-type	0,48 %	8,52 nmol/l	3,61 µg/l	5,22 mUI/l	8,70 nmol/l	38,12 copies/µl	202,22 copies/µl
CV (%)	0,65	5,94	4,32	8,05	5,10	53,01	41,51

Les coefficients de variation analytiques de reproductibilité sont présentés pour chaque biomarqueur dans les **tableaux 11, 12 et 13**.

Tableau 11 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour les biomarqueurs HbS, 17OHP, TIR et TSH.

Biomarqueur	HbS	17OHP	TIR	TSH
CV (%)	2,6	6,8	7,3	8,8

Tableau 12 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour les 12 acides aminés testés.

Acide aminé	Ala	Arg	Asp	Cit	Glu	Gly	Leu	Met	Orn	Phe	Val	Tyr
CV (%)	11,6	18,3	22,5	12,4	8,4	29,9	14,1	9,9	12,7	11,6	9,6	10,4

Tableau 13 - Coefficients de variation analytiques de reproductibilité (n = 30) pour la carnitine libre et les 12 acylcarnitines testées.

Acylcarnitine	C0	C2	C3	C4	C5	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
CV (%)	13,6	11,8	12	13,3	12,8	23,9	11,9	12,6	12,8	12,8	13,1	13,7	15,7

Tableau 14 - Pourcentages de perte à J32 (PPF) et pourcentages protecteur IMAGENE® (PPI) pour chaque paramètre dans l'étude 1 de dégradation accélérée.

Biomarqueur	PPF étude 1		PPI
	Capsule ouverte	Capsule fermée	
Ala	4%	1%	3%
Arg	58%**	9%	49%
Asp	10%	-7%	18%
Cit	7%	-3%	10%
Glu	-149%**	10%	-159%
Gly	3%	-6%	9%
Leu	4%	1%	3%
Met	48%**	-1%	50%
Orn	9%	5%	4%
Phe	9%	2%	7%
Tyr	4%	1%	3%
Val	0%	-3%	4%
C0	-62%**	-1%	-63%
C2	85%**	-8%	93%
C3	57%**	-7%	64%
C4	59%**	8%	51%
C5	5%	-6%	10%
C5DC	8%	-27%	35%
C6	46%**	8%	38%
C8	14%	-3%	17%
C10	7%	-10%	17%
C12	5%	5%	0%
C14	-2%	-5%	4%
C16	1%	-3%	3%
C18	4%	0%	4%
T4T	0%	2%	-2%
TSH	8%	1%	6%
17OHP	11%	8%	2%
TIR	16%*	-2%	18%
HbS	39%**	-1%	40%
SCID faible (TREC)	33%*	5%	28%
SCID haut (TREC)	20%**	0%	20%

3.3.2 / Études 1 et 2 : Etudes de dégradation accélérée

Les résultats des études de dégradation accélérée (1 et 2) pour de l'ensemble des biomarqueurs sont exprimés en pourcentages de perte finaux (PPF), en pourcentage de perte attribuable à la chaleur (PDAC) ainsi qu'en pourcentage protecteur IMAGENE® (PPI).

3.3.2.1 / Étude 1 : Dégradation des biomarqueurs en atmosphère humide

La concentration de la majorité des acides aminés (Ala, Asp, Cit, Gly, Leu, Orn, Phe, Tyr et Val) reste stable durant les 32 jours de l'étude 1. Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans les **Figures 10 et 11**. Aucune dégradation significative n'est observée pour ces derniers dans les deux conditions « capsule ouverte » et « capsule fermée ». Les pourcentages de perte à J32 dans les deux conditions pour ce groupe de biomarqueurs sont compris entre 0% pour la valine et seulement 10% pour l'acide aspartique (**Tableau 14 et Figure 22A**). Les pourcentages de perte sont inférieurs ou proches des CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**).

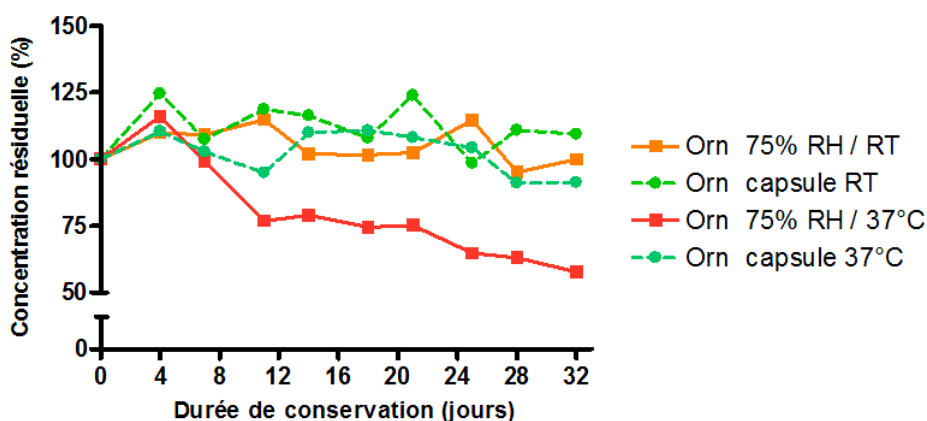


Figure 10 - Concentrations résiduelles de l'acide aminé ornithine en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

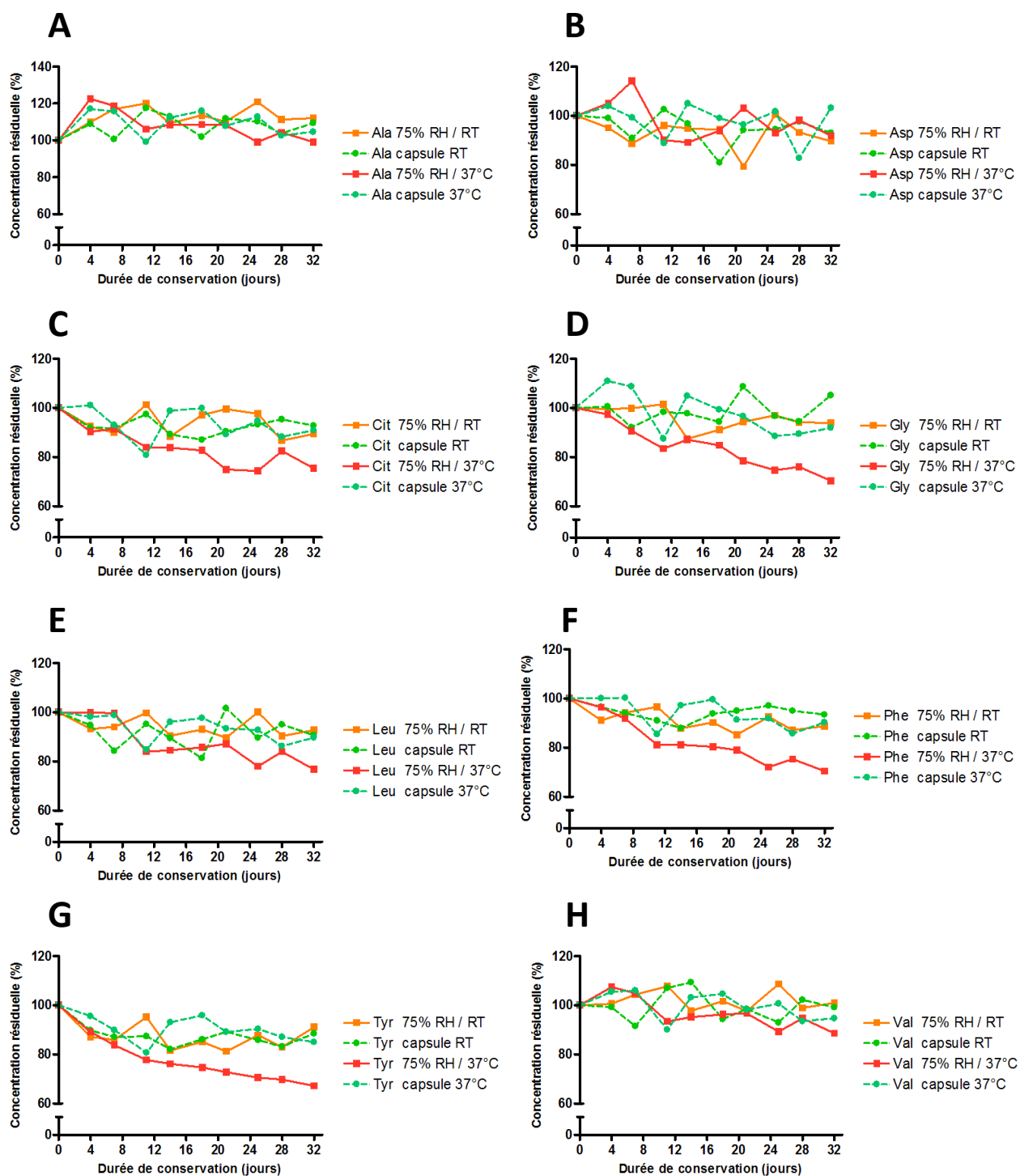


Figure 11 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), acide aspartique (B), citrulline(C), glycine(D), leucine (E), et phénylalanine (F), tyrosine (G) et valine (H), en fonction des conditions de conservation au cours des études 1 et 2.

L'arginine, la méthionine et l'acide glutamique présentent des variations de concentrations significatives pour les échantillons stockés en capsules ouvertes avec des pourcentages de perte à J32 respectivement de 58%, 48% et -149%. En capsule fermée, les pourcentages de perte à J32 ne sont respectivement que de 9%, 10% et -1% (**Tableau 14 et Figure 22A**). Les pourcentages de perte en capsule fermée sont inférieurs ou égaux aux CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 12**. Le pouvoir protecteur de la capsule IMAGENE® exprimé en PPI est respectivement de 49%, 50% et -159% pour l'arginine, la méthionine et l'acide glutamique (**Tableau 14**).

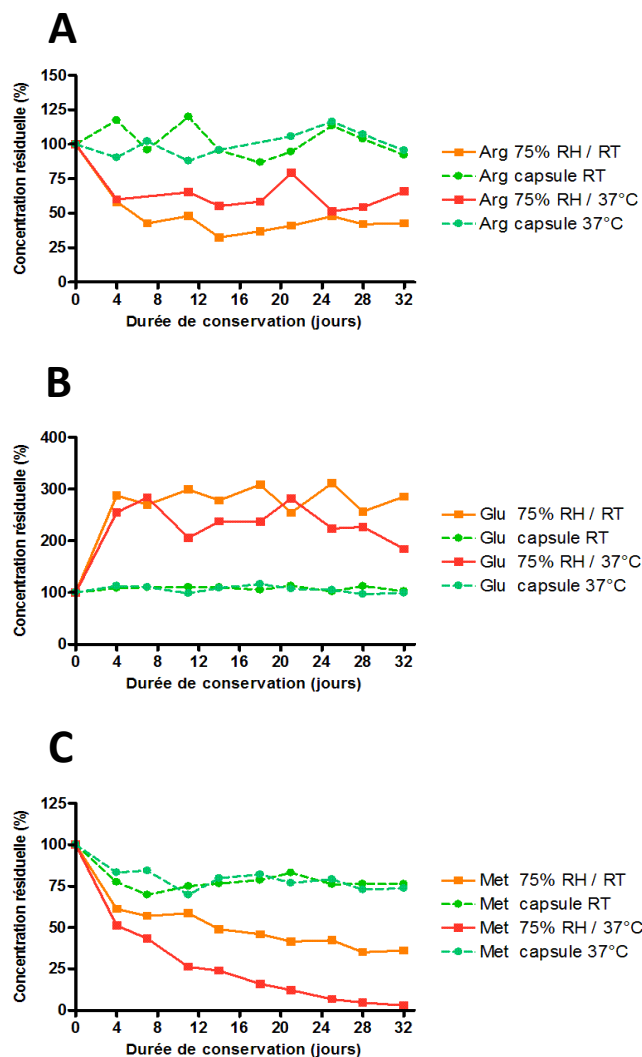


Figure 12 - Concentrations résiduelles des acides aminés arginine (A), acide glutamique (B) et méthionine (C), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

Pour le groupe des acylcarnitines, la carnitine libre (C0) et les acylcarnitines à chaîne courte en C2, C3, C4 et C6 présentent des variations de concentrations significatives pour les échantillons stockés en capsules ouvertes avec des pourcentages de perte à J32 respectivement de respectivement à -62%, 85%, 57%, 59% et 46%. En « capsule fermée », les pourcentages de perte à J32 ne sont respectivement que de 1%, -8%, -7%, 8% et 8% (**Tableau 14 et Figure 22B**). Les pourcentages de perte en capsule fermée sont inférieurs ou égales aux CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 13**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans les **Figures 13 et 14**. Le pouvoir protecteur du dispositif IMAGENE® exprimé en PPI est respectivement de -63%, 93%, 64%, 51% et 38% pour la carnitine libre (C0) et les acylcarnitines à chaîne courte en C2, C3, C4 et C6 (**Tableau 14**).

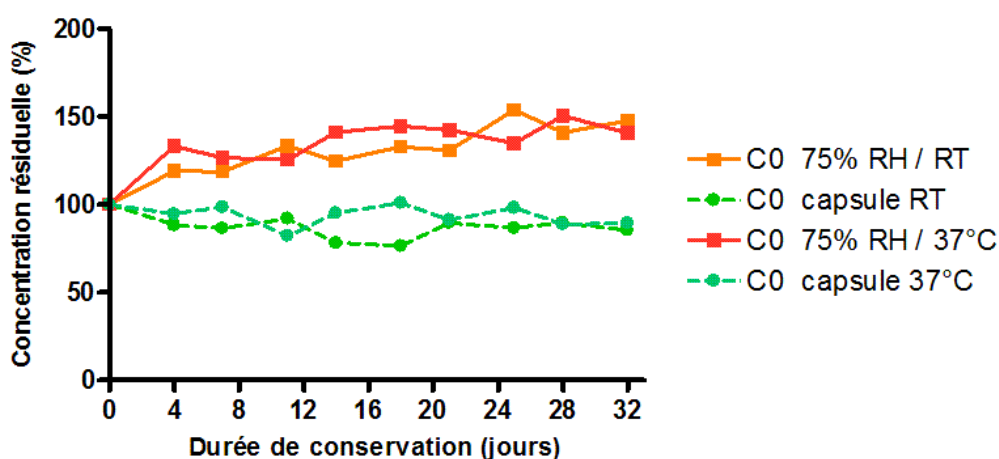


Figure 13 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre C0 en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

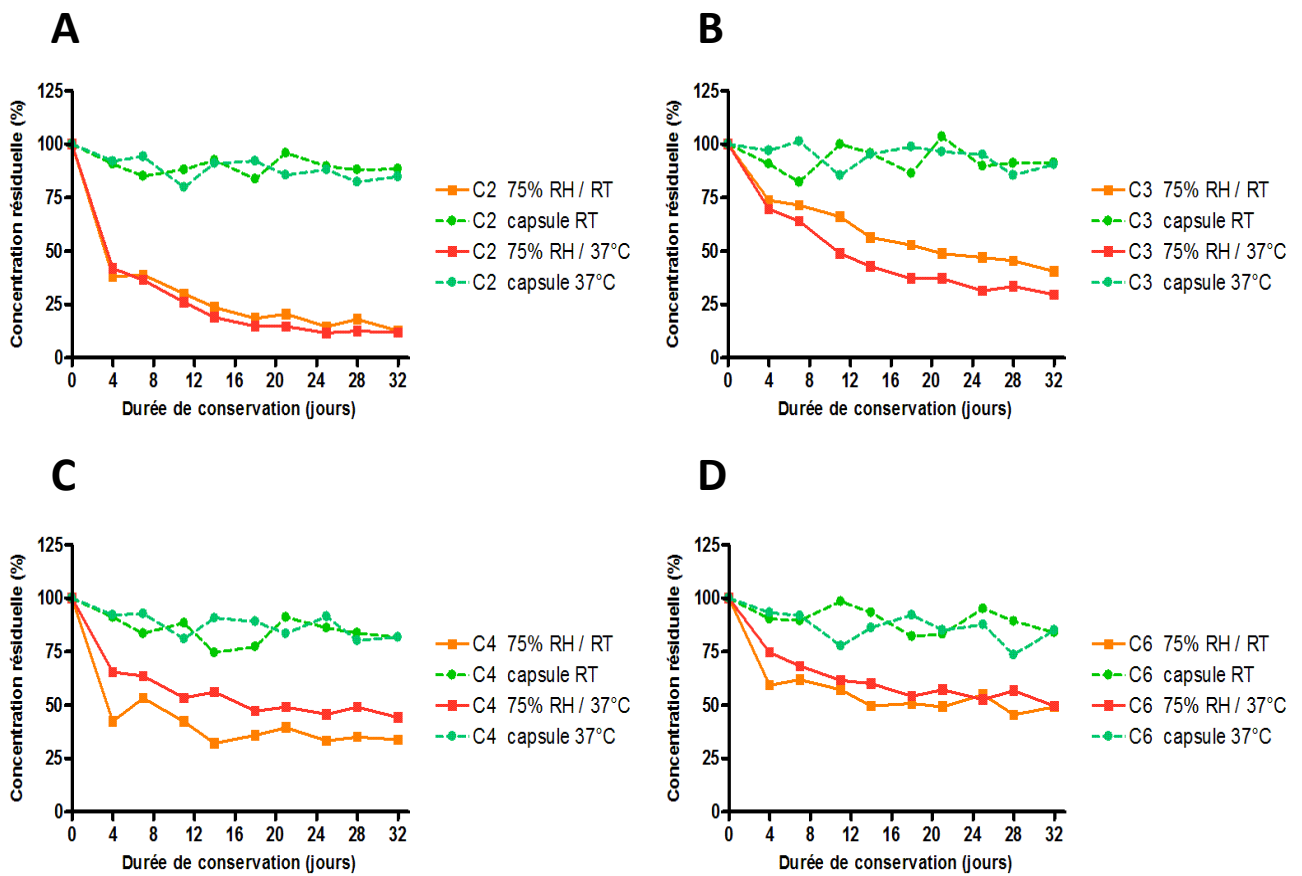


Figure 14 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne courte en C2(A), C3(B), C4(C) et C6(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

La concentration des acylcarnitines à chaîne moyenne, longue et du glutarylcarnitine (C5DC) reste stable durant les 32 jours de l'étude 1. Aucune dégradation significative n'est observée pour ces derniers dans les deux conditions « capsule ouverte » et « capsule fermée ». Les pourcentages de perte varient entre -2% et 14% en capsule ouverte et entre -27% et 5% en capsule fermée (**Tableau 14 et Figure 22B**). L'ensemble des pourcentages de perte sont proches des CV% de la reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 13**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans les **Figures 15, 16 et 17**.

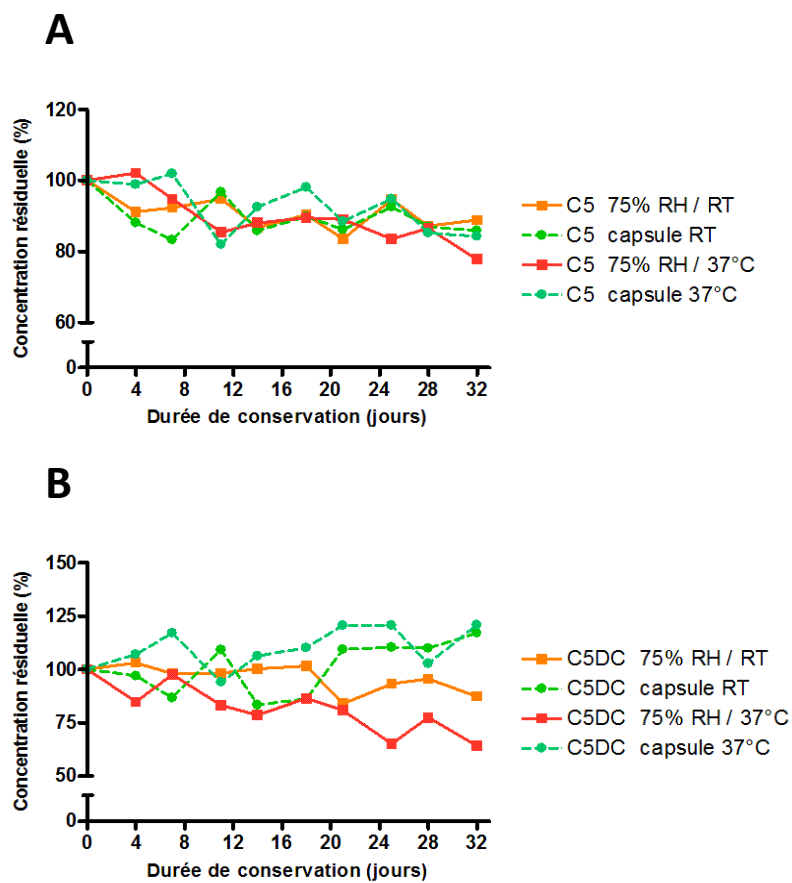


Figure 15 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne courte en C5(A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

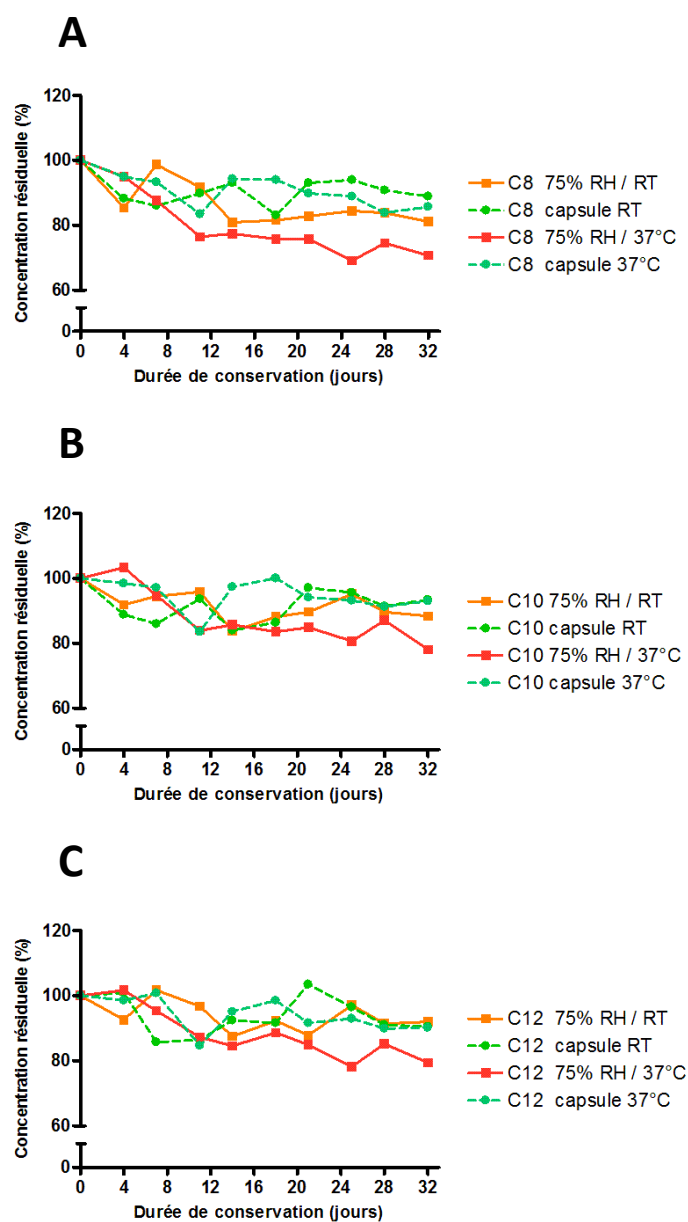


Figure 16 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8(A), C10(B) et C12(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

