



HAL
open science

Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem : développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme

Laetitia Lvannoolen@chu-Grenoble.Fr van Noolen

► To cite this version:

Laetitia Lvannoolen@chu-Grenoble.Fr van Noolen. Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem : développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00640975

HAL Id: dumas-00640975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00640975>

Submitted on 14 Nov 2011

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2011

**Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques
par spectrométrie de masse en tandem :**

Développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies
héréditaires du métabolisme

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Travail effectué au sein du Laboratoire des Maladies Héréditaires du Métabolisme
Unité de Biochimie Génétique et Moléculaire (Pr J.Lunardi)
Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (Pr P.Faure)
Sous la direction de Madame le Docteur C.Corne

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

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Laetitia VAN NOOLEN

Née le 24 Mars 1982 à Lyon 8^{ème} (69)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE GRENOBLE

Le 18 Octobre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Monsieur le Professeur Patrice FAURE

Membres :

Madame le Docteur Christelle CORNE

Madame le Docteur Véronique DUCROS

Monsieur le Professeur Joël LUNARDI

Madame le Docteur Christine VIANEY-SABAN

Madame le Docteur Isabelle WROBLEWSKI

Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**
Vice - doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC IMAG)
BOUMENDEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC, IMAG, PU PH)
CORNET	Muriel	Parasitologie-Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU, PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2, PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH)
PEYRIN	Eric	Chimie analytique (D.P.M)
SEVE	Michel	Biochimie-Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne –Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie clinique (ThEMAS TIMC-IMAG, MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire, Biochimie (L.C.I.B-LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I, MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX -FAURE	Marie	Physiologie Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC, IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Médicale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie-Mycologie Médicale (GIN, MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maitre de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ATER (n=5)

DEFENDI	Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA	Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT	Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI	Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN	Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC)
SAPIN	Emilie	ATER	Physiologie-Pharmacologie

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey (01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin (01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle (01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain (01-10-2009 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne Cécile (01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice Faure, président du jury

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de présider le jury de cette thèse. Que ce travail soit en retour, le témoignage de mes remerciements, de ma reconnaissance et du profond respect que je vous porte.

A Madame le Docteur Christelle Corne, ma directrice de thèse

Je te suis reconnaissante d'avoir accepté de m'encadrer sur mon travail de thèse : ta bonne humeur permanente, ta disponibilité, tes conseils et ta réactivité m'ont permis de mener à bien ce projet malgré deux années bien mouvementées ! Je te remercie pour ton soutien sans faille.

A Madame le Docteur Véronique Ducros

Je vous remercie de m'avoir encadrée sur la partie spectrométrie de masse, que ce soit pour ce travail comme pour celui de mon M2R. J'ai apprécié votre disponibilité et vos précieux conseils tout au long de cette période.

A Monsieur le Professeur Joël Lunardi

Merci de participer à ce jury et d'avoir accepté avec gentillesse et sans hésitation de juger ce travail. Je vous adresse mon respect et ma plus grande reconnaissance.

A Madame le Docteur Christine Vianey-Saban

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger mon travail à travers votre regard de spécialiste. Un grand merci également de nous avoir accueillis si chaleureusement au sein du laboratoire des MHM de Lyon, et de nous avoir dévoilé « les secrets des acylcarnitines ».

A Madame le Docteur Isabelle Wroblewski

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail en temps que clinicienne. Merci pour le temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la spectrométrie de masse et tout particulièrement Dominique pour le temps passé sur les manip. Ta bonne humeur et ta disponibilité ont été très précieuses.

Un grand merci également à toute l'équipe des MHM pour votre dynamisme et votre soutien tout au long de ces derniers mois parfois rudes ! Un grand merci à Marie Pierre pour m'avoir épaulée en l'absence de Christelle. Ton dynamisme et ta réactivité ont été des sources de motivation.

A mes parents, merci pour votre confiance sans faille et votre soutien tout au long de ces années.

A mon frère, Manu et ma sœur, Clotilde (sans oublier évidemment Mat Mat et Seb), merci pour votre soutien.

A mes grands-parents, et à toute ma famille (Véra c'est à toi maintenant !), merci pour vos encouragements.

A Hub, ton soutien et ta patience quotidienne sont sans aucun doute les clés de la réussite de ce manuscrit. Je te remercie de m'avoir épaulée et surtout supportée tout au long de ce travail.

A tous mes amis de fac et d'internat... A Mélanie, Aurélie, Nico, Sophie et Jérémy pour ces années d'études et de grands moments partagés. A mes co-internes : Cécile, Bérangère, Julie, Lydvine, Caro, David, Anne-So et les autres pour ces belles années d'internat.

A mes copines d'enfance, Hélène, MB, Julie et Odile, merci pour votre amitié si forte et si précieuse.

Merci à tous les collègues des laboratoires, qui m'ont fait découvrir et plonger dans le monde passionnant de la biologie. Merci pour tous les moments agréables passés à vos côtés.

Table des Matières

Liste des Figures	10
Liste des Tableaux	12
Liste des abréviations	13
Introduction	15
Partie 1 : Synthèse bibliographique	17
Chapitre 1 Rappels physiologiques	18
1.1 La carnitine	18
1.1.1 Historique	18
1.1.2 Origine	19
1.1.3 Distribution	20
1.1.4 Rôles	21
1.1.4.1 Transport des acides gras au sein de la mitochondrie	21
1.1.4.2 Détoxification de métabolites potentiellement toxiques	24
1.1.4.3 Modulateur et régulateur des rapports intracellulaires des groupes acylés et acétylés	24
1.1.4.4 Protecteur des membranes biologiques phospholipidiques	25
1.2 La β -oxydation mitochondriale des acides gras	25
1.2.1 Cycle de la β -oxydation	25
1.2.2 Rôle de la β -oxydation	29
1.3 La chaîne respiratoire mitochondriale	32
1.3.1 Vue d'ensemble	32
1.3.2 La chaîne d'oxydoréduction	32
Chapitre 2 Conditions pathologiques	34
2.1 Les différents déficits en carnitine	34
2.1.1 Déficit primaire en carnitine	34
2.1.2 Déficits secondaires en carnitine	34
2.1.2.1 Conditions pathologiques	34
2.1.2.2 Situations acquises ou iatrogènes	35

2.1.2.3	Erreurs innées du métabolisme (cf paragraphe 2.2)	38
2.2	Erreurs innées du métabolisme	38
2.2.1	Anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras	38
2.2.1.1	Anomalies du cycle de la carnitine	42
2.2.1.2	Anomalies du cycle de la β -oxydation	44
2.2.1.3	Traitement des anomalies de la β -oxydation	49
2.2.2	Aciduries organiques	50
2.2.2.1	Définition	50
2.2.2.2	Les aciduries organiques classiques	50
2.2.2.3	Les aciduries organiques cérébrales	52
2.2.2.4	Traitement des aciduries organiques	54

Chapitre 3 Exploration des erreurs innées du métabolisme : place des acylcarnitines _____ **55**

3.1	Analyse des métabolites dans les liquides biologiques	55
3.1.1	Acides organiques urinaires	55
3.1.2	Profil des acylcarnitines et dosage de la carnitine totale et liée plasmatiques ou sur sang total	55
3.2	Etudes de Screening <i>in vitro</i>	56
3.3	Etudes enzymatiques spécifiques	57
3.4	Etudes moléculaires	57

Chapitre 4 La spectrométrie de masse _____ **58**

4.1	Rappel: principe	58
4.2	La spectrométrie de masse en tandem	60
4.3	Application au profil des acylcarnitines	61

Partie 2: Données expérimentales _____ **65**

Chapitre 1 Objectifs de l'étude _____ **66**

Chapitre 2 Matériel et Méthode _____ **67**

2.1	Principe	67
2.2	Règles préanalytiques	67
2.3	Matériel	68
2.3.1	Extraction	68
2.3.2	Spectrométrie de masse	69
2.4	Méthode	70
2.4.1	Préparation des standards internes	70
2.4.2	Extraction	70
2.4.3	Spectrométrie de masse	72

2.4.4	Validation de la méthode : paramètres étudiés	73
2.5	Application au screening néonatal de la MCAD	75
Chapitre 3	Résultats	76
3.1	Validation de la méthode	76
3.1.1	Interférences analytiques	76
3.1.2	Stabilité	80
3.1.3	Répétabilité	80
3.1.4	Reproductibilité	80
3.1.5	Valeurs physiologiques	87
3.1.6	Exemples de profils d'acylcarnitines	89
Chapitre 4	Discussion	100
4.1	Technique utilisée	100
4.2	Interprétation des profils obtenus	103
Conclusion		108
Bibliographie		110
Annexe		119
Serment de Galien		122