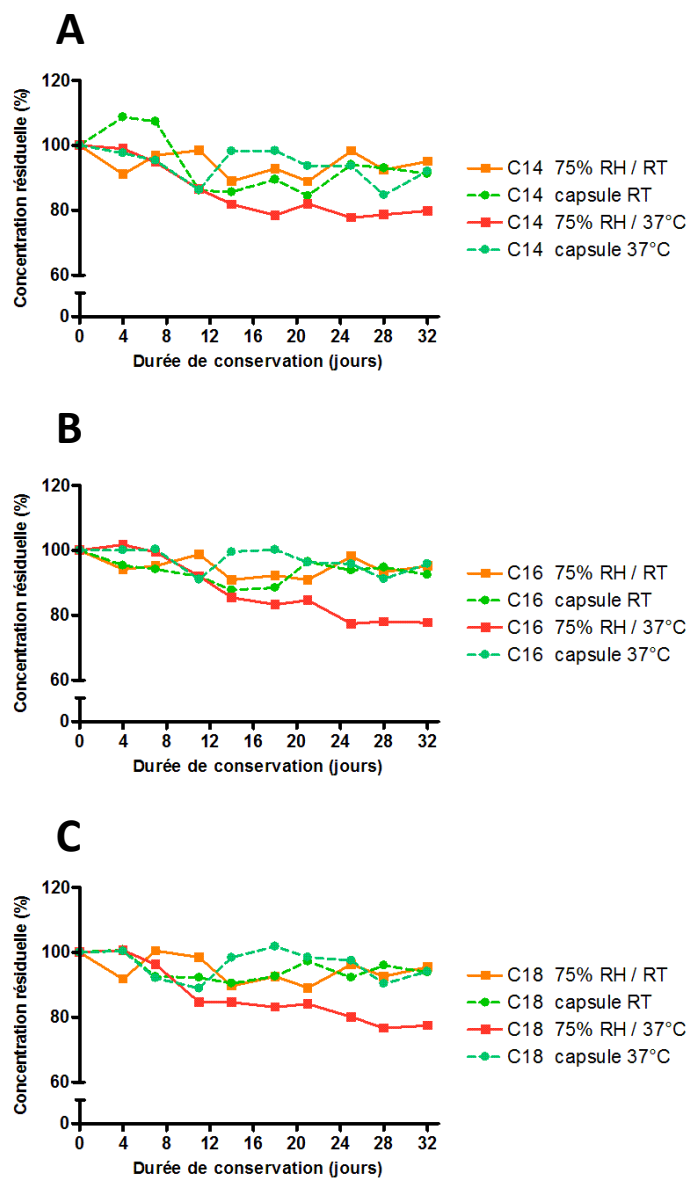


Figure 17 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne longue en C14(A), C16(B) et C18(D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

L'hémoglobine S présente une variation de concentration significative pour les échantillons stockés en capsules ouvertes avec des pourcentages de perte à J32 de l'ordre de 39% (**Tableau 14 et Figure 21**). En capsule fermée le pourcentage de perte (PPF) à J32 de -1% est négligeable et inférieur au CV% (2.6) de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 11**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 18**. Le PPI (40%) correspondant est presque égal au PPF en capsule ouverte ce qui est en accord avec une protection complète de la dégradation de l'HbS par la capsule IMAGENE®. (**Tableau 14**).

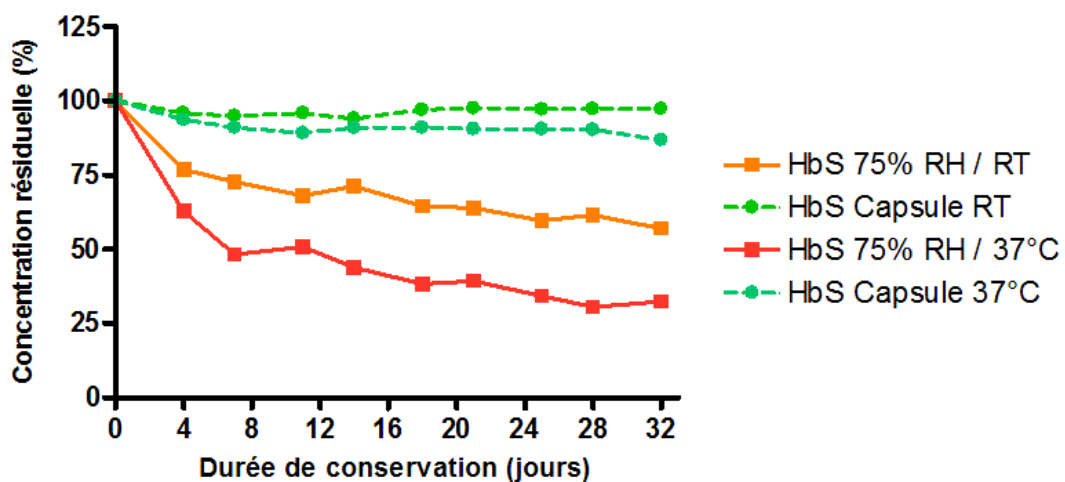


Figure 18 - Concentrations résiduelles de l'hémoglobine S en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

Concernant le groupe de marqueurs 17OHP, TIR, T4T et TSH, aucune dégradation significative n'est observée dans les deux conditions « capsule ouverte » et « capsule fermée » pour les 3 marqueurs 17OHP, T4T et TSH. A J32, les pourcentages de perte dans la capsule ouverte varient entre 0% (T4T) et 11% (17OHP) et entre 1% (TSH) et 8% (17OHP) dans la capsule fermée. La concentration du biomarqueur de la mucoviscidose (TIR) baisse de manière significative pour les échantillons stockés en capsule ouverte (PPF de 16%) (**Tableau 14 et Figure 21**). Aucune dégradation significative n'est observée pour les échantillons en capsule fermée pour ce même marqueur avec un PPF de -2%, bien inférieur au CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 11**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 19**.

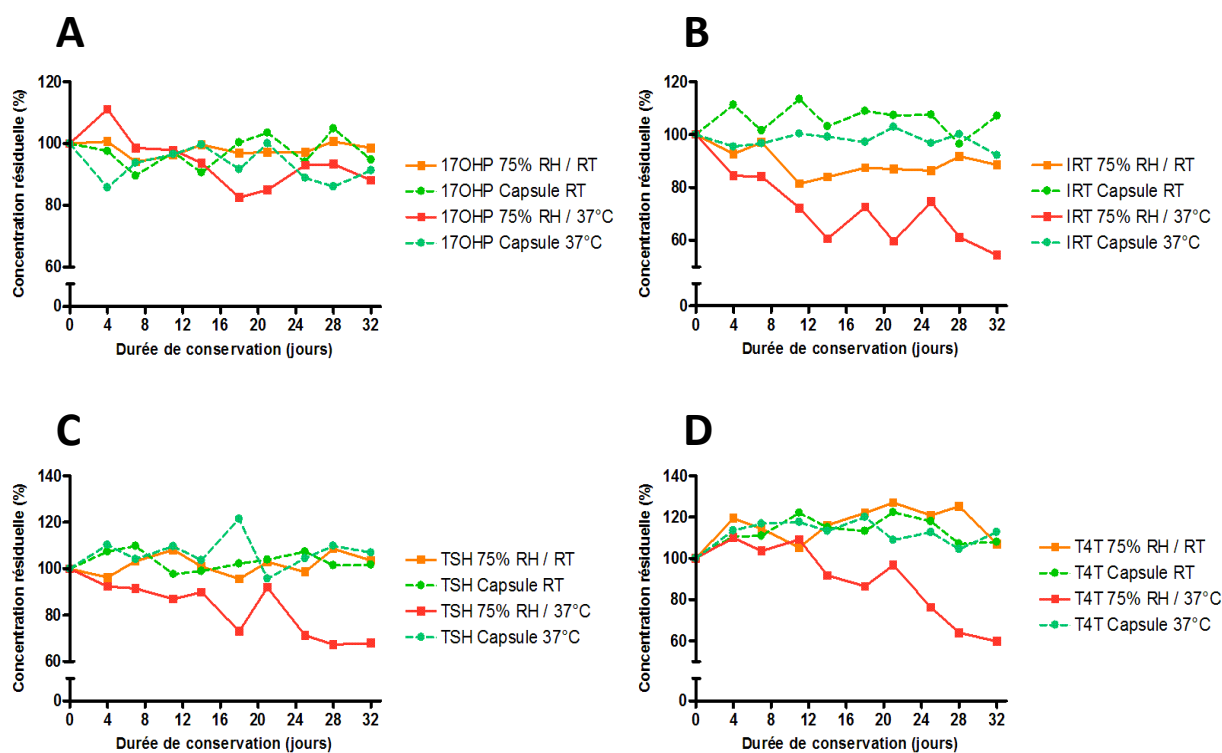


Figure 19 - Concentrations résiduelles des marqueurs 17OHP (A), IRT (B), TSH (C) et T4T (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

Les marqueurs TREC (SCID) niveau haut et bas présentent des pourcentages de dégradation significatifs en capsule ouverte respectivement de 20% et 33%. En capsule fermée, les pourcentages de perte à J28 (PPF) sont respectivement de 0% et 5%. Les PPI correspondants sont de 20% et 28% (**Tableau 14 et Figure 21**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 20**.

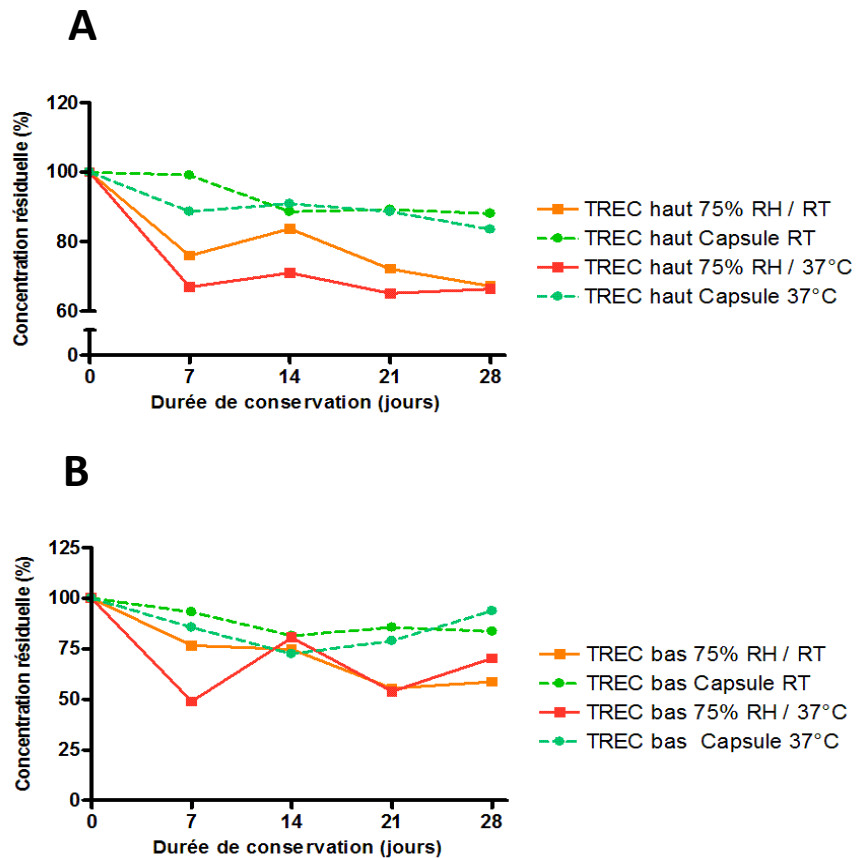


Figure 20 - Concentrations résiduelles des marqueurs TREC haut (A) et bas (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des études 1 et 2.

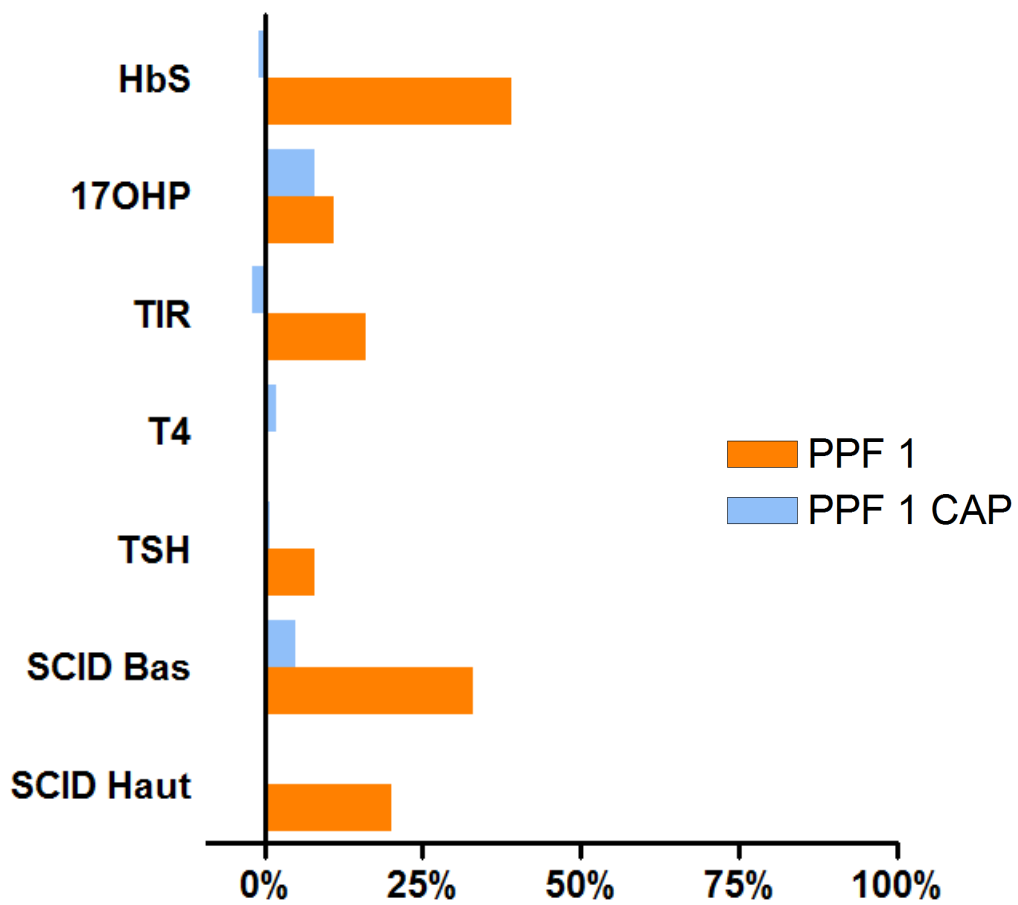


Figure 21 - Pourcentages de perte finaux (J32) des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 1.

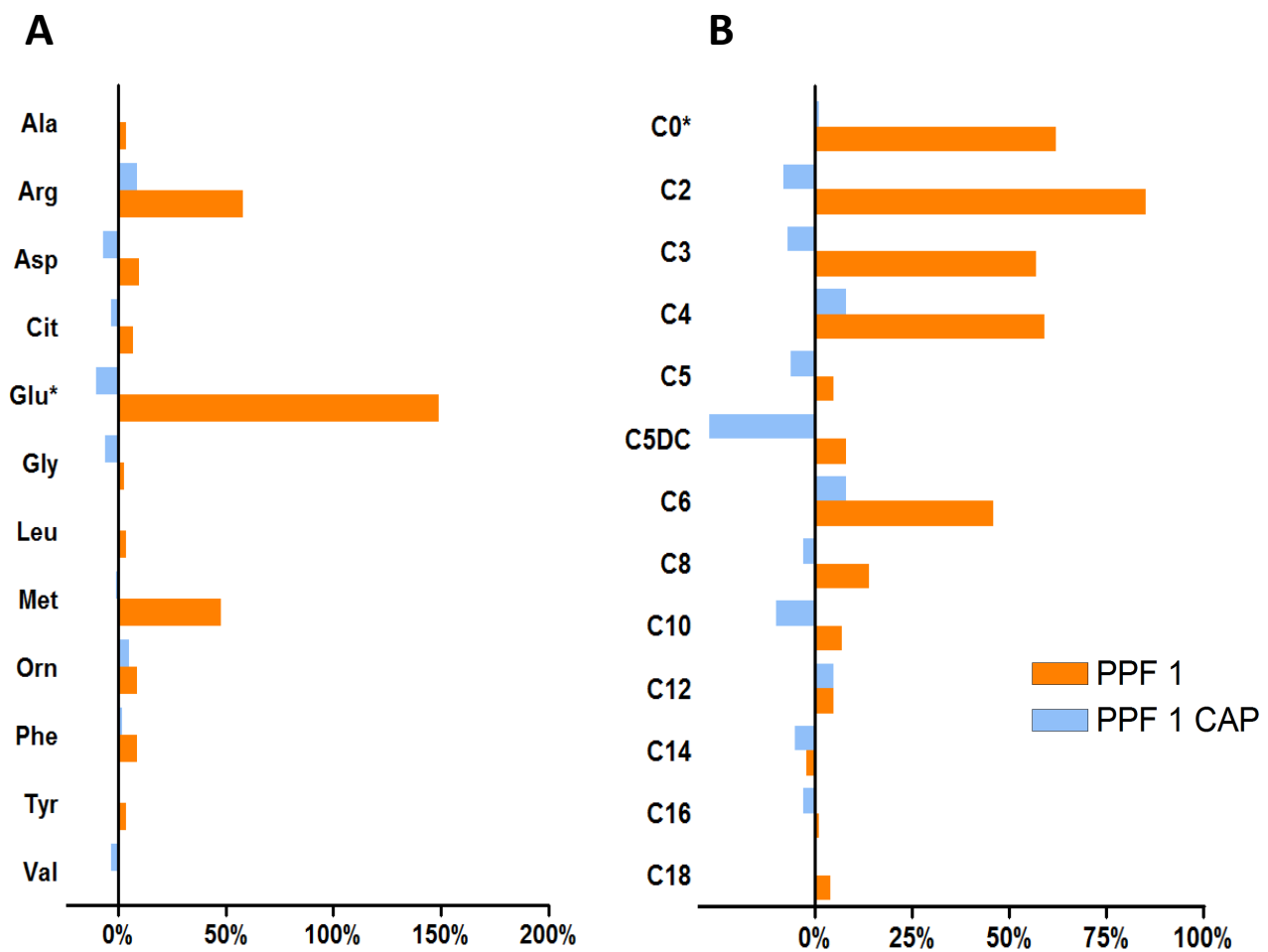


Figure 22 - Pourcentages de perte finaux (J32) des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 1.

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Tableau 15 - Pourcentages de perte à J32(PPF) et pourcentages protecteur IMAGENE® (PPI) pour chaque paramètre dans l'étude 2 de dégradation accélérée.

Biomarqueur	PPF étude 2		PPI
	Capsule ouverte	Capsule fermée	
Ala	17%*	12%	5%
Arg	44%**	6%	37%
Asp	12%	2%	10%
Cit	23%**	10%	13%
Glu	-67%**	15%	-82%
Gly	33%**	11%	22%
Leu	23%**	12%	11%
Met	96%**	13%	83%
Orn	55%**	18%	37%
Phe	30%**	9%	22%
Tyr	28%**	8%	21%
Val	17%**	14%	3%
C0	-41%**	4%	-45%
C2	86%**	12%	74%
C3	68%**	8%	59%
C4	49%**	11%	37%
C5	20%	16%	3%
C5DC	45%**	-9%	54%
C6	46%**	10%	36%
C8	29%**	13%	16%
C10	21%**	10%	11%
C12	21%**	11%	10%
C14	20%**	11%	9%
C16	23%**	5%	18%
C18	24%**	6%	18%
T4T	53%**	-1%	54%
TSH	40%**	-5%	45%
17OHP	9%	9%	0%
TIR	49%**	8%*	41%
HbS	67%**	10%**	57%
SCID faible (TREC)	10%	13%	-3%
SCID haut (TREC)	18%	6%	13%

3.3.2.2 / Étude 2 : Dégradation des biomarqueurs en atmosphère humide et chaude

Par rapport à l'étude 1, l'augmentation de la température à 37°C provoque des variations de concentration plus importantes pour les biomarqueurs étudiés. L'arginine, la méthionine, l'acide glutamique, la citrulline, la glycine, la leucine, l'ornithine, la phénylalanine, la tyrosine, l'alanine et la valine présentent des variations de concentrations significatives pour les échantillons stockés en capsules ouvertes avec des pourcentages de perte à J32 respectivement de 44%, 96%, -67%, 23%, 33%, 23%, 55%, 30%, 28%, 17% et 17% (**Tableau 15 et Figure 24A**). Pour les échantillons en capsule fermée, les pourcentages de perte à J32 ne sont pas significatifs pour l'ensemble du panel « acides aminés ». Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans les **Figures 10, 11 et 12**. Les pourcentages de perte sont proches des CV% de la reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**). L'acide aspartique ne présente pas de baisse de concentration significative aussi bien pour les échantillons conservés dans une capsule fermée que dans une capsule ouverte. Le pouvoir protecteur du dispositif IMAGENE® exprimé en PPI est respectivement compris entre de 21 % et 83% pour les acides aminés ayant subi les plus grandes variations (**Tableau 15**).

Pour le panel « acylcarnitines et carnitine libre », des variations de concentrations significatives sont notées pour les échantillons stockés en capsules ouvertes. Les pourcentages de perte à J32 sont compris entre 20% (C14) et 86% (C2). La carnitine libre et les acylcarnitines à chaîne courte en C2, C3, C4 et C6 sont les plus instables avec des PPF respectivement de -41%, 86%, 68%, 49% et 46% pour les échantillons stockés dans une capsule ouverte et dans une atmosphère humide à 37°C. La dégradation est également significative pour les acylcarnitines à chaîne moyenne et longue. Les pourcentages de perte à J32 sont compris entre 20 et 29% (**Tableau 15 et Figure 24B**). Dans la capsule fermée, les pourcentages de perte à J32 ne sont pas significatifs pour l'ensemble du panel « acylcarnitines ». Ces mêmes pourcentages de perte sont proches des CV% de la reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 13**). Les acylcarnitines en C5 présentent des PPF à J32 non significatifs en capsule ouverte comme en capsule fermée et sont donc stables pour ces deux conditions. Contrairement à l'étude 1, le C5DC est fortement dégradé dans les échantillons conservés dans capsule ouverte. Les PPF correspondants sont respectivement de 8 et 45 % pour l'étude 1 et l'étude 2 (**Tableaux 14 et 15 et Figures 22B et 24B**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles de l'ensemble du panel « acylcarnitines et carnitine libre » sont présentées dans les **Figures 13, 14, 15, 16 et 17**.

L'hémoglobine S présente une variation de concentration significative pour les échantillons stockés en capsule ouverte avec des pourcentages de perte à J32 de l'ordre de 67%. En capsule fermée, le pourcentage de perte à J32 (PPF) est seulement de 10% (**Tableau 15 et Figure 23**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 18**. Le PPI (57%) correspondant est presque égal au PPF en capsule ouverte ce qui est en accord avec une protection complète de la dégradation de l'HbS par la capsule IMAGENE® (**Tableau 15**).