Liste des Figures

Figure 1: Formule structurale de la carnitine _____	18
Figure 2: Biosynthèse de la carnitine _____	20
Figure 3: Cycle de la carnitine _____	23
Figure 4: Cycle de la β -oxydation mitochondriale _____	27
Figure 5: Exemple du cycle de la β -oxydation mitochondriale de l'acide palmitique _____	29
Figure 6: Schéma du cycle de Krebs _____	30
Figure 7: Schéma de la cétogenèse _____	31
Figure 8: Le système de l'ETF (<i>Electron Transfer Flavoprotein</i>) _____	33
Figure 9: Les différents acylcarnitines _____	40
Figure 10: Caractéristiques des déficits de la β -oxydation mitochondriale des acides gras _	41
Figure 11: Vue d'ensemble des différentes anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras et acylcarnitines plasmatiques anormales associées _____	48
Figure 12: Anomalies de la β -oxydation des AG incluses dans les programmes de dépistage néonatal de différents pays _____	49
Figure 13: Schéma métabolique du catabolisme des acides aminés ramifiés _____	51
Figure 14: Schéma métabolique du catabolisme du tryptophane, de la lysine et de l'hydroxylysine _____	53
Figure 15: Principe de l'électrospray _____	59
Figure 16: Schéma d'un spectromètre de masse en tandem _____	60
Figure 17: Structures de la carnitine, des acylcarnitines et des acylcarnitines butylés _____	63
Figure 18: Fragmentation des acylcarnitines dans le spectromètre de masse _____	64
Figure 19: Application de la spectrométrie de masse en tandem au profil des acylcarnitines (mode Precursor Ion Scan) _____	64
Figure 20: Exemple de profils d'acylcarnitines plasmatiques en fonction de l'hémolyse ____	77
Figure 21: Exemple de profils d'acylcarnitines plasmatiques en fonction de l'anticoagulant utilisé _____	79
Figure 22: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un sujet sain _____	89
Figure 23: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient présentant une hypocarnitinémie _____	90

Figure 24: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient traité par cefotaxime (Claforan®)	91
Figure 25: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient traité par épuration extra-rénale	92
Figure 26: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient en cétose	93
Figure 27: Exemple de profil d'acylcarnitines sériques chez un patient décédé d'une MSIN	94
Figure 28: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'un déficit en MCAD	95
Figure 29: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'une acidurie glutarique de type 2	96
Figure 30: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'un déficit en CPT2	97
Figure 31: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'une acidurie méthylmalonique (AMM)	98
Figure 32: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'un déficit en 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase	99
Figure 33: Profils d'acylcarnitines associés à différentes maladies	105

Liste des Tableaux

Tableau I: Concentrations cibles de la carnitine et des acylcarnitines marquées _____	70
Tableau II: Impact de l'indice d'hémolyse sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques _____	81
Tableau III: Impact de l'indice lipémique sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques _____	82
Tableau IV: Impact de l'anticoagulant utilisé sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques _____	83
Tableau V: Impact de la durée de conservation des extraits sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques _____	84
Tableau VI: Essai de répétabilité _____	85
Tableau VII: Essai de reproductibilité _____	86
Tableau VIII: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez l'adulte _____	87
Tableau IX: Valeurs physiologiques des acylcarnitines sur sang total de nouveau-nés (prélèvement à J3) _____	88
Tableau X: Exemples d'acylcarnitines isomères _____	106
Tableau XI: Prélèvements à réaliser dans le cadre d'un bilan métabolique suite à une hypoglycémie majeure _____	107

Liste des abréviations

ADP : Adénosine Diphosphate

ATP : Adénosine Triphosphate

AG : Acide Gras

CACT : Carnitine/Acylcarnitine Translocase

CoA : coenzyme A

CPT2 : Carnitine Palmitoyltransferase 2

CPT1 : Carnitine Palmitoyltransferase 1

EDTA : Ethylene diamine Tetra-acetic Acid

ETF : Electro Transfer Flavoprotein

ETF-DH : Electron Transfer Flavoprotein Dehydrogenase

ESI : Electrospray Ionisation

FAD : Flavine adénine dinucléotide

GC/MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HAS : Haute Autorité de Santé

HMG-CoA lyase : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase

HPLC : chromatographie liquide haute performance

LC : chromatographie liquide

LCAD: Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase

LCHAD: Long Chain 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase

LKAT: Long Chain 3-Cetoacyl-CoA Thiolase

MCAD : Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase

MCKAT: Medium Chain 3-Cetoacyl-CoA Thiolase

MHM : Maladie Héritaire du Métabolisme

M/SCHAD: Medium/Short Chain 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase

MS : spectrométrie de masse

MSIN : Mort Subite Inattendue du Nourrisson

MSMS: spectrométrie de masse en tandem

NAD : Nicotinamide dinucléotide

OCTN2 : Organic-cation high-affinity transporter 2

PCD : Déficit primaire en carnitine

SCAD : Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase

TFP: Protéine Trifonctionnelle

VLCAD: Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase

Introduction

Les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (AG) constituent un groupe à part entière des maladies héréditaires du métabolisme (MHM) qui comptent aujourd'hui environ 500 maladies connues. Ces anomalies de la β -oxydation regroupent environ une vingtaine de déficits identifiés. Bien que leur prévalence individuelle soit faible, leur prévalence collective est élevée (1/5000 à 1/10 000) [1]. Cliniquement, elles peuvent se manifester à tout âge, et de diverses manières: hypoglycémie, myocardiopathie ou épisodes de rhabdomyolyse... Leur diagnostic biochimique repose sur la détermination du profil des acylcarnitines. En effet la carnitine est une molécule permettant de détoxifier les acyl-coenzymeA (acyl-CoA) qui s'accumulent dans la mitochondrie. On les retrouve alors sous forme d'acylcarnitines. En cas de déficit de la β -oxydation mitochondriale des AG, ce mécanisme de détoxification est saturé car les acyl-CoA ne peuvent plus être métabolisés, on retrouve alors un profil des acylcarnitines révélateur de ce déficit.

La spectrométrie de masse (MS), outil diagnostique puissant, est devenue indispensable à la biologie médicale actuelle. Dans ce contexte, le développement de nouveaux paramètres diagnostiques utilisant cette technique apparaît comme une évidence. La détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem (MSMS) est déjà largement répandue dans les laboratoires de biochimie métabolique et nous l'avons utilisée dans notre travail.

Cette analyse peut non seulement diagnostiquer les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG, mais elle est également en mesure de mettre en évidence un autre groupe de MHM que sont les aciduries organiques. De plus, la recherche de certaines acylcarnitines, est déjà largement utilisée dans certains pays pour le dépistage néonatal systématique de ces MHM. Elle est d'ailleurs d'actualité en France puisqu'un récent rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) préconise le dépistage systématique du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne ou Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) [2], une anomalie de la β -oxydation des AG caractérisée par l'accumulation d'acylcarnitines à chaîne moyenne dont l'octanoylcarnitine.

Après une synthèse bibliographique sur le métabolisme de la carnitine et les différentes MHM pouvant être diagnostiquées par le profil des acylcarnitines, nous aborderons la mise au point technique de cette analyse ainsi que ses critères de validation. Enfin, la discussion nous permettra de faire le point sur cette méthode et d'évaluer les enjeux de la validation biologique de ces profils.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Rappels physiologiques

1.1 La carnitine

1.1.1 Historique

La carnitine a été découverte en 1905 par deux chercheurs russes, Gulewitsch et Krimberg, alors qu'ils étudiaient des extraits de muscle de bœuf. Elle a été nommée à partir du mot latin « carnis » qui signifie chair [3].

Quelques années plus tard, en 1927, la formule chimique de la carnitine a été décrite : acide 3-hydroxy-4-triméthyl-amino-butyrique [4].

En 1952, des études réalisées sur le ver de farine (*Tenebrio molitor*) à la recherche de nouvelles vitamines du groupe B ont mis en évidence un facteur de croissance baptisé vitamine B_T qui s'est avéré être la carnitine [5, 6].

En 1955, Fritz est le premier à découvrir le rôle de la carnitine sur le métabolisme oxydatif des AG à longue chaîne, s'effectuant au sein même des mitochondries [7].

En 1962, la forme physiologique active de la carnitine a été identifiée : il s'agit de l'isomère L (-) ou lévocarnitine. L'isomère D (+) étant biologiquement inactif [8] (**Figure 1**).

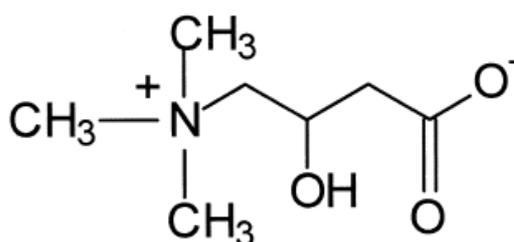


Figure 1: Formule structurale de la carnitine

En 1973, les deux premiers cas cliniques concernant des déficits affectant la β -oxydation des AG sont décrits : un déficit en carnitine par Engel et Angelini [9] et un déficit en carnitine palmitoyltransférase type II (CPTII) par Di Mauro et Di Mauro [10].