Concernant le groupe des biomarqueurs TIR, T4T et TSH, les pourcentages de perte sont plus importants que ceux observés dans l'étude 1. Ils sont respectivement de 49%, 53% et 40% lorsque les échantillons sont conservés en capsule ouverte. En capsule fermée, les pourcentages de perte à J32 ne sont pas significatifs pour les deux paramètres T4T et TSH (respectivement de -5% et -1%). En revanche il est significatif pour la TIR (8%). La 17OHP ne présente pas de dégradation significative dans les 2 conditions de conservation des échantillons (**Tableau 15 et Figure 23**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 19**.

En comparaison avec l'étude 1, le marqueur du SCID (TREC) semble plus stable au cours de l'étude 2. Aucune dégradation significative n'a été mise en évidence pour ce biomarqueur dans les 2 conditions de conservation des échantillons (**Tableau 15 et Figure 23**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 20**.

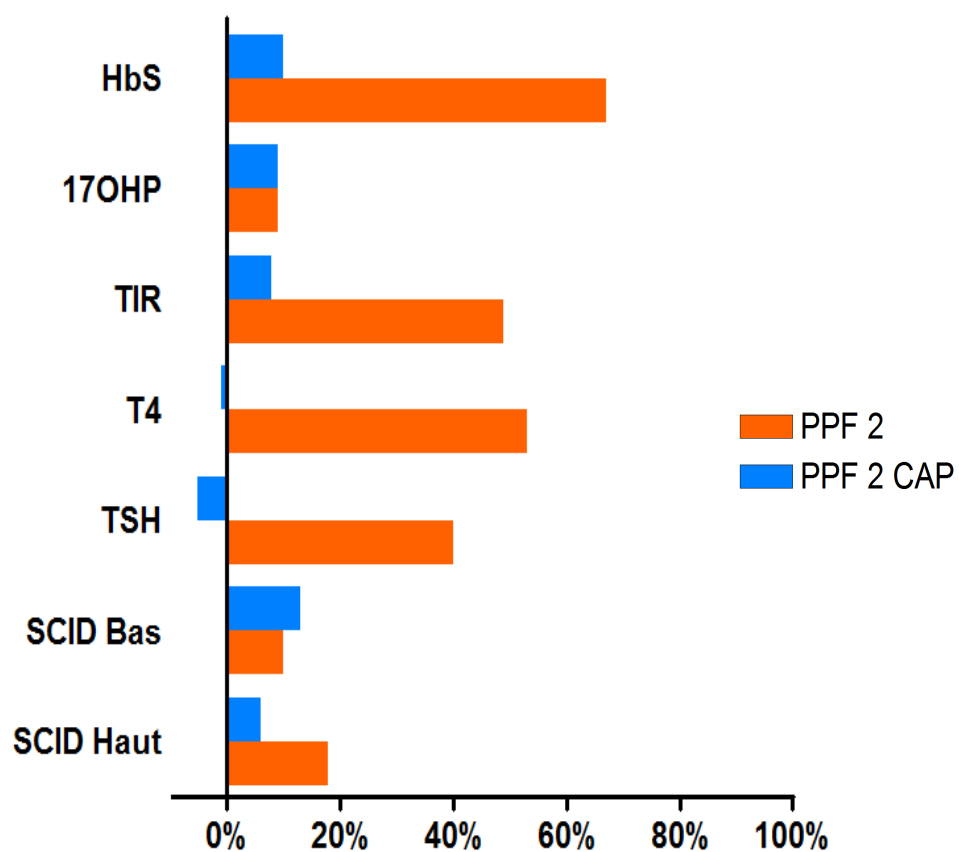


Figure 23 - Pourcentages de perte finaux (J32) des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 2.

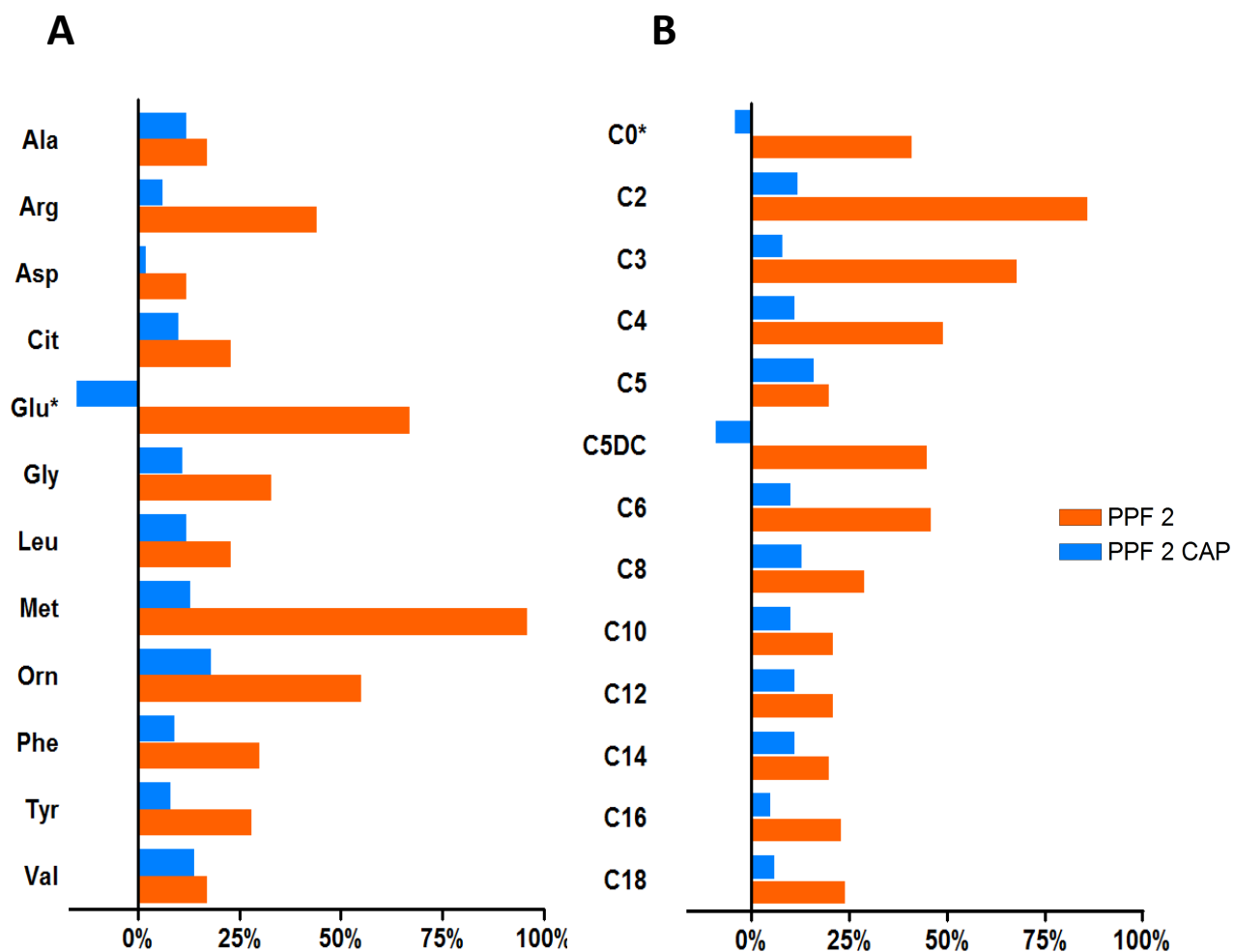


Figure 24 - Pourcentages de perte finaux (J32) des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte (PPF 1) ou fermée (PPF1 CAP) au cours de l'étude 2.

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Tableau 16 - Pourcentages de perte à J32 (PPF) des échantillons en capsule ouvertes et pourcentages de dégradation attribuable à la chaleur calculé (PDAC) pour chaque paramètre au terme ses études 1 et 2 de dégradation accélérée.

Biomarqueur	PPF étude 1	PPF étude 2	PDAC
	Capsule ouverte	Capsule ouverte	
Ala	4%	17%*	13%
Arg	58%**	44%**	-14%
Asp	10%	12%	2%
Cit	7%	23%**	16%
Glu	-149%**	-67%**	-82%
Gly	3%	33%**	30%
Leu	4%	23%**	19%
Met	48%**	96%**	48%
Orn	9%	55%**	44%
Phe	9%	30%**	21%
Tyr	4%	28%**	24%
Val	0%	17%**	17%
C0	-62%**	-41%**	-21%
C2	85%**	86%**	1%
C3	57%**	68%**	11%
C4	59%**	49%**	-10%
C5	5%	20%	15%
C5DC	8%	45%**	37%
C6	46%**	46%**	0%
C8	14%	29%**	15%
C10	7%	21%**	14%
C12	5%	21%**	16%
C14	-2%	20%**	22%
C16	1%	23%**	22%
C18	4%	24%**	20%
T4T	0%	53%**	53%
TSH	8%	40%**	32%
17OHP	11%	9%	-2%
TIR	16%*	49%**	33%
HbS	39%**	67%**	28%
SCID faible (TREC)	33%*	10%	-23%
SCID haut (TREC)	20%**	18%	-2%

3.3.2.3 / Comparaison des études 1 et 2

L'effet de la température sur la cinétique de dégradation des biomarqueurs testés est évalué par la comparaison des PPF obtenus dans les deux études de dégradation accélérée 1 (humidité + température ambiante) et 2 (humidité + température 37°C). Cet effet est exprimé par le calcul de la valeur du pourcentage de dégradation associé à la chaleur ou « PDAC ». Plus ce pourcentage est proche du PPF de fin d'étude 2 plus la dégradation du biomarqueur testé est dépendante de la température. Dans le cas où le PDAC est négatif, il est fort probable que la dégradation du composé soit uniquement liée à l'effet de l'humidité et donc indépendante de la chaleur. En revanche, pour les paramètres tels que l'acide glutamique et la carnitine libre dont la concentration augmentent durant la dégradation de l'échantillon, un PDAC négatif est à l'inverse en faveur d'un effet de la température sur la dégradation de leurs précurseurs (glutamine et acylcarnitines principalement à chaîne courte). Les **Figures 25 et 26** présentent les PPF comparés des études 1 et 2 pour l'ensemble des biomarqueurs testés.

L'ornithine n'est pas dégradée au cours de l'étude 1. Elle perd 55% de sa concentration initiale au cours de l'étude 2. Son PDAC est important (44%) et très proche du PPF de l'étude 2 (55%). L'acide glutamique présente un PDAC négatif de l'ordre de -82%. Sa concentration est donc sensible à l'élévation de température du milieu de conservation. La glycine, la méthionine et la tyrosine constituent un groupe de sensibilité intermédiaire avec des PDAC respectifs de 30%, 48% et 24%. Les autres acides aminés testés présentent des PDAC inférieures à 24% (**Tableau 16**).

Bien que leurs pertes (ou gains) de concentration soient importantes au cours des études 1 et 2, la carnitine libre et les acylcarnitines à chaîne courte en C2, C3, C4 et C6 ne semblent pas présenter une sensibilité importante à la chaleur. Les PDAC respectifs sont parmi les plus bas du groupe « acylcarnitines » avec des valeurs respectives de 1%, 11% et 0% pour C2, C3 et C6. En revanche, les acylcarnitines à chaîne longue en C14, C16, C18 sont plus sensibles à l'effet « chaleur ». Les PDAC sont respectivement de 22%, 22% et 20%. Les acylcarnitines à chaîne moyenne présentent une sensibilité intermédiaire à la chaleur. Les PDAC pour les acylcarnitines à chaînes moyennes en C8, C10 et C12 sont respectivement de 15%, 14% et 16%. Le C5DC est fortement dégradée à haute température. Son PDAC est égal à 37% et est le plus élevé du groupe « carnitine et acylcarnitines » (**Tableau 16**).

L'hémoglobine S est sensible à la chaleur. Le pourcentage de dégradation final (PPF) de l'étude 2 est largement supérieur au PPF de l'étude 1. Le PDAC de l'hémoglobine est de 28% (**Tableau 16**). Au sein du groupe des biomarqueurs 17OHP, TIR, T4T et TSH, l'humidité et la combinaison humidité/température n'ont que peu d'effet sur la stabilité de la 17OHP. Le PDAC de la 17OHP est de -2%. Les 3 autres marqueurs présentent une sensibilité importante vis-à-vis de la température de conservation des échantillons. Les PDAC respectifs de la TIR, la T4T et la TSH sont de 33%, 53% et 32% (**Tableau 16**). Pour le marqueur SCID (niveau haut et bas), les pourcentages de dégradation final (PPF) de l'étude 1 sont supérieurs à ceux de l'étude 2 (**Tableau 16**).

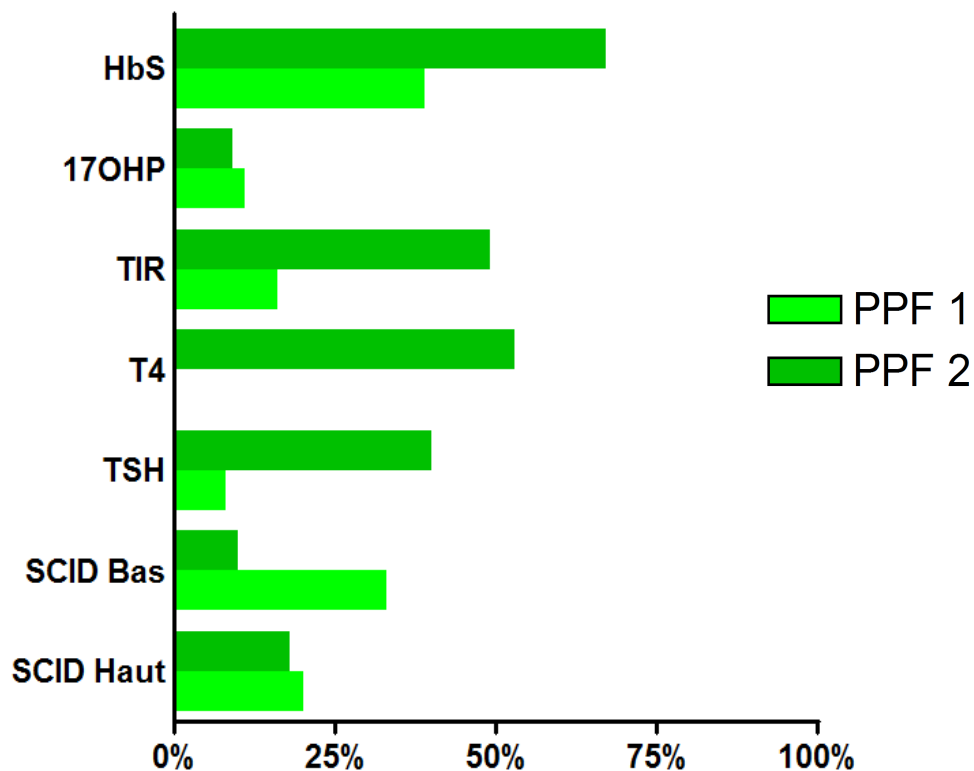


Figure 25 - Pourcentages de perte finaux (J32) comparés des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés en capsule ouverte au cours des études 1 (PPF 1) et 2 (PPF2).

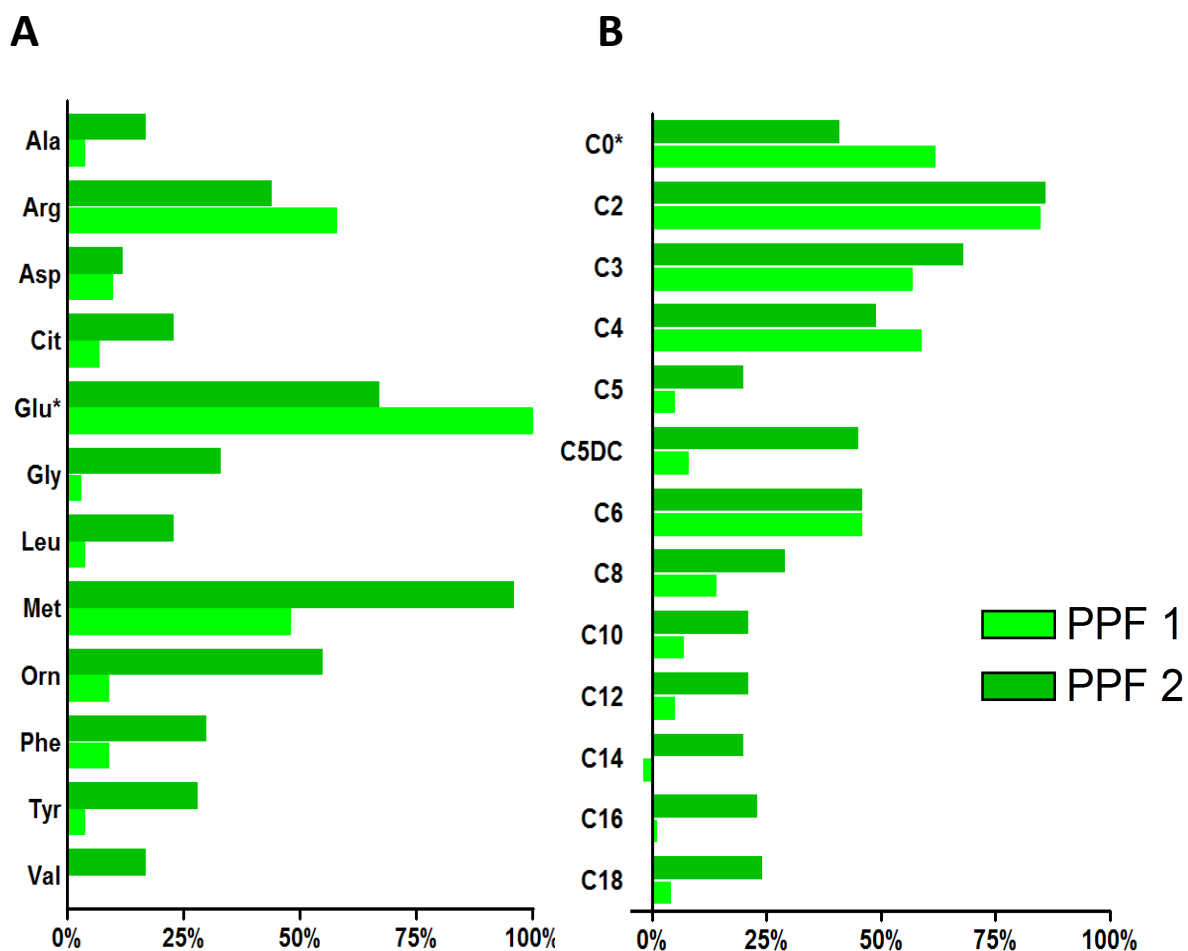


Figure 26 - Pourcentages de perte finaux (I32) comparés des acides aminés (A) et acylcarnitines (B) pour les échantillons conservés en capsule ouverte au cours des études 1 (PPF 1) et 2 (PPF2).

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

3.3.3 / Etude 3 : Etude de conservation à long terme

L'objectif de l'étude 3 ou étude de conservation à long terme est d'évaluer la stabilité des marqueurs biologiques du DDN dans deux conditions « classiques » de conservation des buvards (+4° et -20°C) ainsi dans un dispositif innovant « capsule fermée IMAGENE® » à température ambiante. Les résultats de l'ensemble des pourcentages de perte des différents biomarqueurs pour les 3 conditions de conservation à 12 et 24 mois de l'étude 3 sont présentés au sein des **tableaux 17, 18 et 19**.

Tableau 17 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des marqueurs TSH, 17OHP, TIR, HbS et SCID pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme.

Biomarqueur	PP à 12 mois étude 3			PP à 24 mois étude 3		
	+ 4°C	- 20°C	RT capsule	+ 4°C	- 20°C	RT capsule
TSH	10%	20*%	9%	29***%	21***%	15%
17OHP	10%	6%	18%	12%	9%	12%
TIR	14***%	2%	1%	26***%	18***%	5%
HbS	33***%	4%	9*%	48***%	6%	8*%
SCID faible (TREC)	-9%	57%**	23%	-7%	8%	5%
SCID haut (TREC)	-2%	29%**	12%	-4%	28%**	12%

Tableau 18 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des acides aminés pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme.

Biomarqueur	PP à 12 mois étude 3			PP à 24 mois étude 3		
	+ 4°C	- 20°C	RT capsule	+ 4°C	- 20°C	RT capsule
Ala	-13%	-2%	-14%	-3%	1%	—
Arg	-1%	-7%	2%	34%	14%	—
Asp	-7%	0%	14%	16%	8%	—
Cit	5%	-6%	-3%	24%	16%	—
Glu	-1%	-1%	-20%	-26%	1%	—
Gly	15%	11%	6%	38%*	17%	—
Leu	6%	10%	6%	6%	1%	—
Met	43%**	9%	8%	85%**	1%	—
Orn	25%	3%	11%	50%**	17%	—
Phe	6%	11%	7%	19%*	15%*	—
Tyr	14%	15%**	13%	35%**	25%**	—
Val	-8%	1%	-2%	-19%	-25%**	—

RT capsule : échantillon conservé en capsule IMAGENE scellée et à température ambiante.

Tableau 19 - Pourcentages de perte à 12 et 24 mois des acylcarnitines pour chaque condition de conservation des échantillons au cours de l'étude 3 de conservation à long terme.

Biomarqueur	PP 12 mois étude 3			PP 24 mois étude 3		
	+ 4°C	- 20°C	RT capsule	+ 4°C	- 20°C	RT capsule
C0	-16%	9%	-2%	-40%**	12%	—
C2	5%	-6%	-6%	66%**	12%	—
C3	2%	6%	0%	44%**	8%	—
C4	4%	12%	13%	21%	9%	—
C5	-15%	8%	-2%	-5%	9%	—
C5DC	-13%	10%	12%	38%	21%	—
C6	-3%	-4%	4%	26%**	13%	—
C8	-10%	1%	-1%	16%	12%	—
C10	-10%	2%	0%	3%	6%	—
C12	1%	9%	6%	11%	11%	—
C14	-1%	13%	4%	17%	14%	—
C16	1%	6%	4%	19%	14%	—
C18	8%	12%	9%	27%*	17%*	—

RT capsule : échantillon conservé en capsule IMAGENE scellée et à température ambiante. PP : Pourcentage de perte

Après 12 mois de conservation, dans le groupe acides aminés, seules les concentrations de deux acides aminés, la méthionine et la tyrosine diminuent de façon significative dans certaines conditions. La méthionine présente un pourcentage de perte significatif de 43% pour les échantillons conservés à +4°C. En revanche, elle reste stable dans les échantillons conservés à -20°C et dans la capsule IMAGENE® scellée (Pourcentages de perte de 9 et 8% respectivement). La tyrosine présente une dégradation significative uniquement à -20°C avec un pourcentage de perte à 12 mois de l'ordre de 15%. (**Tableau 18 et Figure 29**). Les pourcentages de perte pour le reste des acides aminés ne sont pas significatifs quelle que soit la condition de conservation. Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles à 12 mois sont présentées dans les **Figures 27 et 28**. Les variations notées à 12 mois sont proches des CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**). Les biomarqueurs acides aminés sont stables à température ambiante dans la capsule IMAGENE®.

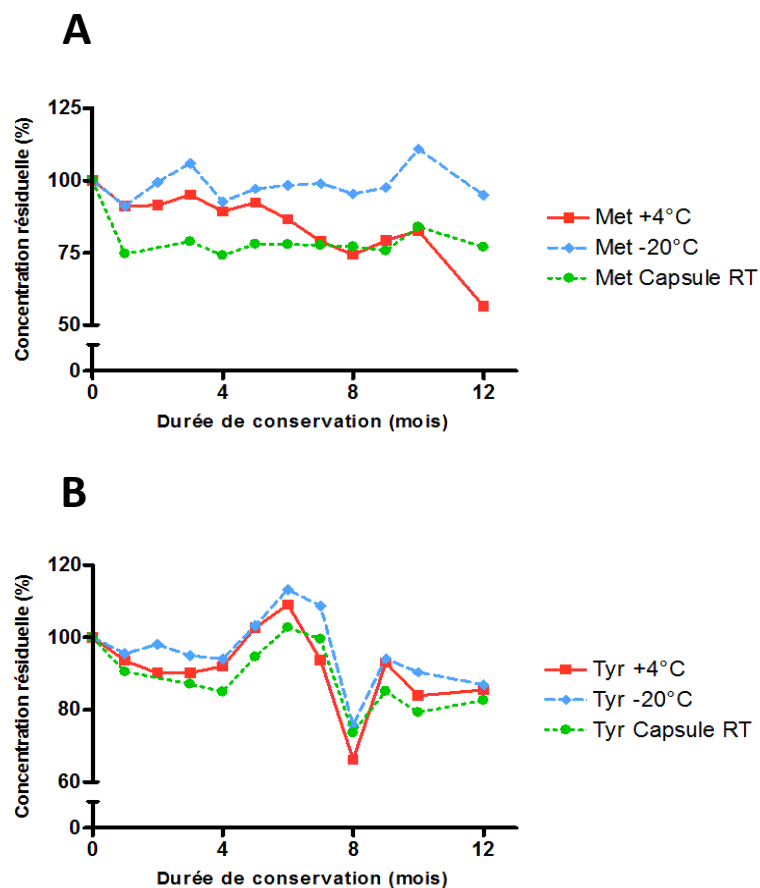


Figure 27 - Concentrations résiduelles des acides aminés méthionine (A) et tyrosine (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3.

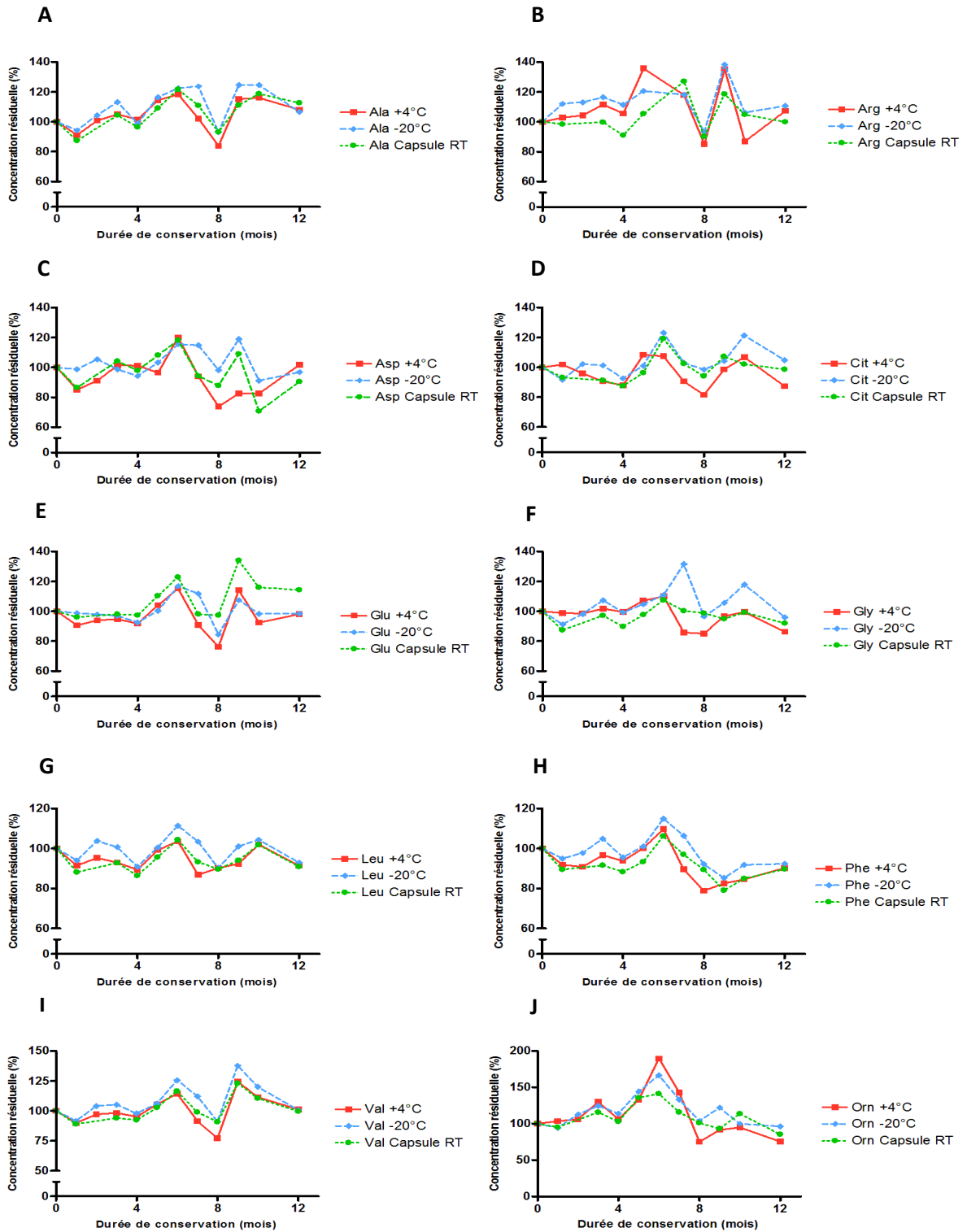


Figure 28 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), arginine (B), acide aspartique (C), citrulline (D), glutamine (E), glycine (F), leucine (G), phénylalanine (H), valine (I) et ornithine (J), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3.

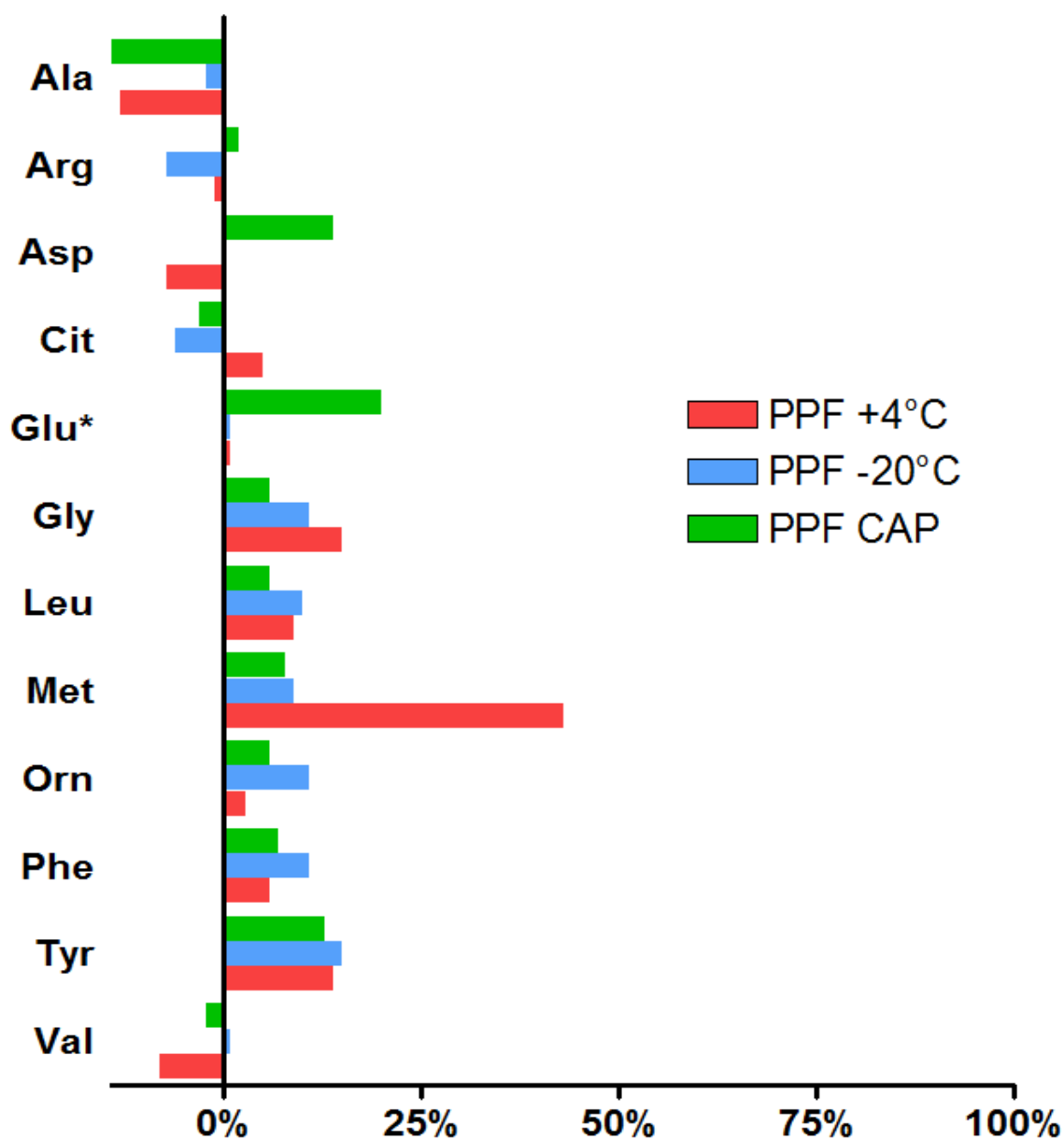


Figure 29 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des acides aminés pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP).

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Après 12 mois de conservation des échantillons dans les trois conditions (+4°, -20°C et capsule IMAGENE® à température ambiante) aucune variation de concentration significative n'est observée pour le panel « acylcarnitines et carnitine libre ». Les biomarqueurs sont stables à température ambiante dans la capsule IMAGENE® fermée. Pour l'ensemble du groupe, les pourcentages de perte dans les 3 conditions de conservation sont compris entre 13% (C14 / -20°C) et -16% (C0 / +4°C) (**Tableau 19 et Figure 33**). Les pourcentages de perte sont proches des CV% de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 13**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles à 12 mois sont présentées dans les **Figures 30, 31 et 32**.

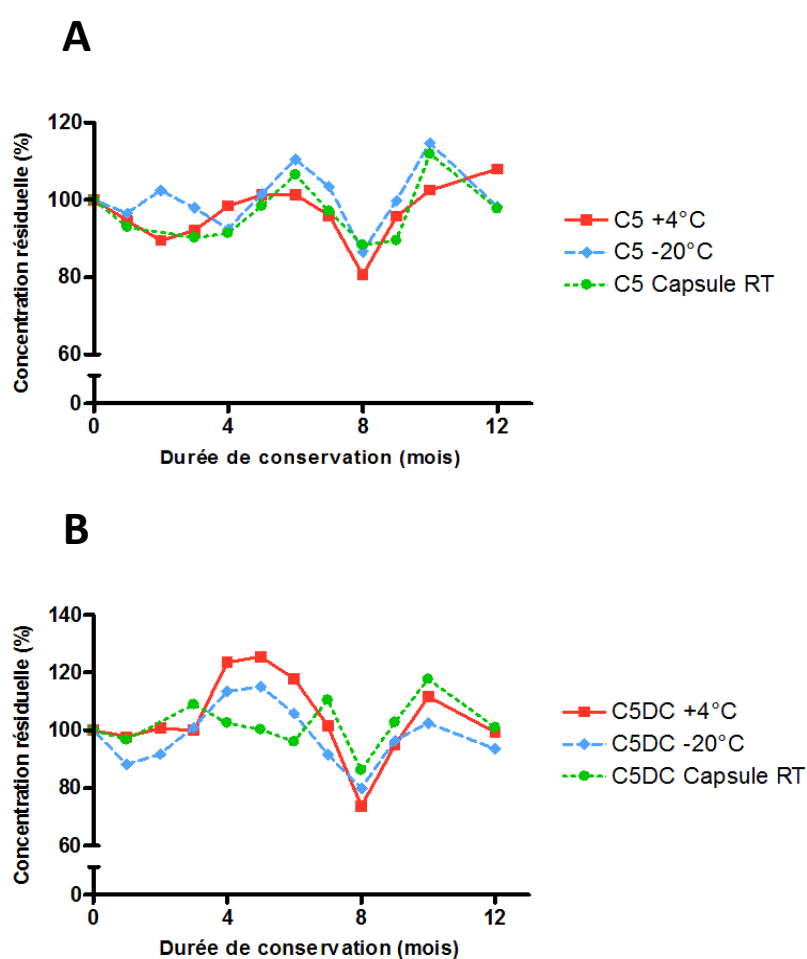


Figure 30 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines en C5 (A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3.

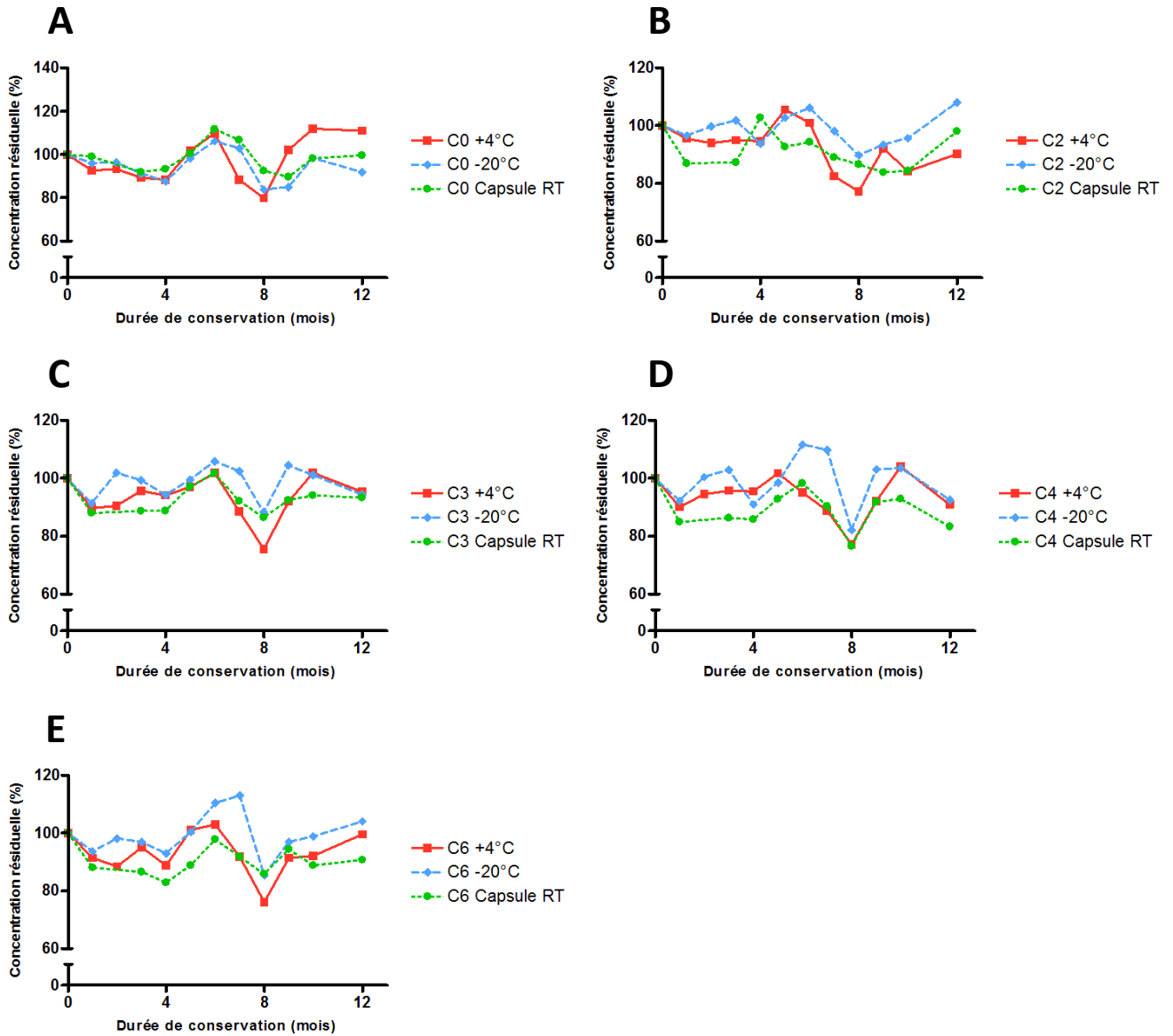


Figure 31 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre (A) et des acylcarnitines à chaîne courte en C2 (B), C3 (C), C4 (D) et C6 (E), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3.

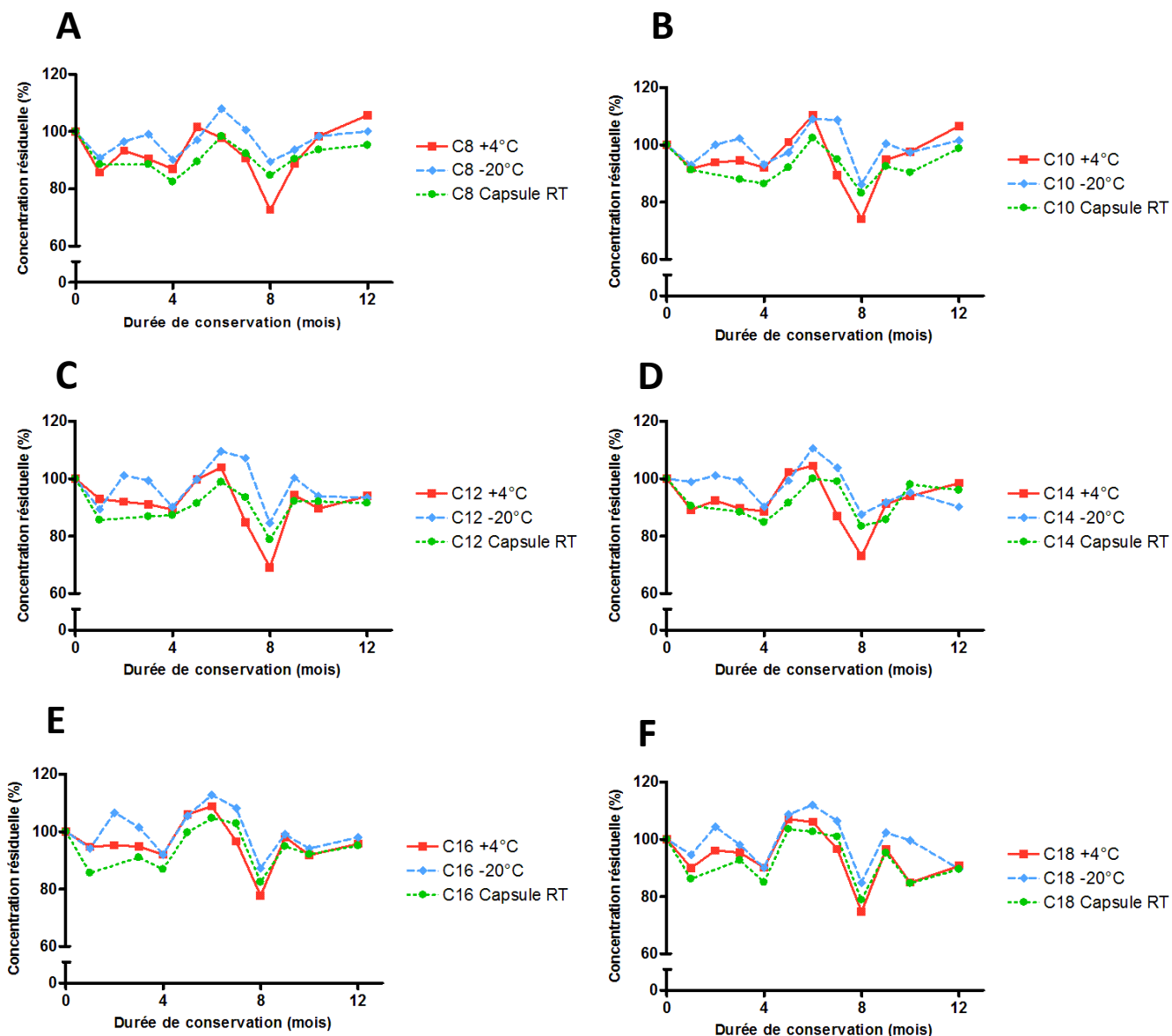


Figure 32 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8 (A), C10 (B) et C12 (C) et des acylcarnitines à chaîne longue en C14 (D), C16 (E) et C18 (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de la première année de l'étude 3.

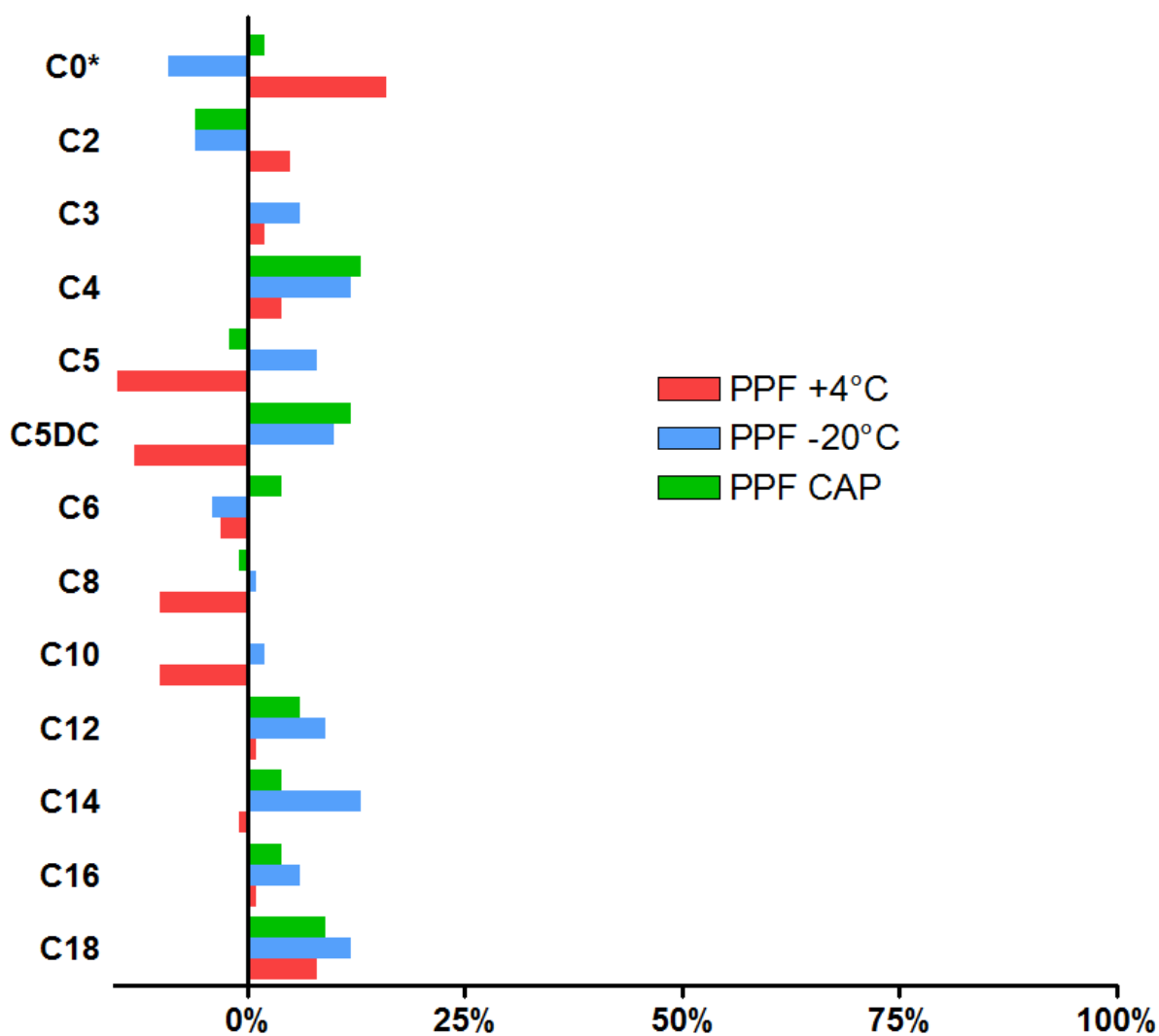


Figure 33 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des acylcarnitines pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP).