Depuis, les connaissances sur le métabolisme et le rôle de la carnitine ont beaucoup progressé, et de nombreux cas de déficits primaires comme secondaires sont maintenant connus.

1.1.2 Origine

Chez les humains, 75% de la carnitine provient de l'alimentation (régime omnivore) [11]. La carnitine est largement retrouvée dans l'alimentation d'origine animale, par contre sa disponibilité est plus limitée dans les végétaux. Ainsi les principales sources de carnitine sont la viande rouge et les produits laitiers. Les humains ingèrent entre 2 et 12 $\mu\text{mol/kg/jour}$ de carnitine (régime omnivore) [12].

L'autre partie de la carnitine (25%) provient d'une synthèse endogène. Les principaux sites de production de la carnitine chez l'homme sont le foie, le rein et le cerveau [13].

Deux acides aminés sont nécessaires pour la synthèse endogène : la méthionine et la lysine. Chez les Mammifères, certaines protéines contiennent des résidus de *N*-triméthyl-lysine (TML) qui est le premier métabolite nécessaire à la biosynthèse de la carnitine.

La TML-dioxygénase va produire le 3-hydroxy-TML (HTML). Cette enzyme nécessite des cofacteurs : le 2-oxoglutarate, le fer ferreux (Fe^{2+}) et de l'oxygène moléculaire. Brièvement, l'hydroxylation du substrat (TML) par la TML-dioxygénase est lié à la décarboxylation oxydative du 2-oxoglutarate en succinate et CO_2 . L'oxygène moléculaire réagit avec le site actif de l'enzyme pour former un intermédiaire oxo-ferryl ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) utilisé pour hydroxyler la TML. Le second atome d'oxygène est incorporé dans le 2-oxoglutarate, entraînant la formation de succinate et la libération de CO_2 . De plus, la TML-dioxygénase nécessite également la présence d'acide ascorbique, son rôle semble être de maintenir le fer à l'état ferreux.

Ensuite, l'action de la HTML-aldolase, dont le cofacteur est le pyridoxal-5'-phosphate, va conduire à la formation de 4-triméthylaminobutyraldéhyde (TMABA).

La TMABA-deshydrogénase, qui nécessite la présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), transforme le TMABA en 4-*N*-triméthylaminobutyrate (= butyrobétaine).

Enfin la dernière étape implique la butyrobétaine dioxygénase, dont le mode de fonctionnement est similaire à la TML-dioxygénase, et conduit à la formation de carnitine [14] (**Figure 2**).

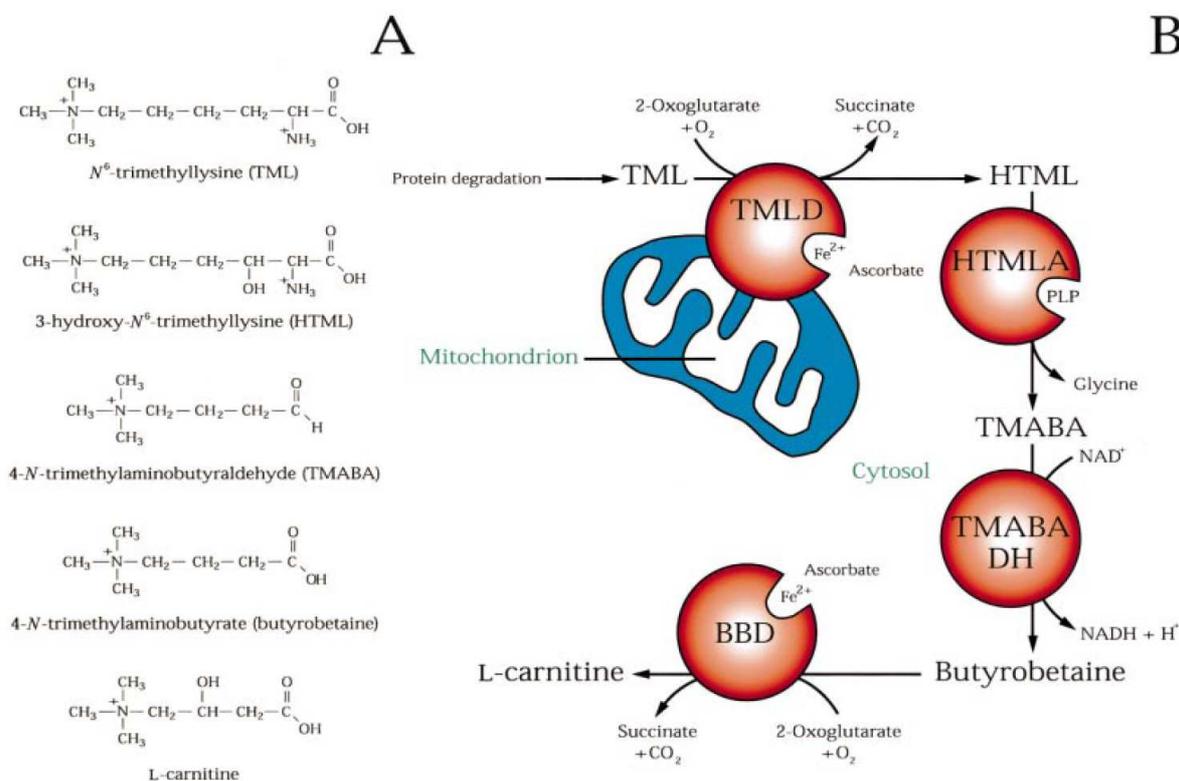


Figure 2: Biosynthèse de la carnitine (d'après Vaz. [14])

(A) Structures chimiques des cinq métabolites de la biosynthèse de la carnitine.

(B) Biosynthèse de la carnitine à partir de la TML. Après libération de la TML par la dégradation lysosomale des protéines, ce composé est hydroxylé par la TMLD (EC 1.14.11.8 ; *N*6-triméthyllysine dioxygénase) en HTML qui est clivée par une aldolase spécifique, la HTMLA (EC 4.1.2.'X' ; 3hydroxy-*N*6-triméthyllysine aldolase) en TMABA et glycine. Par la suite, la TMABA est oxydée en butyrobétaine (4-*N*-triméthylaminobutyrate) via la TMABA-DH (EC 1.2.1.47 ; 4-triméthylaminobutyraldéhyde deshydrogénase) Dans la dernière étape, la butyrobétaine est hydroxylée par la BBD (EC 1.14.11.1 ; γ-butyrobétaine dioxygénase) pour former la carnitine.

1.1.3 Distribution

La carnitine synthétisée se retrouve dans la circulation générale sous forme libre (absence de liaison protéique). Les tissus les plus consommateurs de carnitine, à savoir les

muscles cardiaques et squelettiques, ne peuvent pas la synthétiser (car ne possèdent pas la γ -butyrobétaine dioxygénase) [15]. La concentration tissulaire en carnitine est vingt à cinquante fois supérieure à celle du plasma, il y a donc nécessité d'un transport actif pour la plupart de ces tissus [14].

Le principal transporteur membranaire impliqué dans l'assimilation de la carnitine par les tissus est le transporteur OCTN2 (organic-cation high-affinity transporter) qui est un transporteur sodium-dépendant de haute affinité pour la carnitine. Son expression est importante au niveau des membranes plasmiques des cellules des muscles squelettiques, du rein, du cœur, du placenta et des reins [16].

Il existe également d'autres transporteurs de la carnitine, ayant une affinité moindre. Il s'agit du transporteur OCTN1 et du transporteur ATB^{o+} (amino acid transporter) [14].

L'excrétion de la carnitine est urinaire, mais la majorité de la carnitine est réabsorbée par le rein qui assure le maintien des conditions d'homéostasie optimales [14].

1.1.4 Rôles

1.1.4.1 Transport des acides gras au sein de la mitochondrie

- Origine des AG

Chez l'homme, la majorité des AG sont exogènes et les besoins sont largement couverts par l'apport alimentaire. Cependant certaines cellules (en particulier les hépatocytes et les adipocytes) sont capables de synthétiser des AG endogènes. En situation normale, le niveau de synthèse est bas sauf en cas de régime hyperglucidique où l'acétyl-CoA issu de la glycolyse emprunte la voie de synthèse des AG.

L'origine des AG dépend donc de l'état nutritionnel de l'organisme. En cas de jeûne, stress ou exercice, les triglycérides de réserve du tissu adipeux sont hydrolysés et libèrent des AG aux différents tissus via la circulation générale. Les AG sont alors soit métabolisés pour produire de l'énergie, soit remis en réserve. Après un repas, les graisses absorbées (végétales ou animales) fournissent des triglycérides à chaîne longue qui seront hydrolysés. Une fois dans les cellules, les AG libres sont estérifiés en triglycérides ou phospholipides [17].