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Après un an de stockage, dans le groupe des marqueurs 17OHP/TIR/TSH, la 17 OHP est stable dans les 3 conditions de conservation. Les pourcentages de perte observés à 12 mois ne sont pas significatifs. La TIR présente une dégradation significative uniquement à +4°C. Son pourcentage de perte à 12 mois est de 14%. En revanche, la TSH est stable à +4°C et dans la capsule fermée. Elle se dégrade de façon significative uniquement à -20°C avec une perte à 12 mois de l'ordre de 20%. Les 3 biomarqueurs sont stables à température ambiante dans la capsule IMAGENE® fermée (**Tableau 17 et Figure 37**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 34**.

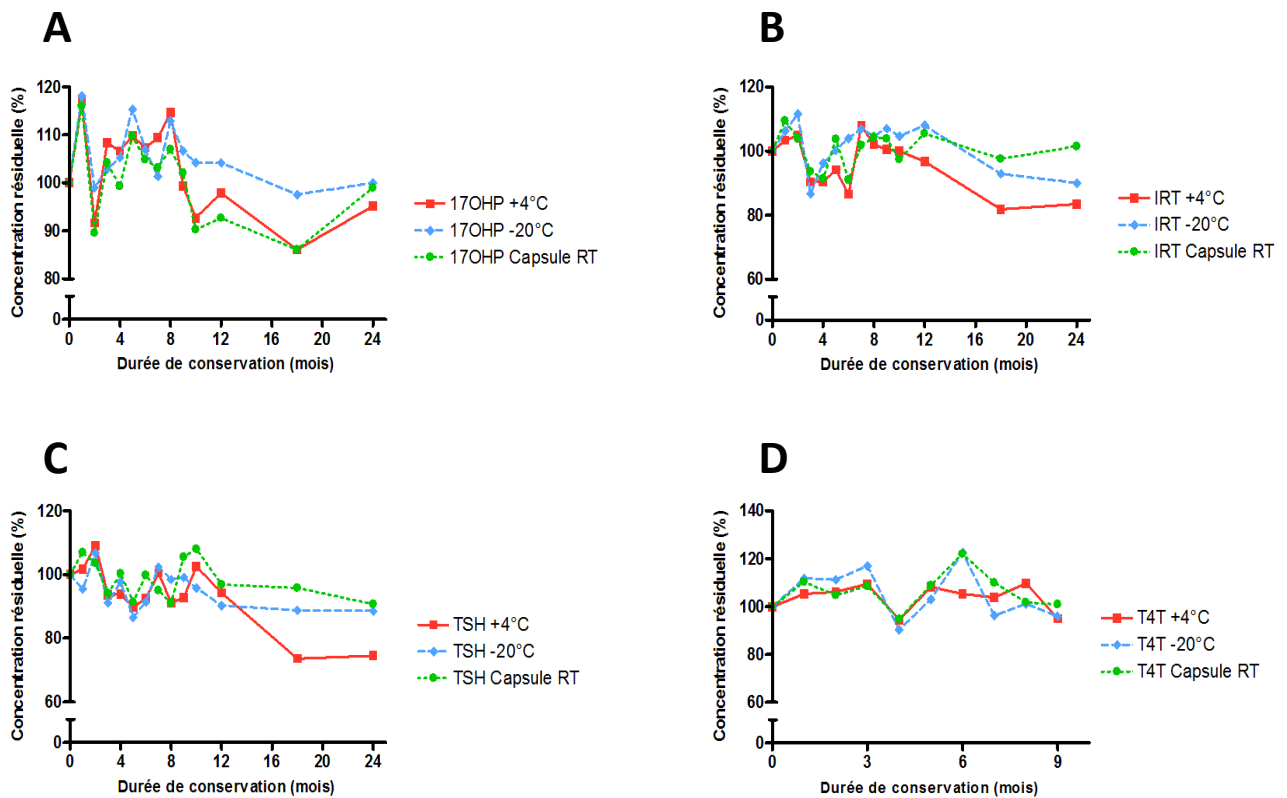


Figure 34 - Concentrations résiduelles des marqueurs 17OHP (A), IRT (B), TSH (C) et T4T (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3.

Pour des raisons techniques, la thyroxine totale (T4T) n'a pu être dosée que sur les 9 premiers mois de l'étude. Aucune dégradation significative n'a été observée pour ce composé dans les 3 conditions de conservation après 9 mois de stockage des échantillons. Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 34 D**.

L'hémoglobine S est un paramètre assez instable et fragile. A 12 mois de l'étude 3, le pourcentage de perte à +4°C est significatif et de l'ordre de 33% alors qu'il n'est que de 4% à -20°C (non significatif). L'échantillon encapsulé et stocké à température ambiante perd 9% de sa concentration initiale (**Tableau 17 et Figure 37**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 35**.

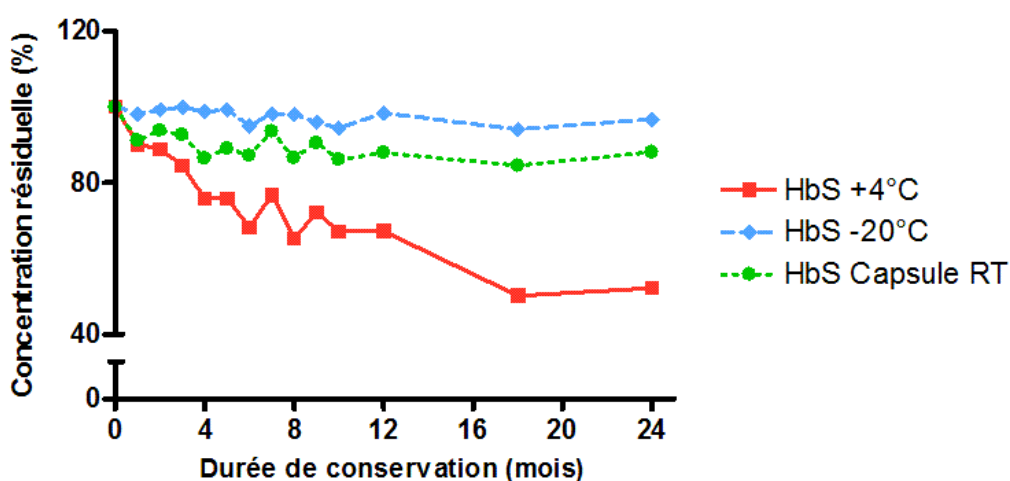


Figure 35 - Concentrations résiduelles d'hémoglobine S en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3.

Contrairement à l'HbS, les marqueurs du SCID (TREC) hauts et bas sont stables dans les échantillons conservés à +4°C et à température ambiante dans une capsule IMAGENE® fermée. Les pourcentages de perte à 1 an ne sont pas significatifs dans ces deux conditions mais semblent plus importants à température ambiante. La dégradation est importante pour les échantillons conservés à -20°C (**Tableau 17 et Figure 37**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 36**.

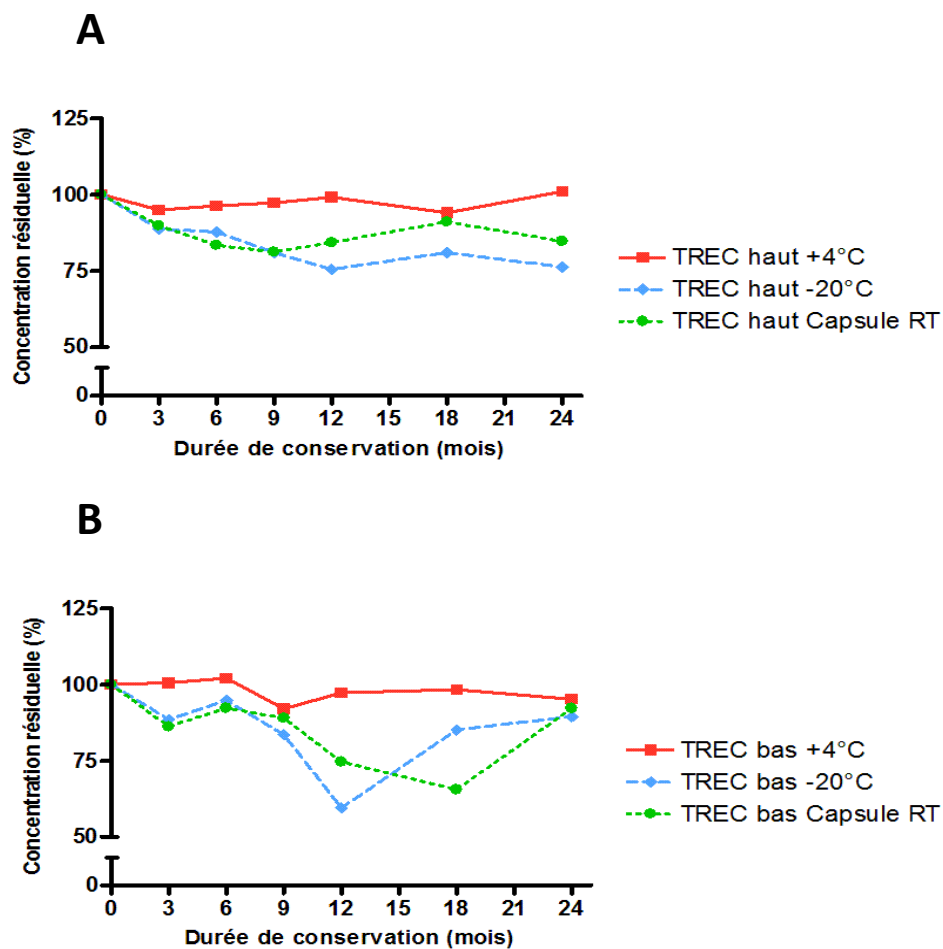


Figure 36 - Concentrations résiduelles des marqueurs TREC haut (A) et bas (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours de l'étude 3.

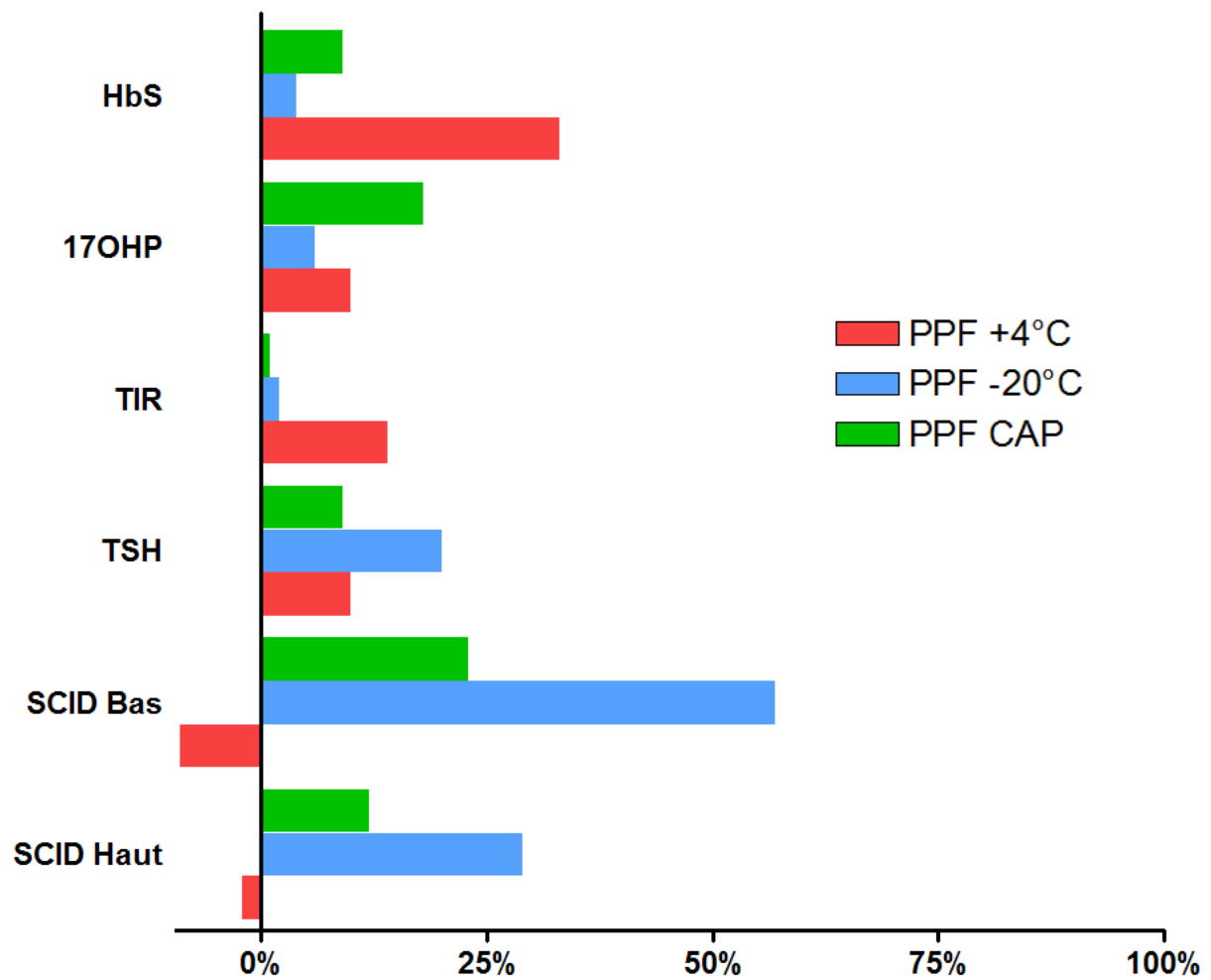


Figure 37 - Pourcentages de perte comparés à 12 mois de stockage des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP).

A 24 mois de conservation, la méthionine continue à se dégrader à +4°C et présente un pourcentage de perte significatif de 85%. La tyrosine présente une dégradation significative à -20°C et à +4°C avec des pourcentages de perte respectivement de 25 et 35 %. On constate qu'après 2 ans de conservation des échantillons, d'autres acides aminés se dégradent significativement. La valine perd 25% de sa concentration initiale à -20°C. A +4°C, l'ornithine, la glycine et la phénylalanine ont perdu respectivement et de façon significative 50%, 38% et 19% de leur concentration initiale. Les pourcentages de perte pour le reste des acides aminés ne sont pas significatifs quelle que soit la condition de conservation (**Tableau 18 et Figure 41**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles à 24 mois sont présentées dans les **Figures 38, 39 et 40**. Les pourcentages de perte sont proches des CV% de la reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**).

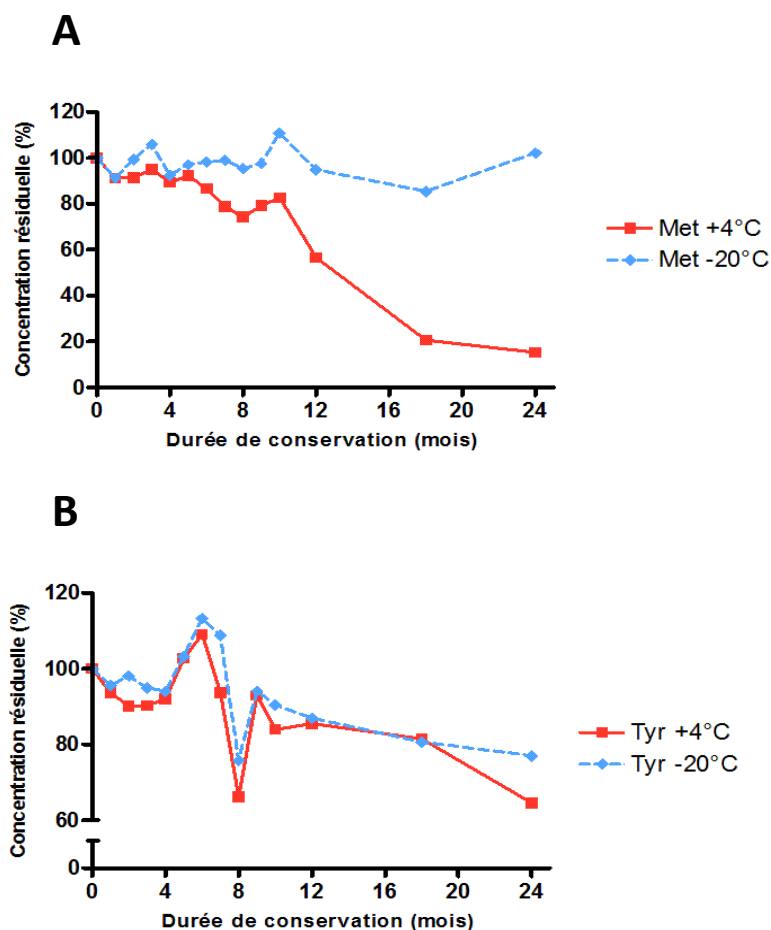


Figure 38 - Concentrations résiduelles des acides aminés méthionine (A) et tyrosine (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

En revanche, malgré des PPF plus élevés notamment à +4°C (respectivement de 34% et 24%), l'arginine et la citrulline ne présentent pas de dégradation significative dans cette condition de conservation. Leurs pourcentages de perte finaux sont plus faibles à -20°C. La concentration de l'acide glutamique augmente de façon non significative de 26% à +4°C. (**Tableau 18 et Figure 41**). Cette augmentation est expliquée par la dégradation de la glutamine au sein de l'échantillon. Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles à 24 mois sont présentées dans la **Figure 40**. Pour des raisons techniques, les biomarqueurs « acides aminés » n'ont pas été testés dans la capsule IMAGENE® fermée durant la seconde année d'étude.

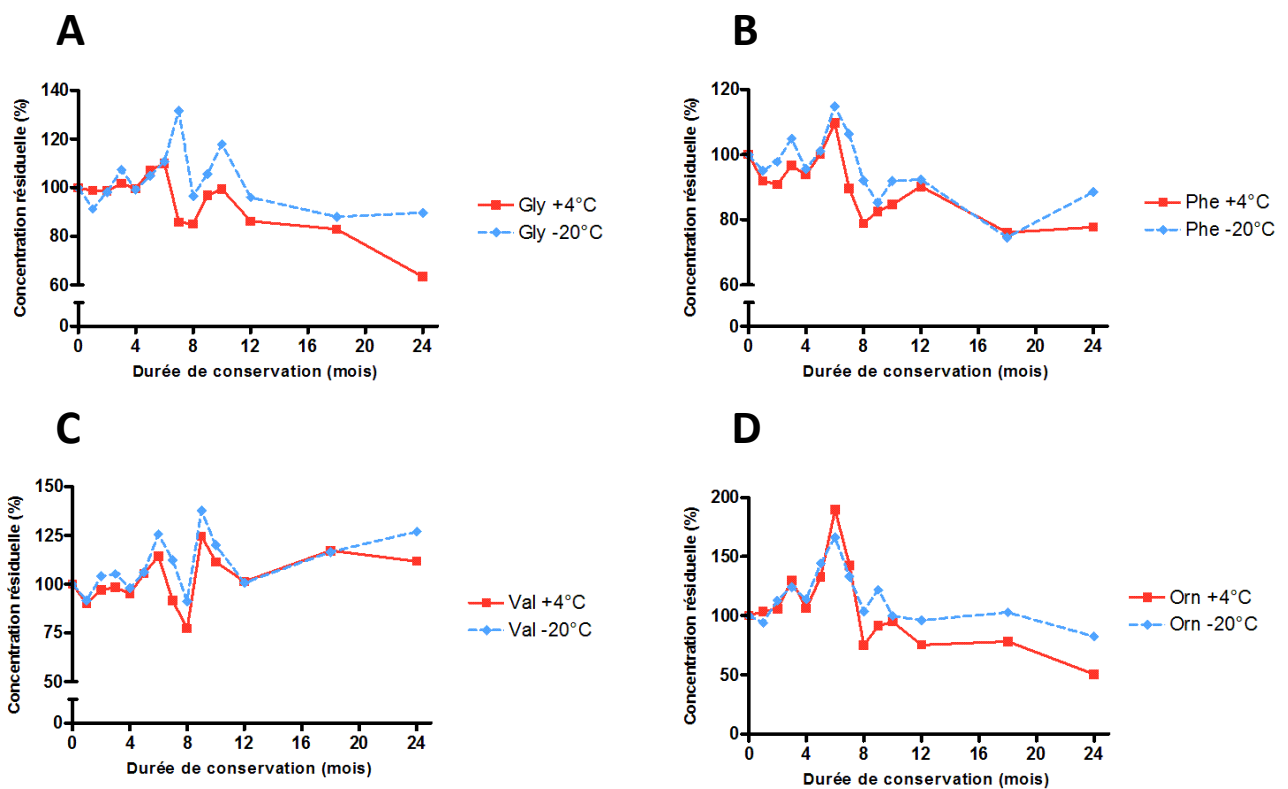


Figure 39 - Concentrations résiduelles des acides aminés glycine (A), phénylalanine (B), valine (C) et ornithine (D), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