- Transport des AG

Différentes étapes de transport sont nécessaires avant que les AG pénètrent dans la mitochondrie pour y être oxydés. La captation des AG par les cellules est largement réalisée pour les AG à longue chaîne et très longue chaîne par l'intermédiaire de protéines membranaires de transport des AG, les FATP (*Fatty Acid Transport Protein*). Ces protéines sont retrouvées dans l'ensemble des tissus utilisant les AG et possèdent une activité acyl-CoA synthétase, suggérant ainsi que les AG sont rapidement convertis en acyl-CoA après translocation à travers la membrane cytoplasmique. A côté de ces FATP, d'autres protéines sont impliquées dans le transport des AG : les FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) et la FAT (*Fatty Acid Translocase*) [18].

La L-carnitine joue un rôle essentiel au niveau du métabolisme énergétique des tissus (muscle cardiaque, squelettique) et de certaines lignées cellulaires (ostéoblastes [19]) via le transport des AG à chaîne longue à travers la membrane interne de la mitochondrie. Cette dernière est en effet imperméable aux AG à chaîne longue (12 à 20 C) et la L-carnitine est l'unique transporteur leur permettant de pénétrer au sein de la mitochondrie où ils subiront la β -oxydation.

Ainsi, le transport au sein de la mitochondrie des AG à chaîne courte (2 à 4 C) et à chaîne moyenne (6 à 10 C) se réalise par simple diffusion passive. Concernant le transport des AG à chaîne longue, celui-ci se caractérise par l'action concertée de trois enzymes : la carnitine-palmitoyltransférase I (CPTI), la carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) et la carnitine-palmitoyltransférase II (CPTII) (**Figure 3**) [20].

La CPTI est localisée sur la membrane externe de la mitochondrie et permet la conversion, après activation des AG en acyl-CoA dans le cytoplasme (via l'acyl-CoA synthétase), des acyl-CoA en acylcarnitine :

CPT I



Ensuite, la CACT, située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, assure l'échange carnitine libre/carnitine acylée à travers cette même membrane (la carnitine libre sort de la mitochondrie tandis que la carnitine-acylée rentre).

Enfin, la CPTII, enzyme localisée sur la face interne de la membrane mitochondriale interne, permet la libération des acyl-CoA dans la mitochondrie :

CPT II

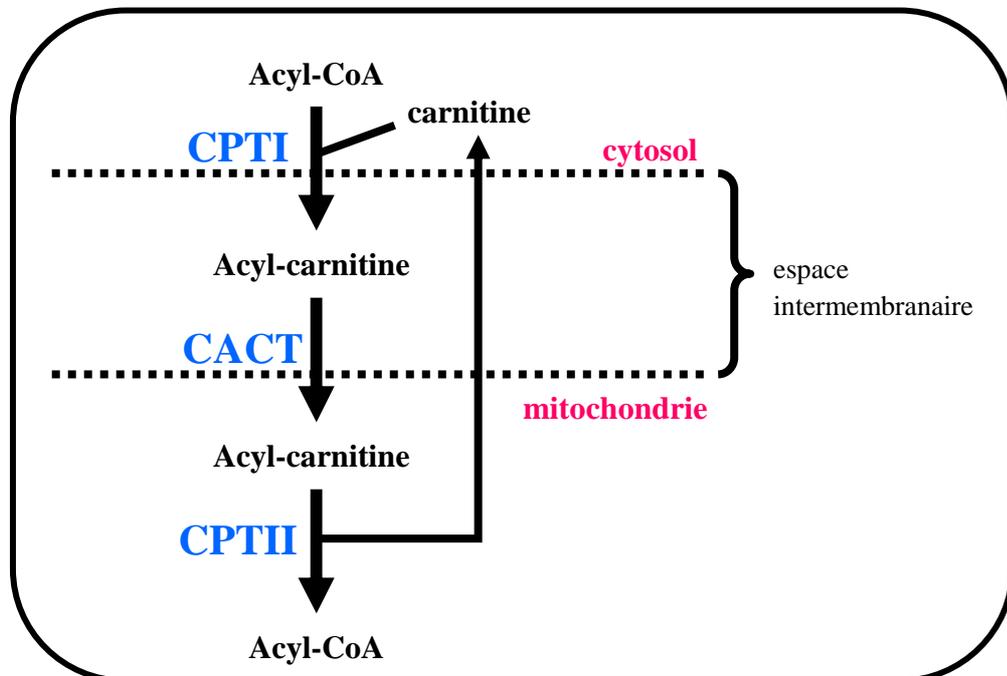


Figure 3: Cycle de la carnitine (d'après De Lonlay, [1])