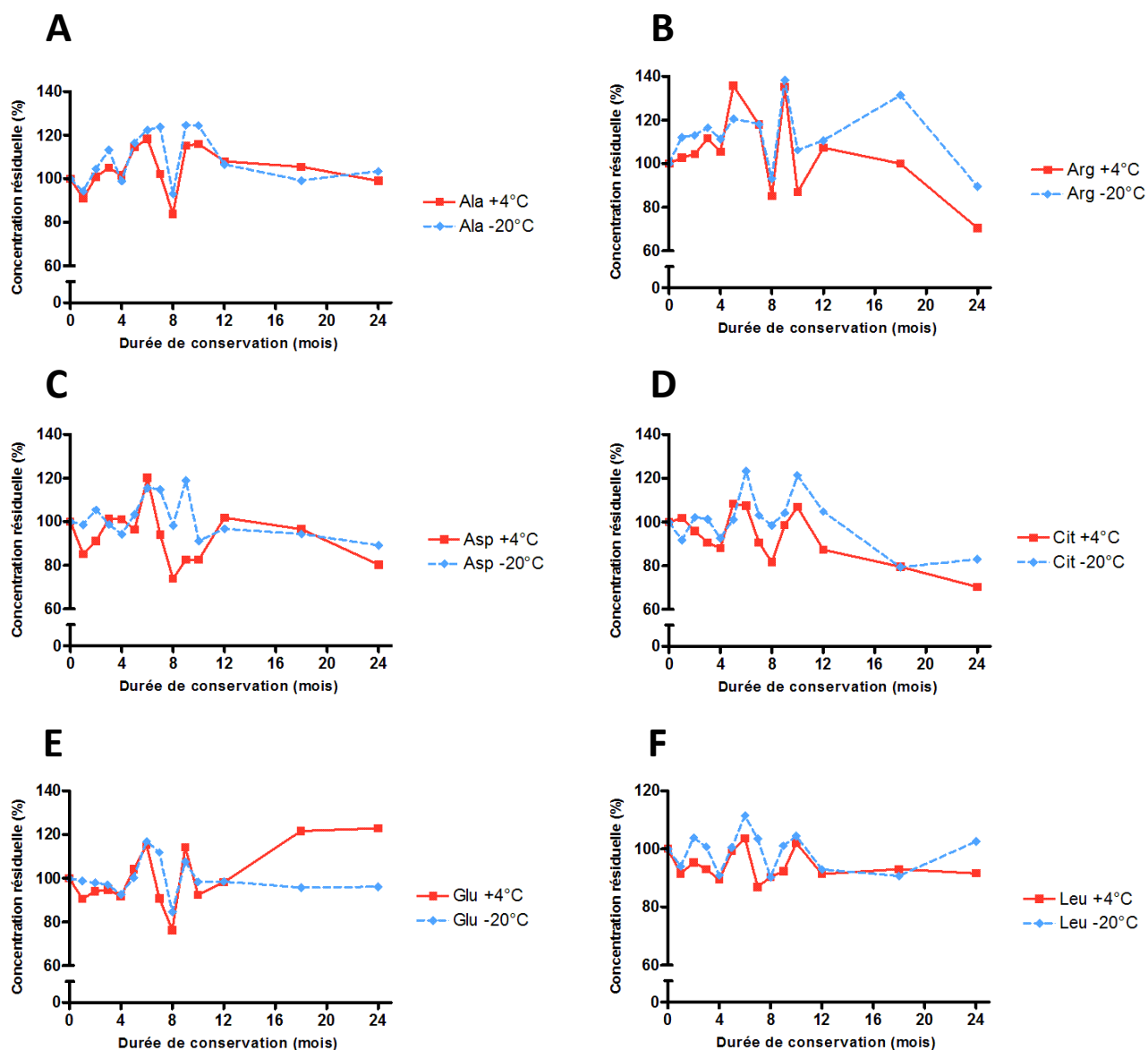


Figure 40 - Concentrations résiduelles des acides aminés alanine (A), arginine (B), acide aspartique (C), citrulline (D), acide glutamique (E) et leucine (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

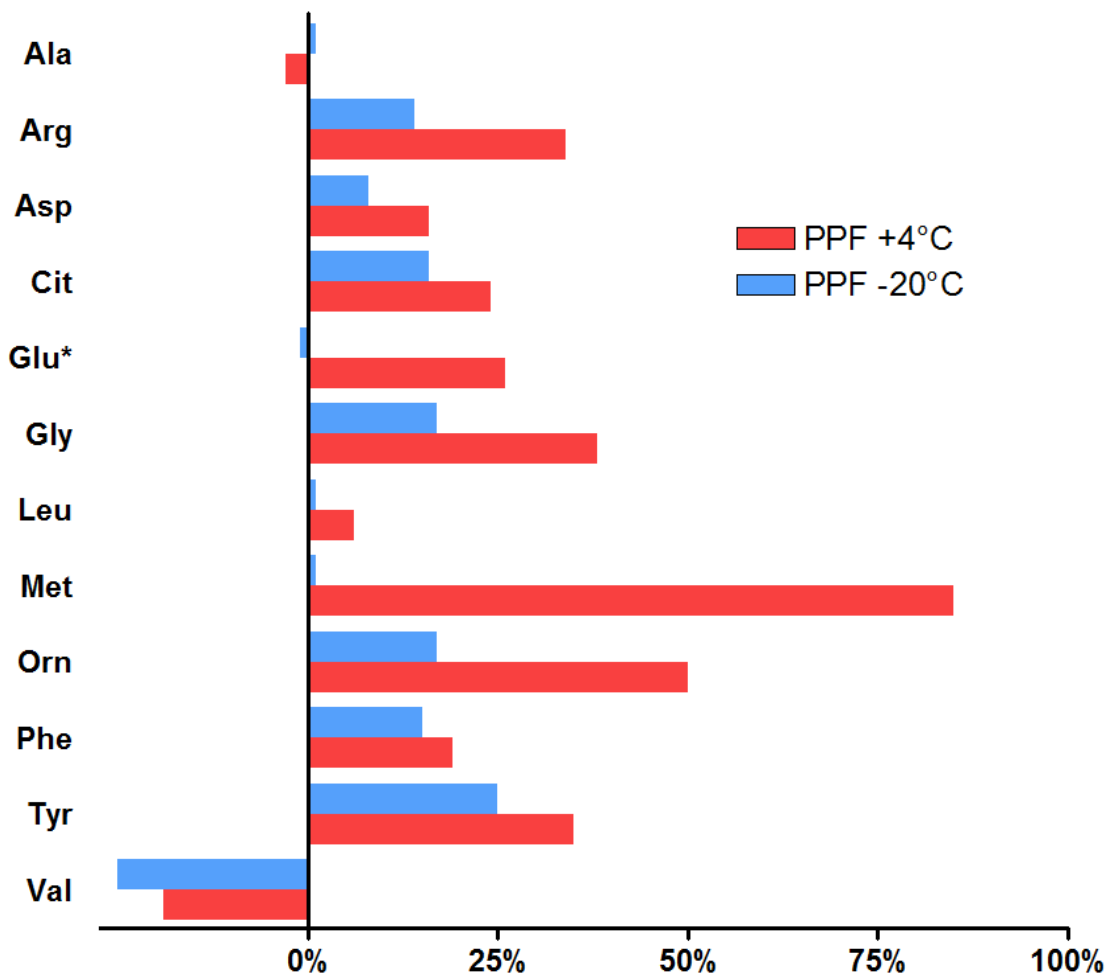


Figure 41 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des acides aminés pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C) et congelés (PPF -20°C).

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Comme observé dans les études de dégradation accélérée (1 et 2), après 24 mois de conservation des échantillons la carnitine libre et les acylcarnitines à chaîne courte en C2, C3, et C6 sont les plus instables. Leurs concentrations varient significativement uniquement à +4°C. Les pourcentages de perte finaux sont significatifs et respectivement de -40%, 66%, 44%, 26% (**Tableau 19 et Figure 45**). La conservation à -20°C semble mieux préserver ces composés puisqu'aucune perte significative n'est mise en évidence pour ces mêmes biomarqueurs. Le C5DC perd 38% (à +4°C) et 21% (à -20°C) de sa concentration initiale. Cette baisse n'est cependant pas significative, le CV% inter-essai (reproductibilité) du C5DC étant de l'ordre de 24%. (**Tableau 13**). Concernant les acylcarnitines en C5 ainsi que pour les acylcarnitines à chaîne moyenne et longue, aucune dégradation significative n'est

mise ne évidence quelque soient les conditions de conservation. De manière inattendu, seules les concentrations en C18 baissent de manière significative à +4°C comme à -20°C (**Tableau 19**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles à 24 mois sont présentées dans les **Figures 42, 43 et 44**.

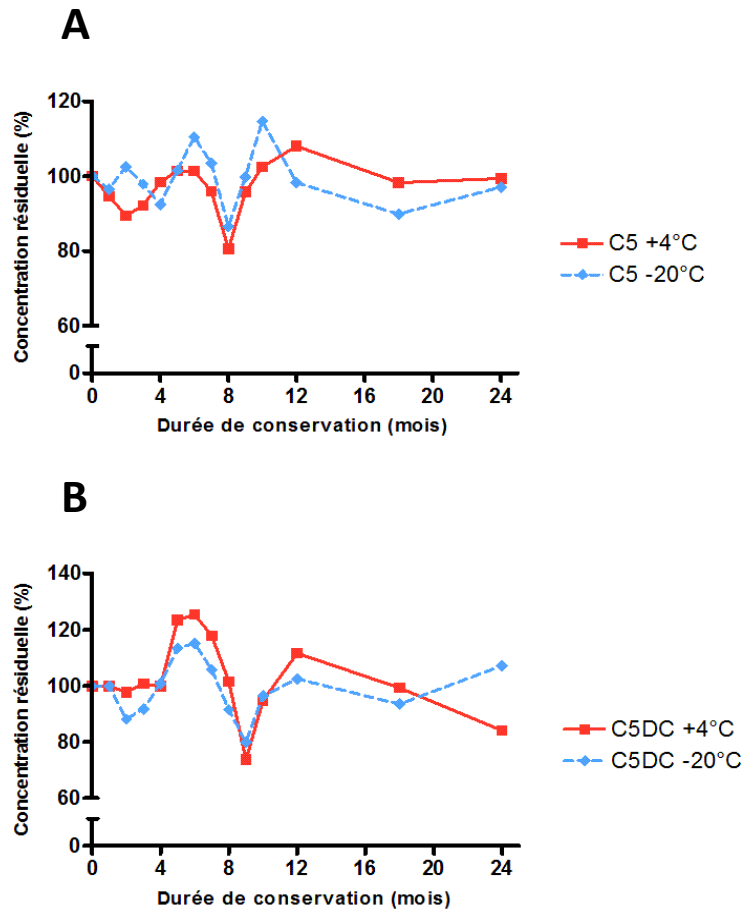


Figure 42 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines en C5 (A) et C5DC (B), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

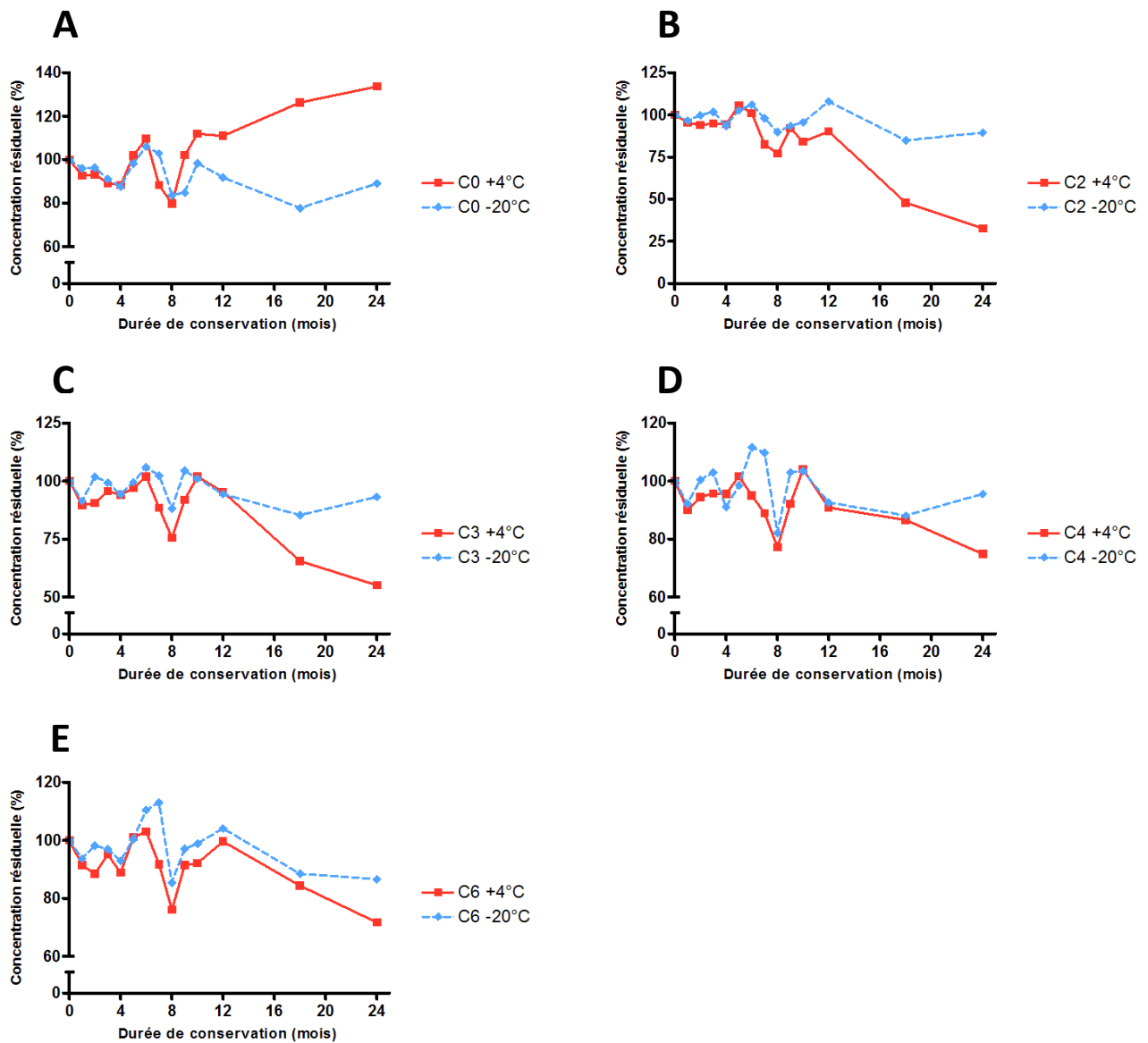


Figure 43 - Concentrations résiduelles de la carnitine libre (A) et des acylcarnitines à chaîne courte en C2 (B), C3 (C), C4 (D) et C6 (E), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

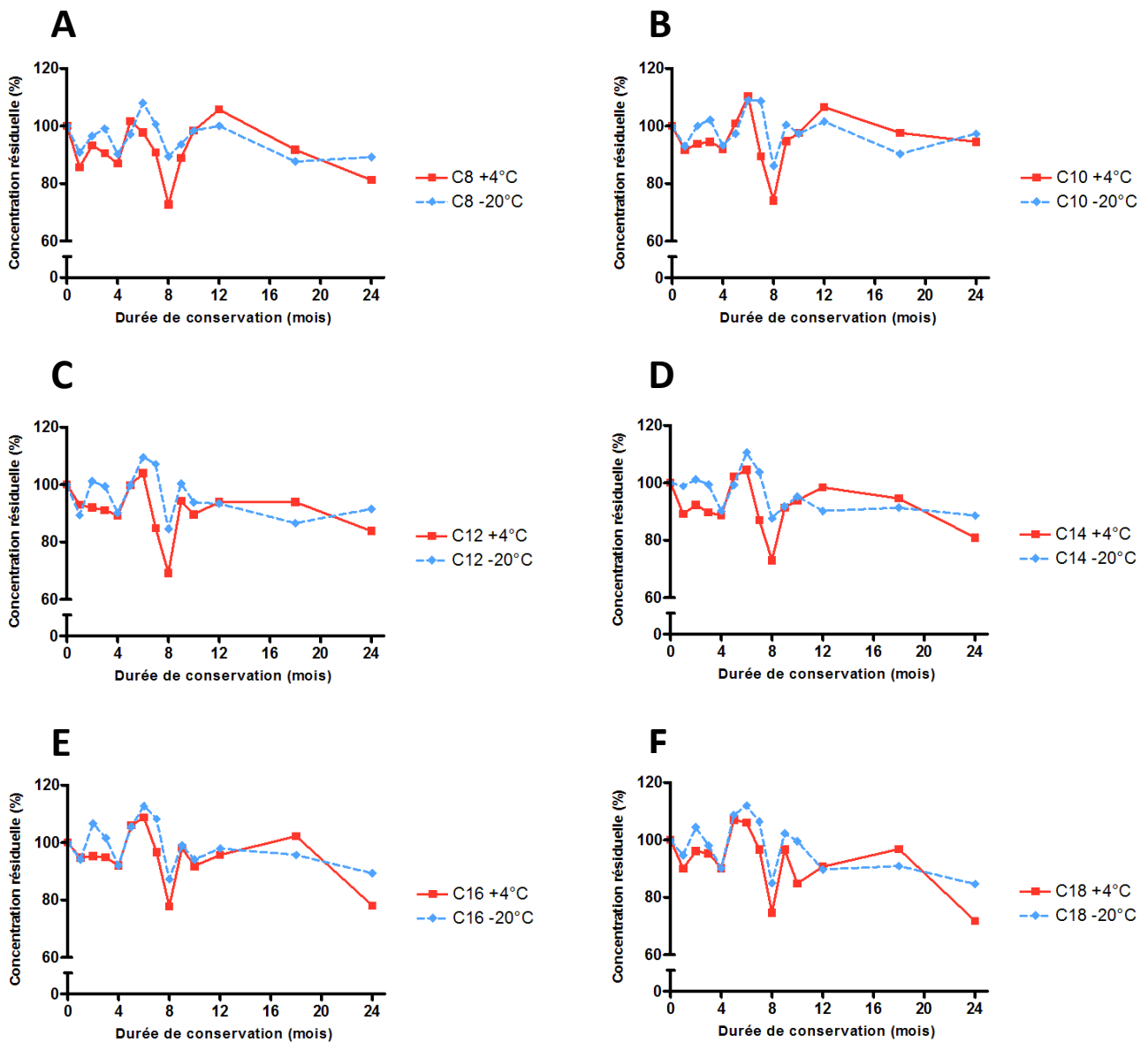


Figure 44 - Concentrations résiduelles des acylcarnitines à chaîne moyenne en C8 (A), C10 (B) et C12 (C) et des acylcarnitines à chaîne longue en C14 (D), C16 (E) et C18 (F), en fonction des conditions de conservation des échantillons au cours des 2 années de l'étude 3.

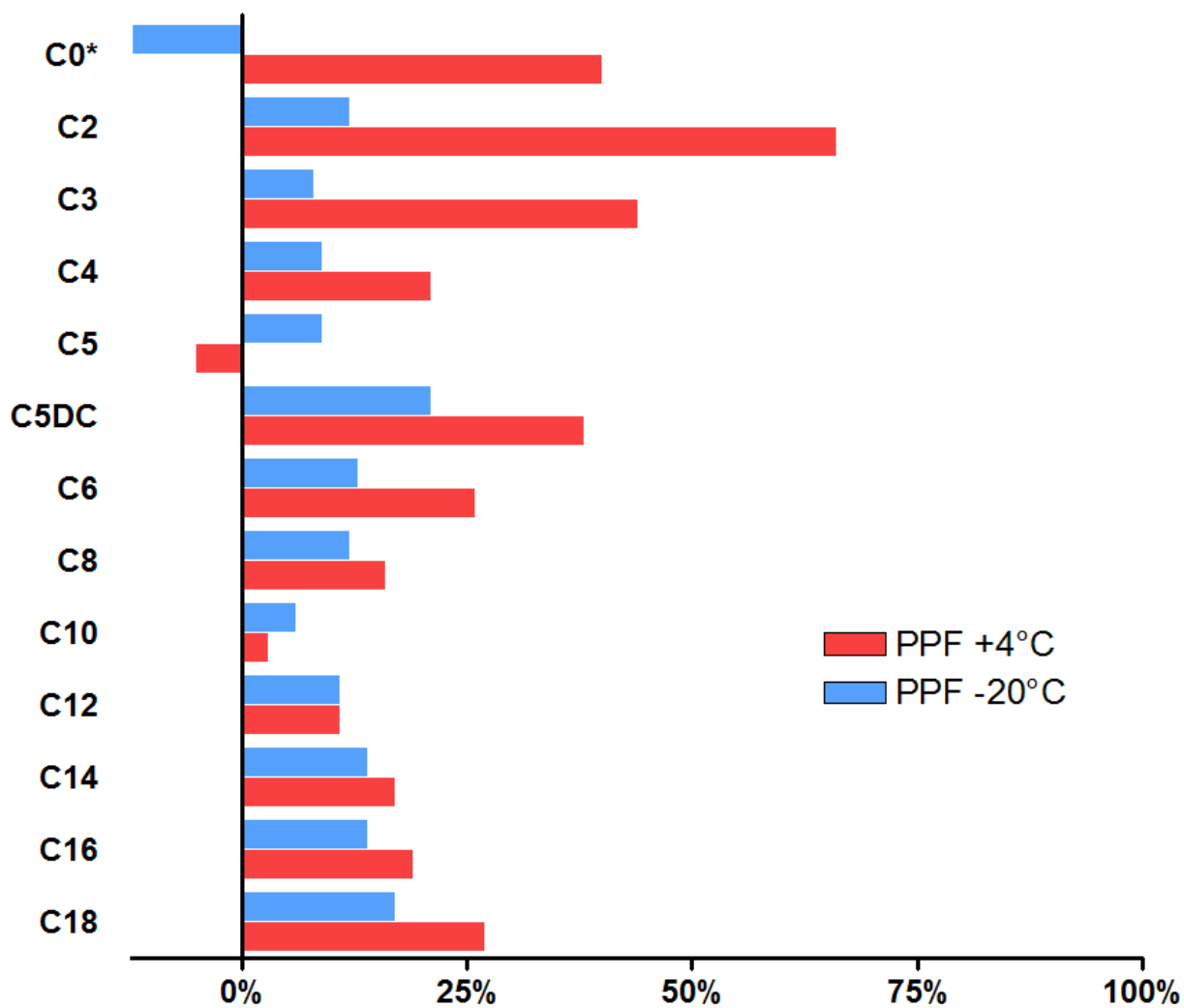


Figure 45 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des acylcarnitines pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C) et congelés (PPF -20°C).

Les composés pour lesquels la concentration augmente durant le stockage des échantillons sont marqués d'une * (leurs PPF respectifs sont représentés en valeur absolue).

Dans le groupe des biomarqueurs 17OHP/TIR/TSH, les pertes de concentration sont légèrement supérieures à celles observées à 12 mois. La TSH et la TIR présentent toutes deux des pertes de concentration significatives à +4°C et à -20°C. Les PPF de la TSH et de la TIR sont significatifs et respectivement de 29% et 26% à +4°C et de 21% et 18% à -20°C. Ces deux paramètres sont stables lorsque les échantillons sont conservés dans la capsule IMAGENE® scellée avec des PPF non significatifs de 15% et 5%. Dans ce groupe, la 17OHP est le paramètre le plus stable. Après deux ans de conservation, aucune dégradation significative n'est mise en évidence pour ce marqueur que les échantillons soient conservés à +4°C, à -20°C ou dans la capsule IMAGENE® (**Tableau 17 et Figure 45**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans la **Figure 34**.

La décroissance des taux d'hémoglobine S observée à 1 an se confirme à 24 mois de conservation. Le PPF à +4°C est de 48%. Il n'est pas significatif à -20°C. Dans la capsule IMAGENE®, le PPF de l'HbS est significatif et de l'ordre de 8% (**Tableau 17 et Figure 46**). Cependant, il reste proche du CV de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 11**). La dégradation de l'HbS s'est poursuivie uniquement pour l'échantillon conservé à +4°C. La dégradation du marqueur TREC niveau haut reste stable par rapport à celle observée à 1 an et cela pour les 3 conditions de stockage. Pour le niveau bas du marqueur TREC, les pourcentages de perte à 24 mois sont plus faibles que ceux observés à 12 mois pour les échantillons congelés et encapsulés (**Tableau 17 et Figure 46**). Les cinétiques de dégradation et concentrations résiduelles sont présentées dans les **Figures 35 et 36**.

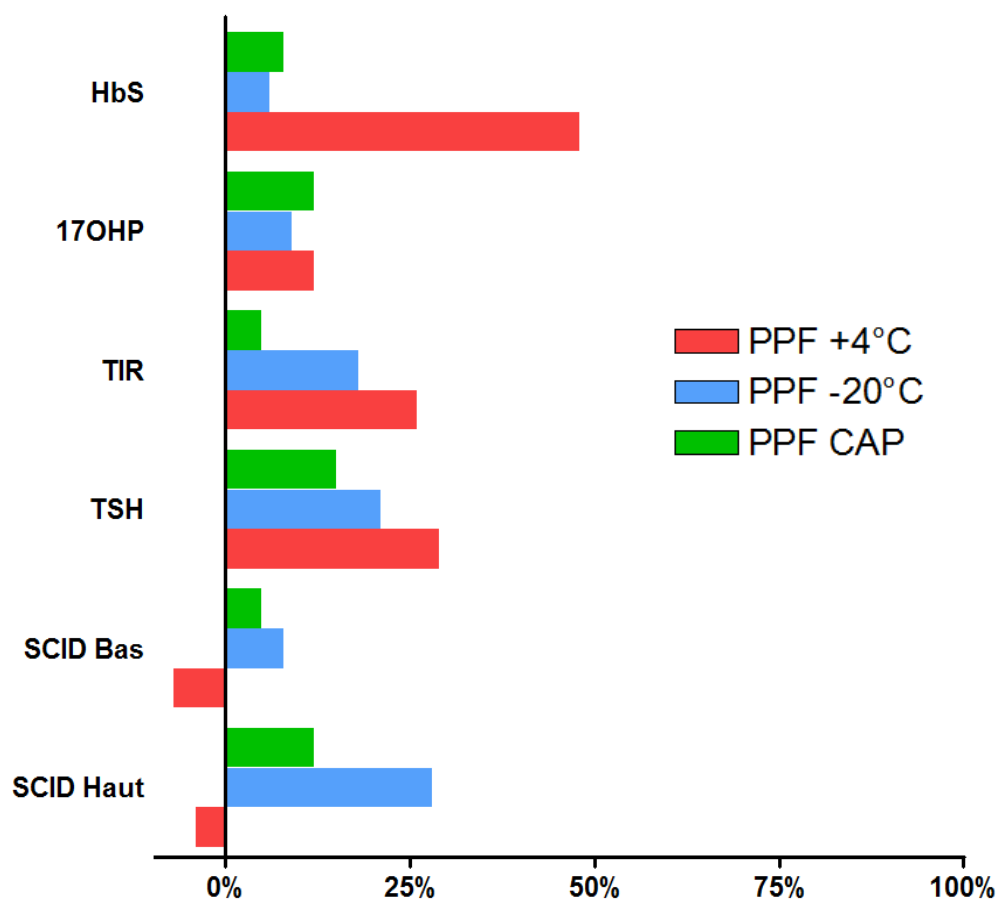


Figure 46 - Pourcentages de perte comparés à 24 mois de stockage des marqueurs HbS, 17OHP, TIR, T4T, TSH, SCID haut et SCID bas pour les échantillons conservés réfrigérés (PPF +4°C), congelés (PPF -20°C) et dans la capsule IMAGENE® à température ambiante (PPF CAP).

4 / Discussion

L'examen de biologie médicale se déroule en trois phases. La phase pré-analytique concerne le prélèvement, le recueil des renseignements cliniques, le transport et la conservation des échantillons biologiques avant le processus analytique. Ce dernier produit le résultat biologique. La phase post-analytique comprend l'étape de validation biologique dans le contexte clinique donnant lieu à un compte-rendu d'examen biologique. L'ensemble du processus prend fin avec la conservation des échantillons biologiques en post-analyse. C'est au laboratoire définir les modalités de transport et de conservation des échantillons en pré et post-analyse. De nombreux critères tels que la durée de conservation, la température de conservation et l'humidité du milieu de conservation sont critiques. Les dispositions de conservation des échantillons biologiques permettent d'assurer l'intégrité, la pérennité et l'identification formelle des échantillons biologiques de manière à garantir la fiabilité du résultat lors d'une éventuelle ré-analyse. Dans le domaine du dépistage néonatal, les conditions de conservation et d'utilisation des tâches de sang résiduelles après la réalisation des tests de dépistage sont définies par l'AFDPHE. Les prélèvements de sang déposé sur buvard doivent être conservés pendant au moins 1 an (si possible, au moins à + 4°C ou à -20°C, avec dessicant dans un contenant hermétique) [53].

Le premier objectif de l'étude Stabiospot est de déterminer par des études de dégradation accélérée la sensibilité des différents marqueurs du dépistage néonatal à l'humidité et à la température. Le second consiste à évaluer l'effet protecteur de la capsule IMAGENE® contre ces facteurs d'altération. Enfin, la vérification de la stabilité des 30 biomarqueurs dans les conditions de conservation définies par l'AFDPHE constitue le troisième objectif.

4.1 / Sensibilité des biomarqueurs à la température et l'hygrométrie

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem des acides aminés et acylcarnitines sur tâches de sang déposé sur buvard permet le dépistage et le diagnostic de nombreuses maladies héréditaires du métabolisme dont les aminoacidopathies, les aciduries organiques, les déficits de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras. En France, parmi les maladies héréditaires du métabolisme, actuellement, seule la phénylcétonurie est dépistée systématiquement à la naissance. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem et l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCADD est prévue en 2019. C'est pour cette raison que nous avons inclus le profil métabolique mixte « acylcarnitines et acides aminés » à l'étude STABIOSPOT.

L'alanine, l'acide aspartique et particulièrement la valine résistent à la chaleur et à l'humidité. Ces deux facteurs d'altération ne semblent pas influencer leur dégradation après 1 mois de conservation. Ces résultats sont en accord avec ceux de *Adam B.W. et al.* [82]. Cette équipe a montré que la valine est un acide aminé très stable. Les pourcentages de perte sont respectivement de 5.9 et 9,4 % lorsque les échantillons sont stockés pendant environ un mois à 37°C dans une atmosphère faiblement et très humide.

La citrulline, la glycine, la leucine, la phénylalanine, l'ornithine et la tyrosine sont résistants à l'humidité. Ces acides aminés présentent par contre une sensibilité variable à la chaleur. Une dégradation significative est observée lorsque les échantillons sont conservés à 37°C dans une atmosphère humide. Il est fort probable que ce soit l'effet combiné de la température et de l'humidité qui accélère la dégradation de ces acides aminés. Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de *Adam B.W et al.* Les échantillons de sang déposé sur papier buvard et conservés pendant mois à 37°C dans une atmosphère humide ont perdu 33% de leur concentration initiale en phénylalanine, 32% de leur concentration initiale en citrulline et 23 % de leur concentration en leucine. Le pourcentage de perte pour la tyrosine est en revanche deux fois plus important. L'équipe de *Golbahar J. et al.* confirme nos résultats pour certains acides aminés [76]. Dans cette étude plus courte que l'étude STABIOSPOT, les échantillons de sang déposé sur papier buvard sont conservés pendant 8 jours à 37°C dans une atmosphère humide (>70%). Les pourcentages de perte à J8 sont de 59 % pour la tyrosine, 35% pour la leucine, 47% pour la citrulline et 31.8% pour la phénylalanine. Contrairement à notre étude, le pourcentage de perte de la valine est deux fois plus important (36%).

Nous avons montré que l'arginine, la méthionine et l'acide glutamique sont des acides aminés instables et sensibles aux facteurs d'altération des échantillons de sang déposé sur buvard. Ces résultats sont proches de ceux de l'équipe de *Adam B.W et al.* qui retrouve des pourcentages de perte considérables pour l'arginine (96%) lorsque les échantillons sont stockés pendant environ un mois à 37°C dans une atmosphère faiblement et très humide. Dans les mêmes conditions de conservation, la méthionine perd 29.7% de sa concentration initiale. L'étude STABIOPSOT montre que la dégradation de la méthionine est à la fois influencée par la chaleur et par l'humidité. Les pourcentages de perte sont respectivement de 48% et de 96% lorsque les échantillons sont conservés à température ambiante dans une atmosphère humide et à 37°C dans une atmosphère humide. *Golbahar J. et al.* ont également montré la fragilité de cet acide aminé. Les pourcentages de perte sont de 59 % après 8 jours de stockage des buvards à 37°C et dans une atmosphère humide (>70%).

Contrairement aux autres acides aminés, les variations de l'acide glutamique vont dans le sens de l'augmentation. La concentration initiale de cet acide aminé a augmenté respectivement de 149% et de 67% au cours des études 1 et 2. *Han Jun et al.* confirment nos résultats [89]. Cette augmentation est expliquée par la désamination de la glutamine durant le stockage des prélèvements. Les variations de l'acide glutamique et de la glutamine évoluent en sens inverse.

Le groupe des acylcarnitines présente des profils variables de sensibilité aux facteurs d'altération des tâches de sang déposé sur buvard. Il existe un gradient de sensibilité à l'humidité et à la chaleur relatif à la longueur de la chaîne carbonée. Les acylcarnitines à chaîne courte (C2, C3, C4, C6) sont très sensibles à l'humidité. Après un mois de conservation des échantillons dans une atmosphère humide, les pourcentages de pertes sont compris entre 46% (C6) et 85% (C2). Ces derniers sont presque identiques lorsque la température de l'atmosphère est portée à 37°C. En revanche, l'isovalerylcarnitine (C5), un acylcarnitine à chaîne courte reste stable et résiste à l'humidité et à la température. Contrairement aux acylcarnitines à chaîne courte, les acylcarnitines à chaîne moyenne et longue saturées sont résistant à l'humidité. Une conservation des buvards à 37°C provoque une dégradation significative avec des pourcentages de perte compris entre 20 et 29%. Dans les études 1 et 2, les concentrations de la carnitine libre varient dans le sens d'une augmentation. Cette augmentation est secondaire à l'hydrolyse progressive des acylcarnitines à chaîne courte, moyennes puis longue. Il existe pour l'ensemble des acylcarnitines un gradient de stabilité global en fonction de la longueur des chaînes carbonées de l'acide gras. Une longue chaîne carbonée confère une meilleure stabilité lors du stockage des échantillons. L'étude de *Adam B.W et al* confirme nos résultats. Cette équipe a montré que lorsque les échantillons sont conservés à 37°C dans une atmosphère humide (70%), la dégradation des acylcarnitines est d'autant plus importante que la longueur de la chaîne carbonée est courte.

Nous avons montré que les marqueurs hormonologiques TSH et T4T sont résistants à l'effet « humidité ». Une dégradation significative de ces marqueurs est observée lorsque les échantillons sont conservés à 37°C dans une atmosphère humide. La TIR est sensible à l'humidité et à l'effet cumulé de l'humidité et la chaleur. Ces résultats sont proches de ceux de *Adam B.W et al.* En effet, les pourcentages de perte respectifs de la thyroxine, de la TSH et de la TIR sont de 86,4%, 63,7% et 53% lorsque les buvards sont conservés à 37°C et dans une atmosphère humide. La 17OHP est nettement plus stable, les pourcentages de perte finaux de l'étude 1 et 2 sont inférieurs à 15%. Les résultats de *Adam B.W et al* sont discordants et montrent une perte supérieure à 40% après un mois de stockage à 37°C dans une atmosphère humide.

L'étude STABIOSPOT montre une sensibilité majeure de l'hémoglobine S à la chaleur et à l'humidité. Les pourcentages de perte en fin d'étude 1 et 2 sont respectivement de 39 % et de 67 %. Une étude américaine publiée en 2013 confirme nos résultats. En effet, après 31 jours de stockage des buvards à 37°C et sous atmosphère humide (>90%), des pourcentages de perte proches de 100% sont observés pour les hémoglobines A et S [79]. Les pourcentages de perte observés dans cette étude sont plus importants que ceux trouvés au cours de l'étude 2. Cette différence s'explique probablement par un degré d'hygrométrie plus élevé (>90% contre seulement 75% dans notre étude).

Certains pays ont récemment rajouté le dépistage des déficits immunitaires combinés sévères ou SCID au panel des pathologies dépistées systématiquement à la naissance. En France, une étude pilote a été mise en place en 2013 pour une période de 4 ans [28]. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la stabilité du marqueur TREC sur tâche de sang. Ce dépistage tendant à se développer, nous avons choisi d'inclure ce marqueur dans l'étude STABIOSPOT.

Le biomarqueur TREC semble présenter une certaine sensibilité à l'humidité. Ses pourcentages de perte sont de 33% (niveau bas) et 20% (niveau haut) en fin de l'étude 1 (humidité + température ambiante). De façon inattendue, ces mêmes pourcentages sont seulement de 10% et 18% au terme de l'étude 2 (humidité + 37°C). Ces résultats sont difficilement interprétables en raison des grandes variations analytiques de la méthode de dosage. En effet, les coefficients de variation de répétabilité de la méthode de dosage sont de 41,5% (niveau bas) et 51% (niveau haut). Il serait donc nécessaire de tester un nombre plus élevé d'échantillons afin de déterminer au mieux la sensibilité de ce biomarqueur à la chaleur et à l'humidité.

4.2 / Stabilité des biomarqueurs à long terme et conservation des buvards

Les recommandations de l'AFDPHE sur la conservation des buvards résiduels du dépistage néonatal préconisent un stockage pour une durée minimum de 1 an, si possible à +4°C avec dessiccant et au sein d'un contenant hermétique. L'étude 3 a pour but de valider ces recommandations par la vérification de la stabilité des biomarqueurs inclus au programme de dépistage néonatal français. La comparaison des performances de conservation de la réfrigération (+4°C) et de la congélation (-20°C) des tâches de sang séchées sur buvard a été réalisée sur une période plus longue de 2 ans permettant une évaluation des capacités conservatrices de ces méthodes de stockage dans une optique de constitution de banques d'échantillons biologiques ou « biobanques » sortant du champ strict du dépistage néonatal.

Après une année de stockage des échantillons à +4°C et -20°C, seulement 6 biomarqueurs sur les 30 testés présentent une perte significative de leur concentration initiale. A +4°C, la méthionine, la TIR et l'HbS présentent une dégradation significative. A -20°C, cette dégradation n'est significative que pour la tyrosine, la TSH et les marqueurs SCID haut et bas. Aucune des acylcarnitines ne présente de dégradation significative après 1 an de conservation des buvards à +4°C et à -20°C. Ce dernier résultat est en accord avec ceux de *Fingerhut R et al.* [75]. Cette équipe a montré une complète stabilité de la carnitine libre et de l'ensemble des acylcarnitines après un stockage de 330 jours de stockage à -18°C. Une conservation des buvards à +4°C paraît donc suffisante pour assurer la stabilité de 27 des 30 biomarqueurs testés pour une durée de 1 an.

Après 2 ans de stockage des échantillons à +4°C et -20°C, la moitié des biomarqueurs testés présentent une perte significative de leur concentration initiale. A +4°C, les dégradations de la méthionine, de la TIR et de l'HbS s'accroissent. Des pertes ou gains significatifs de concentration sont également observés pour la glycine, l'ornithine, la phénylalanine, la tyrosine et la TSH. La carnitine libre, ainsi que les acylcarnitines en C2, C3, C6 et C18 présentent également une dégradation significative. Au total, 12 des 30 marqueurs se sont dégradés après 2 ans de conservation des échantillons à +4°C.

A -20°C, des pertes ou gains significatifs sont observés pour seulement 7 biomarqueurs : La phénylalanine, la tyrosine, la valine, la TSH, la TIR le SCID "niveau haut " et la stearylcarbitine (C18). Une équipe anglaise a étudié sur une période de 2 ans la dégradation de différents métabolites dosés sur tache de sang déposé sur buvard et conservés à 20°C (température ambiante), à -20°C et à -80°C [90]. Une dégradation significative est observée pour la méthionine et la glutamine après deux ans de stockage à -20°C. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de l'étude 3. Après 2 ans de conservation des buvards à -20°C, nous n'avons pas retrouvé de dégradation de la méthionine, ni une augmentation significative de la concentration de l'acide glutamique, reflet de la dégradation de la glutamine. L'équipe anglaise n'a pas utilisé de dessiccant pour limiter l'humidité lors de la conservation des échantillons ce qui peut expliquer l'instabilité de la méthionine et de la glutamine. Les résultats des études de dégradation accélérée 1 et 2 ont montré une sensibilité marquée de la méthionine et de l'acide glutamique à l'humidité du milieu de conservation. L'absence de dessiccant dans les sacs de congélation des buvards a probablement accéléré la dégradation de ces deux composés.

La valine et le marqueur SCID « niveau haut » présentent des pourcentages de perte significatifs à -20°C et non à +4°C. La concentration finale de la valine a augmenté de façon significative de 25% après 2 ans de conservation à -20°C. Bien que supérieur au coefficient de variation de reproductibilité de la méthode analytique (**Tableau 12**), cette augmentation résulte très probablement d'une variation analytique importante. Comme abordé précédemment, il est difficile de conclure sur la stabilité du biomarqueur du SCID (TREC). Des pourcentages de perte similaires entre les niveaux « haut » et « bas » du marqueur TREC étaient attendus. Le pourcentage de perte significatif de 28% du niveau « haut » n'est pas en accord avec celui de seulement 8% du niveau « bas ».

Après 2 ans de conservation des échantillons, des pertes ou gains significatifs de concentration sont observés pour 15 marqueurs à +4°C contre seulement 5 à -20°C. La valine et le marqueur SCID « niveau haut » sont exclus de ce décompte. Les limites de la conservation des buvards par réfrigération à +4°C sont visibles entre la première année et la deuxième année de stockage. La congélation permet une meilleure stabilité des biomarqueurs. Une conservation des buvards à -20°C minimum paraît donc indispensable pour assurer une stabilité maximale des marqueurs du DNN sur une période supérieure à un an.

4.3 / Performances de la capsule IMAGENE®

Le second objectif de l'étude STABIOSPOT est d'évaluer les performances de la technologie de minienapsulation d'échantillons biologiques développée par la société IMAGENE®®, pour la conservation des échantillons de sang séché sur buvard. Le but des études de dégradation accélérée 1 et 2 et de l'étude 3 de conservation à long terme est de déterminer la sensibilité des différents marqueurs vis-à-vis des facteurs d'altérations et d'évaluer les performances protectrices de la technologie IMAGENE®. La comparaison des profils de dégradation des biomarqueurs issus de prélèvements non encapsulés et encapsulés permet la mesure des performances de la technologie IMAGENE® pour la conservation des échantillons de tâches de sang déposé sur buvard.

Les performances de préservation de la capsule IMAGENE® ont déjà été évaluées pour la conservation de l'ADN [87] et plus récemment pour l'ARN [88]. Le contact avec l'atmosphère représente le facteur de risque majeur de dégradation, d'une part par la réhydratation des molécules d'acides nucléiques et d'autre part via l'action oxydative des espèces réactives de l'oxygène. En protégeant complètement les échantillons d'ADN et ARN de l'atmosphère, la minicapsule permet leur conservation à température ambiante mais également à des températures plus élevées. A notre connaissance, l'évaluation de la technologie de minienapsulation IMAGENE® pour la conservation des échantillons de sang séché sur buvard n'a jamais été réalisée.

Les résultats des études de dégradation accélérée (études 1 et 2) démontrent le pouvoir protecteur de la capsule sur les biomarqueurs étudiés. Pour une majorité de biomarqueurs, les pourcentages protecteurs IMAGENE® (PPI) calculés au terme de ces deux études sont proches voir égaux aux pourcentages de perte finaux des échantillons non encapsulés. Les pertes de concentration sont réduites de manière quasiment complète par rapport à celles des échantillons conservés en capsule ouverte. Ceci est d'autant plus visible pour les composés instables comme la carnitine libre et la méthionine qui présentent d'importants pourcentages de perte pour les échantillons non encapsulés. Au terme de l'étude 1, aucune dégradation significative n'est observée pour l'ensemble des biomarqueurs dosés à partir d'échantillons encapsulés. En fin d'étude 2, seule l'hémoglobine S présente une perte de concentration significative à la fois pour les buvards conservés en capsule ouverte et ceux stockés en capsule scellée.

Après 2 ans de conservation des échantillons à -20°C, +4°C et en capsule IMAGENE® à température ambiante, nous avons comparé les profils de dégradation des différents biomarqueurs. L'analyse des résultats met en évidence une relative équivalence des performances de conservation de la capsule IMAGENE® et de la congélation des échantillons à -20°C. A 1 an et à 2 ans de stockage, les pourcentages de perte finaux observés à -20°C et en capsule IMAGENE® à température ambiante sont proches pour un même marqueur sauf pour les marqueurs TIR, TSH et HbS. Après 1 an de stockage, la TSH présente déjà une perte de concentration significative au sein de l'échantillon congelé. La TSH est mieux conservée lorsque les échantillons sont stockés en capsule IMAGENE® scellée. Aucune dégradation significative n'est alors observée après 1 an et 2 ans de conservation. Concernant la TIR, l'effet protecteur de la capsule est bien supérieur à celui de la congélation. En effet, la TIR est significativement dégradée uniquement au sein de l'échantillon congelé après 1 et 2 ans de conservation des buvards. La capsule semble donc présenter un avantage en termes de conservation pour ces 2 composés. A l'inverse c'est la congélation qui semble apporter la meilleure condition de conservation pour l'hémoglobine S. Une dégradation significative de ce marqueur est observée à 1 et 2 ans de stockage uniquement pour les buvards stockés à +4°C et en capsule IMAGENE®. A noter que le marqueur SCID semble présenter une dégradation accélérée lorsque les buvards sont congelés mais comme discuté auparavant, l'importante variabilité analytique du dosage des TRECs rend difficile l'interprétation des résultats.

Nous avons montré que la stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâches de sang séché déposé sur papier buvard est influencée par les conditions (température et humidité) et la durée de conservation. La capsule IMAGENE® protège largement les échantillons de l'effet délétère de l'humidité et de l'effet combiné de l'humidité et de la chaleur. Sur le long terme, aucune différence de conservation significative n'est observée entre le stockage en minicapsule IMAGENE® à température ambiante et la congélation des buvards à -20°C en sachets zippés, pour la large majorité des marqueurs biologiques étudiés.

5 / Conclusion et perspectives

Le stockage des tâches de sang résiduelles après le dépistage néonatal ne présente un intérêt que dans le cas où la conservation des échantillons permet d'assurer la stabilité de leur contenu moléculaire et protéique et par conséquent la stabilité des biomarqueurs du dépistage néonatal. L'utilisation des tâches de sang résiduelles est possible pour vérifier le résultat initial du dépistage ou exceptionnellement et dans un cadre très restreint pour le diagnostic d'autres pathologies sur prescription médicale associée au consentement des parents. Définir la sensibilité des biomarqueurs du dépistage néonatal aux principaux facteurs d'altération des tâches de sang déposé sur buvard tels que l'humidité et la chaleur est indispensable afin de garantir la qualité des résultats dans le cas où les tâches de sang résiduelles sont réutilisées. Les études de dégradation accélérées ont montré une sensibilité variable des différents biomarqueurs à l'humidité et à la température. Le transport des buvards étant exempté par la réglementation ADR, accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par la route, le prélèvement est acheminé par voie postale. Des conditions climatiques défavorables pourraient donc influencer la qualité du prélèvement. Il peut arriver dans certaines zones géographiques que les buvards soient exposés à des températures dépassant largement les 37°C ou bien des atmosphères très humides. Les conditions de conservations mais également de transport des échantillons doivent donc minimiser la température et le taux d'humidité.

Les conditions de conservation et d'utilisation des tâches de sang résiduelles après la réalisation des tests de dépistage sont définies par l'AFDPHE. Les prélèvements de sang déposé sur buvard doivent être conservés pendant au moins 1 an (si possible, au moins à + 4°C ou à -20°C, avec dessicant dans un contenant hermétique). Les résultats de l'étude STABIOSPOT valident les recommandations AFDPHE concernant le stockage des buvards résiduels du DNN. Si la durée de conservation n'excède pas 1 an, un stockage des échantillons à +4°C permet d'assurer la stabilité de l'ensemble des biomarqueurs excepté pour l'hémoglobine S.

L'espace de stockage étant limité dans notre laboratoire, les prélèvements de sang déposé sur buvard sont conservés pendant 2 ans (espace de stockage actuel) à + 4°C dans un contenant hermétique avec dessicant. Dans le cadre des morts subites du nourrisson, l'utilisation du buvard de naissance pour l'analyse des acylcarnitines est intéressante et peut permettre d'orienter le diagnostic vers une cause métabolique du décès. Dans ce cas par exemple, afin d'assurer une meilleure qualité des résultats, il serait souhaitable de conserver les échantillons à -20°C. La congélation des échantillons

à -20°C paraît également indispensable si l'on envisage de constituer une biobanque avec ces échantillons.

La capsule IMAGENE® est un dispositif de conservation très performant. Il est possible d'envisager l'application de cette technologie au stockage des tâches de sang résiduelles après la réalisation du dépistage néonatal. Cette technologie innovante IMAGENE® a déjà fait ses preuves pour la conservation de l'ADN. La conservation des biomarqueurs dans la capsule IMAGENE® et à -20°C est presque équivalente. Un des avantages majeurs du procédé IMAGENE® réside dans la possibilité d'un stockage des prélèvements à température ambiante, réduisant ainsi le coût énergétique et écologique tout en assurant une protection vis-à-vis de potentiels accidents de congélation ou réfrigération (coupures de courant, pannes...). L'absence de congélation et la conservation en minicapsule permettent également à la fois un gain d'espace important pour le stockage des prélèvements et la conservation de l'intégrité des échantillons biologiques de manière à garantir la fiabilité du résultat lors d'une éventuelle ré-analyse. De plus, chaque capsule étant marquée d'un code-barres, la traçabilité des échantillons, paramètre clé du système qualité mis en place au sein des laboratoires, est également assurée. La technologie IMAGENE® offrant plusieurs avantages pour le stockage des tâches de sang résiduelles, il est important de déterminer si l'investissement initial nécessaire à sa mise en place peut être rentable et dans quels délais. La réalisation d'une étude médico-économique serait nécessaire pour répondre à cette question.

Avec l'élargissement croissant des panels de maladies dépistées sur tâches de sang, il nous paraît intéressant d'étudier la stabilité d'autres biomarqueurs. Le dosage de l'activité de la GALT (pour de dépistage de la galactosémie congénitale), ou les activités des enzymes impliquées dans les pathologies héréditaire lysosomales (Fabry, Pompe, Gaucher...) pourraient par exemple être inclus dans le futur.

Les échantillons utilisés dans l'étude STABIOSPOT sont majoritairement des tâches de sang « contrôle de qualité interne » fournis par la société Perkin Elmer. Dans le but de définir la sensibilité des différents marqueurs du dépistage néonatal aux facteurs d'altération, il aurait été plus logique d'utiliser des prélèvements de nouveau-nés et ceci afin d'être dans les mêmes conditions que pour des échantillons de patients. Le choix d'utiliser des tâches de sang contrôles de qualité présentait plusieurs avantages non négligeables permettant notamment la mise en œuvre rapide de l'étude (absence de consentement, disponibilité immédiate des échantillons). L'obtention d'un nombre suffisant de buvards de nouveau-nés malades aurait nécessité plus de temps, au risque de voir débiter la dégradation des premiers prélèvements avant le début de l'étude. Nous avons utilisé des contrôles

de qualité internes de niveau élevé pour l'ensemble des biomarqueurs étudiés, avec des concentrations bien supérieures aux seuils d'alerte du dépistage. Il nous paraissait important d'évaluer la dégradation d'échantillons pathologiques, représentant à la fois des prélèvements susceptibles d'être contrôlés à distance et pouvant être éventuellement conservés à des fins de recherche. Les coefficients de variation analytique de répétabilité et de reproductibilité d'une technique sont plus faibles pour des concentrations élevées du composé à doser. Cela rend l'interprétation de l'effet de la température et de l'humidité sur les variations de concentration des marqueurs du dépistage néonatal plus facile. Il serait intéressant de compléter les résultats de l'étude STABIOSPOT par une seconde étude incluant cette fois-ci un nombre plus important d'échantillons, obtenus à partir de prélèvements de nouveau-nés.

L'étude multicentrique STABIOSPOT, menée en partenariat avec l'AFDPHE et la société IMAGENE®, a donc rempli ses 3 objectifs initiaux. Nous avons déterminé la sensibilité des différents marqueurs du dépistage néonatal sur tache de sang séché, aux facteurs d'altération : l'humidité et la température. Nous avons montré les performances protectrices de la technologie IMAGENE® et enfin validé les recommandations AFDPHE sur la conservation des buvards résiduels du dépistage néonatal.

Bibliographie

1. **Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM.** Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet (London, England)* 1953; **265**: 812–813.
2. **Guthrie R, Susi A.** A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics* 1963; **32**: 338–343.
3. **Wilson JMG, Jungner G, Organization WH.** Principes et pratique du dépistage des maladies. 1970; Published online: 1970.
4. **Farriaux J-P.** Trente-cinq ans de dépistage néonatal en France. Bilan et Perspectives. *Progrès en Pédiatrie sociale ou l'enfant dans son environnement.* 2004; Published online: 2004.
5. **Rhead WJ, Irons M.** The call from the newborn screening laboratory: frustration in the afternoon. *Pediatric Clinics of North America* 2004; **51**: 803–818, xii.
6. **Knoppers B, Laberge C.** *The ten principles of neonatal screening. Conférence de consensus nord-américaine de la Sapinière (Québec).* Excerpta Medica, 1989.
7. **Legifrance.** Arrêté du 23 avril 2012 relatif à l'organisation du dépistage de la surdité permanente néonatale. 2012.
8. **Dhondt J-L, Association française pour dépistage et prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE).** [Heel lance versus venepuncture in blood sampling for newborn screening]. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pédiatrie* 2010; **17**: 1394–1397.
9. **Steinmann B.** Directives pour le prélèvement du test de Guthrie. *Paediatrica* 2005; Published online: 2005.
10. **United Nations Economic Commission for Europe.** *European Agreement concerning the international Carriage of Dangerous Goods by Road.* (<https://www.unece.org/trans/danger/publi/adr/adr2017/17contentse0.html>). Accessed 13 May 2018.
11. **McCaman MW, Robins E.** Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1962; **59**: 885–890.
12. **Gerasimova NS, Steklova IV, Tuuminen T.** Fluorometric method for phenylalanine microplate assay adapted for phenylketonuria screening. *Clinical Chemistry* 1989; **35**: 2112–2115.
13. **Hachani J, et al.** MALDI-TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: matching throughput to objectives. *Proteomics. Clinical Applications* 2011; **5**: 405–414.
14. **AFDPHE.** *Bilan d'activité 2016.* (http://www.afdphe.org/ressources/documents_officiels--97). 2016.
15. **Legifrance.** Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale.
16. **Haute Autorité de Santé.** *Recommandations pour l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD.* 2011.
17. **Horvath GA, et al.** Newborn screening for MCAD deficiency: Experience of the first three years in British Columbia, Canada. *Can J Public Health* 2008; **99**: 276–80.
18. **Hsu H-W, et al.** Spectrum of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by newborn screening. *Pediatrics* 2008; **121**: e1108-1114.
19. **Wilcken B, et al.** Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. *The Lancet* 2007; **369**: 37–42.

20. **Hamers FF, Rumeau-Pichon C.** Cost-effectiveness analysis of universal newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in France. *BMC pediatrics* 2012; **12**: 60.
21. **Feillet F, et al.** [Medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase (MCAD) deficiency: French consensus for neonatal screening, diagnosis, and management]. *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie* 2012; **19**: 184–193.
22. **Haute Autorité de Santé.** *Evaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par spectrométrie de masse en tandem : 2ème volet - Feuille de route.* 2013.
23. **Van der Spek J, et al.** TREC Based Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Disease: A Systematic Review. *Journal of Clinical Immunology* 2015; **35**: 416–430.
24. **Kelly BT, et al.** Screening for severe combined immunodeficiency in neonates. *Clinical Epidemiology* 2013; **5**: 363–369.
25. **McGhee SA, et al.** Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 2005; **86**: 427–430.
26. **Adams SP, et al.** Screening of Neonatal UK Dried Blood Spots Using a Duplex TREC Screening Assay. *Journal of Clinical Immunology* 2014; **34**: 323–330.
27. **Puck JM.** Neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *Current Opinion in Pediatrics* 2011; **23**: 667–673.
28. **Thomas C, et al.** [Neonatal screening for severe combined immunodeficiency: the DEPISTREC study]. *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie* 2015; **22**: 73–74.
29. **Castellani C, et al.** European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2009; **8**: 153–173.
30. **Mayell SJ, et al.** A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2009; **8**: 71–78.
31. **Léger J, et al.** European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014; **99**: 363–384.
32. **Etats-Unis.** *Text of S. 1858 (110th): Newborn Screening Saves Lives Act of 2007 (Passed Congress version).*
33. **Health Resource and Service Administration.** *Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children.* (<https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/index.html>). Accessed 13 November 2017.
34. **American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group.** Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics* 2006; **117**: S296-307.
35. **Therrell B, Wilcken B, Naruse H.** History of the International Society for Neonatal Screening. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2003; **34 Suppl 3**: 3–5.
36. **Rousseau F, et al.** Newborn Screening By Tandem Mass Spectrometry: Impacts, Implications and Perspectives. 2012; Published online: 2012.doi:10.5772/33118.
37. **Yoon H-R.** Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 2015; **20**: 119–124.
38. **Therrell BL, et al.** Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Seminars in Perinatology* 2015; **39**: 171–187.

39. **Abdel-Hamid M, et al.** Development, validation and application of tandem mass spectrometry for screening of inborn metabolic disorders in Kuwaiti infants. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 2007; **16**: 215–221.
40. **Al Riyami S, et al.** Detection of Inborn Errors of Metabolism using Tandem Mass Spectrometry among High-risk Omani Patients. *Oman Medical Journal* 2012; **27**: 482–485.
41. **Burlina AB, et al.** Newborn screening for lysosomal storage disorders by tandem mass spectrometry in North East Italy. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2017; Published online: 15 November 2017.doi:10.1007/s10545-017-0098-3.
42. **Li Y, et al.** Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clinical Chemistry* 2004; **50**: 1785–1796.
43. **Auray-Blais C, Maranda B, Lavoie P.** High-throughput tandem mass spectrometry multiplex analysis for newborn urinary screening of creatine synthesis and transport disorders, Triple H syndrome and OTC deficiency. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2014; **436**: 249–255.
44. **Y Al-Dirbashi O, et al.** Tandem Mass Spectrometric Determination of Purine Metabolites and Adenosine Deaminase Activity for Newborn Screening of ADA-SCID. *LymphoSign Journal* 2015; : 150310143338006.
45. **Poulsen JB, et al.** High-Quality Exome Sequencing of Whole-Genome Amplified Neonatal Dried Blood Spot DNA. *PLoS ONE* 2016; **11**Published online: 18 April 2016.doi:10.1371/journal.pone.0153253.
46. **Chaiyasap P, et al.** Massive parallel sequencing as a new diagnostic approach for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficiency in Thailand. *BMC medical genetics* 2017; **18**: 102.
47. **Qian J, et al.** Applying targeted next generation sequencing to dried blood spot specimens from suspicious cases identified by tandem mass spectrometry-based newborn screening. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM* 2017; **30**: 979–988.
48. **Andraz S, et al.** Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening programme. *Clinical Biochemistry* 2017; Published online: 27 October 2017.doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.10.016.
49. **Baker MW, et al.** Improving newborn screening for cystic fibrosis using next-generation sequencing technology: a technical feasibility study. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 2016; **18**: 231–238.
50. **Lucarelli M, et al.** A New Targeted CFTR Mutation Panel Based on Next-Generation Sequencing Technology. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 2017; **19**: 788–800.
51. **Seleman M, et al.** Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology* 2017; **8**: 847.
52. **Scriver CR.** *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 2001.
53. **AFDPHE.** *Recommandations de l'AFDPHE pour la conservation du Guthrie de naissance.* (http://www.afdphe.org/ressources/documents_officiels--97). 2013.
54. **Boles RG, et al.** Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. *The Journal of Pediatrics* 1998; **132**: 924–933.
55. **Ziadeh R, et al.** Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. *Pediatric Research* 1995; **37**: 675–678.
56. **Howat AJ, et al.** Deficiency of medium chain fatty acylcoenzyme A dehydrogenase presenting as the sudden infant death syndrome. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 1984; **288**: 976.

57. **Harpey JP, Charpentier C, Paturneau-Jouas M.** Sudden infant death syndrome and inherited disorders of fatty acid beta-oxidation. *Biology of the Neonate* 1990; **58 Suppl 1**: 70–80.
58. **Rinaldo P, et al.** Sudden and unexpected neonatal death: a protocol for the postmortem diagnosis of fatty acid oxidation disorders. *Seminars in Perinatology* 1999; **23**: 204–210.
59. **Parker SP, Cubitt WD.** The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathology* 1999; **52**: 633–639.
60. **Lewensohn-Fuchs I, et al.** Detection of herpes simplex virus DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2003; **26**: 39–48.
61. **Parker SP, et al.** Use of dried blood spots for the detection and confirmation of HTLV-I specific antibodies for epidemiological purposes. *Journal of Clinical Pathology* 1995; **48**: 904–907.
62. **Barnette P, et al.** High-throughput detection of glutathione s-transferase polymorphic alleles in a pediatric cancer population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004; **13**: 304–313.
63. **van Dijk SJ, et al.** DNA methylation in blood from neonatal screening cards and the association with BMI and insulin sensitivity in early childhood. *International Journal of Obesity (2005)* 2017; Published online: 25 September 2017.doi:10.1038/ijo.2017.228.
64. **Human Genetics Society of Australasia (HGSA).** *Pre-symptomatic and Predictive Testing for Children and Young Adults*. 2014.
65. **Paediatrics & Child Health.** Guidelines for genetic testing of healthy children. 2003; **8**: 42–52.
66. **Borry P, et al.** Genetic testing in asymptomatic minors: background considerations towards ESHG Recommendations. *European journal of human genetics: EJHG* 2009; **17**: 711–719.
67. **International Society for Neonatal Screening, ISNS.** *General Guidelines for Neonatal Screening*. 2002.
68. **Comité consultatif de Bioéthique de Belgique.** *Avis N°25 du 17 novembre 2003 relatif à la durée de conservation des fiches de sang et la confidentialité des données concernant le dépistage des anomalies congénitales métaboliques*. 2003.
69. **UK Newborn Screening Programme Centre.** *Proposed standards and policies for newborn blood spot screening – an integrated consultation*. 2004.
70. **Human Genetics Society of Australasia (HGSA).** *Retention, Storage and Use of Sample Cards from Newborn Screening Programs*. 2004.
71. **Pediatrics.** Serving the family from birth to the medical home. Newborn screening: a blueprint for the future - a call for a national agenda on state newborn screening programs. 2000; **106**: 389–422.
72. **Therrell BL, et al.** Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochemical and Molecular Medicine* 1996; **57**: 116–124.
73. **Holub M, et al.** Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2006; **373**: 27–31.
74. **Waite KV, Maberly GF, Eastman CJ.** Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. *Clinical Chemistry* 1987; **33**: 853–855.

75. **Fingerhut R, et al.** Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Analytical Chemistry* 2009; **81**: 3571–3575.
76. **Golbahar J, Altayab DD, Carreon E.** Short-term stability of amino acids and acylcarnitines in the dried blood spots used to screen newborns for metabolic disorders. *Journal of Medical Screening* 2014; **21**: 5–9.
77. **Strnadová KA, et al.** Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clinical Chemistry* 2007; **53**: 717–722.
78. **Chace DH, et al.** Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. *Clinical Chemistry* 1999; **45**: 1269–1277.
79. **Adam BW, Chafin DL, De Jesús VR.** Stabilities of hemoglobins A and S in dried blood spots stored under controlled conditions. *Clinical Biochemistry* 2013; **46**: 1089–1092.
80. **Breier AC, et al.** Alpha-l-iduronidase and arylsulfatase B in dried blood spots on filter paper: Biochemical parameters and time stability. *Clinical Biochemistry* 2017; **50**: 431–435.
81. **Freer DE.** Observations on Heat/Humidity Denaturation of Enzymes in Filter-Paper Blood Spots from Newborns. *Clinical Chemistry* 2005; **51**: 1060–1062.
82. **Adam BW, et al.** The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clinical Biochemistry* 2011; **44**: 1445–1450.
83. **Flores SR, Hall EM, De Jesús VR.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme stability in filter paper dried blood spots. *Clinical Biochemistry* 2017; **50**: 878–881.
84. **Schauer AP, et al.** Validation of an LC-MS/MS assay to simultaneously monitor the intracellular active metabolites of tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in dried blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017; **149**: 40–45.
85. **Kahraman M, et al.** Technical Stability and Biological Variability in MicroRNAs from Dried Blood Spots: A Lung Cancer Therapy-Monitoring Showcase. *Clinical Chemistry* 2017; **63**: 1476–1488.
86. **Björkesten J, et al.** Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2017; **16**: 1286–1296.
87. **Colotte M, et al.** Adverse effect of air exposure on the stability of DNA stored at room temperature. *Biopreservation and Biobanking* 2011; **9**: 47–50.
88. **Fabre A-L, et al.** An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European Journal of Human Genetics* 2014; **22**: 379–385.
89. **Han J, et al.** Short-Term Stabilities of 21 Amino Acids in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* 2018; **64**: 400–402.
90. **Prentice P, et al.** Stability of metabolites in dried blood spots stored at different temperatures over a 2-year period. *Bioanalysis* 2013; **5**: 1507–1514.

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.

Stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur buvard

En France, cinq maladies sont dépistées systématiquement à la naissance : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la mucoviscidose et la drépanocytose (population à risque). Depuis juin 2011, la haute autorité de santé recommande l'extension du dépistage néonatal au déficit en déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCADD). L'AFDPHE recommande la conservation des tâches de sang résiduelles à + 4°C pour une durée minimale de 1 an. Elles constituent une source d'échantillons biologiques permettant de reconformer les résultats initiaux du dépistage néonatal, des investigations post-mortem et des études épidémiologiques. La société IMAGENE® a breveté un procédé industriel innovant d'encapsulation de matériel biologique pour une conservation à température ambiante. Ce procédé est basé sur le confinement des échantillons, préalablement desséchés, sous une atmosphère anoxique et anhydre dans des minicapsules métalliques. L'étude Stabiospot a été conçue avec 3 grands objectifs : Évaluer les profils de sensibilité et de stabilité au sein des buvards des marqueurs biologiques du dépistage néonatal vis-à-vis de la chaleur et de l'humidité ; Valider les recommandations AFDPHE pour la conservation des buvards résiduels ; Déterminer les performances de la technologie IMAGENE® pour la conservation des buvards. Un total de 30 marqueurs biologiques [Acides aminés, carnitine libre, acylcarnitines, T4, TSH, 17-OH-progestérone (17OHP), trypsine immunoréactive (TIR), hémoglobine S (HbS) et TREC (SCID)] ont été testés. Nous avons mené 2 études de dégradation accélérée ainsi qu'une troisième étude de conservation à long terme. Une importante hétérogénéité des profils de sensibilité des différents biomarqueurs vis-à-vis de la chaleur et de l'humidité a pu être mise en évidence au terme des 2 études de dégradation accélérée. La méthionine, la carnitine libre ainsi que l'HbS constituent les biomarqueurs les plus labiles. Un faible taux d'humidité et une température basse sont donc indispensables à la bonne conservation des buvards. Les résultats de l'étude 3 nous permettent de valider les recommandations AFDPHE concernant le stockage des buvards résiduels du DNN. Si la durée de conservation n'excède pas 1 an, un stockage des échantillons à +4°C permet d'assurer la bonne stabilité de l'ensemble des biomarqueurs excepté l'hémoglobine S. Enfin, la technologie d'encapsulation IMAGENE® offre de très bonnes performances, équivalentes à celles de la congélation à -20°C, pour la conservation des buvards. Le faible coût énergétique du stockage, son volume réduit ainsi que la traçabilité des échantillons possible grâce à la capsule en font une alternative innovante à la congélation pour la conservation des tâches de sang résiduelles, en particulier pour la constitution de banques d'échantillons biologiques.

Mots clés : Dépistage néonatal, conservation des échantillons biologiques, tâche de sang séché sur buvard, STABIOSPOT

Stability of newborn screening markers in dried-blood spot

In France, 5 diseases are subject to newborn screening using biological tests on dried blood spots (DBS): phenylketonuria, congenital hypothyroidism, congenital adrenal hyperplasia, cystic fibrosis and sickle cell disease. Since June 2011, the French National Authority for Health (HAS) recommends the expansion of the newborn screening program to Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD). Since 2013, AFDPHE recommends to store Residual DBS (RBS) at +4°C and at least one year after the newborn screening has been completed. RBS constitute an important resource for DNA testing, post mortem investigations, validation of new analytical methods and for epidemiological studies. IMAGENE®, an innovative biotechnology company has developed a new and unique storage technology which preserves biological samples at room temperature (RT) in a stainless-steel microcapsule sealed hermetically. Stabiospot study is designed with 3 major goals: To assess neonatal screening biomarkers patterns of sensibility to heat and humidity; Validate AFDPHE recommendations for DBS storage; Evaluate IMAGENE® capsule performances for DBS conservation. The study includes 30 biological markers (carnitine (CO), acylcarnitines, amino acids, SCID (T-cell receptor excision circle (TREC), hemoglobin S, immunoreactive trypsinogen (IRT), thyroxine (T4), thyroid-stimulating hormone (TSH), 17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP). We performed two accelerated degradation studies and a long-term conservation study. The 30 biomarkers present different patterns of sensitivity to heat and humidity. Methionine, free carnitine and HbS are the most labile compounds. Data indicated that DBS sample should be transported and stored in low humidity and low temperature conditions. Study 3 results validate AFDPHE recommendations for RBS storage. If conservation period does not exceed one year, a storage at +4°C ensure a good biomarkers stability, except for HbS. Finally, IMAGENE®'s minicapsule present very good performances for DBS conservation, equivalent to those of freezing (-20°C). Thanks to a low energy consuming storage, a reduced storage volume and a good trackability of samples, IMAGENE®'s capsule offers an innovative solution for RBS conservation, particularly for long-term sample storage and constitution of biobanks.

Keywords : Neonatal screening, dried blood spots, biological sample storage, STABIOSPOT

Laboratoire de Biochimie, secteur maladies héréditaires du métabolisme, dépistage néonatal et nutrition

CHU de Bordeaux, site Pellegrin

Place Amélie Raba Léon, 33000 Bordeaux