Les AG à longue chaîne pénètrent dans la mitochondrie via la navette carnitine qui implique trois enzymes : la CPTI (carnitine-palmitoyl transférase I), la CACT (carnitine/acylcarnitine translocase) et la CPTII (carnitine-palmitoyl transférase II).

Une fois rentrés au sein de la mitochondrie, les AG vont pouvoir subir la β -oxydation proprement dite. Cette β -oxydation des AG permet la synthèse d'acétyl-CoA dont l'utilisation

directe ou indirecte par le biais des corps cétoniques permet la fourniture de l'adénosine triphosphate (ATP) mitochondrial (cf. paragraphe 1.2.1).

1.1.4.2 Détoxification de métabolites potentiellement toxiques

La carnitine joue également un rôle dans le transport hors de la mitochondrie (et des peroxysomes) des fragments acylés issus de la β -oxydation. En effet, ce mécanisme de détoxification est en particulier important lorsque les acyl-CoA s'accumulent dans la mitochondrie, notamment en cas d'anomalie de la β -oxydation des AG [18]. La carnitine sert alors de transporteur aux fragments d'AG potentiellement oxydés en les déplaçant hors de la mitochondrie (et des peroxysomes) sous la forme d'acylcarnitines.

La carnitine intervient également dans l'oxydation des dérivés de la valine et de la leucine. Ainsi, suite à la mobilisation des groupes acylés (résultant de la décarboxylation oxydative des acides aminés ramifiés), par formation d'acylcarnitines, celles-ci sont transportées hors de la mitochondrie puis éliminées dans les urines [21]. De ce fait, dans certaines conditions pathologiques (telles que les aciduries organiques), le rôle épurateur de la carnitine est intensifié.

Ce système est également utilisé pour la détoxification de certains médicaments qui utilisent la β -oxydation comme voie de métabolisation. C'est le cas par exemple de l'acide valproïque dont les métabolites pourront être épurés via la carnitine (sous forme de valproylcarnitine) (cf. paragraphe 2.1.2.2).

1.1.4.3 Modulateur et régulateur des rapports intracellulaires des groupes acylés et acétylés

La carnitine, de part son double rôle de transport à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie via la transformation réversible des acyl-CoA et des acétyl-CoA en acylcarnitine et acétylcarnitine, permet la régulation des concentrations intracellulaires en acétyl-CoA / CoA libre et acyl-CoA / CoA libre. En effet, c'est grâce à la carnitine que les groupes acylés et acétylés peuvent se déplacer d'un compartiment cellulaire à un autre puisque les membranes biologiques sont imperméables au CoA [21].

Ainsi, le pool d'acyl-CoA et d'acétyl-CoA disponibles permet un apport en substrats nécessaires à de nombreux processus métaboliques : la β -oxydation des AG, le cycle de Krebs, la synthèse des lipides, du cholestérol, des corps cétoniques...

1.1.4.4 Protecteur des membranes biologiques phospholipidiques

La L-carnitine semble avoir une action sur la stabilisation de la structure des membranes biologiques en re-captant les acyl-CoA faisant partie de la structure phospholipidique de ces membranes [21], et grâce à son action antioxydante (molécule réductrice).

Les carnitine-palmitoyltransférases semblent en particulier avoir une fonction essentielle dans le processus de dé-acylation/ré-acylation des phospholipides membranaires de l'érythrocyte, entraînant une réduction de sa fragilité membranaire [22].

1.2 La β -oxydation mitochondriale des acides gras

1.2.1 Cycle de la β -oxydation

La β -oxydation des AG est une voie énergétique qui s'effectue pour 90% au niveau mitochondrial et pour le reste au niveau peroxysomal (AG à très longue chaîne).

Il existe également une ω -oxydation des AG localisée au niveau des microsomes hépatocytaires. Celle-ci est normalement mineure mais peut être largement sollicitée en cas d'anomalie de la β -oxydation. Au lieu d'impliquer le carbone en β , celle-ci implique le carbone en ω (CH_3 terminal). Elle aboutit à la libération d'acides dicarboxyliques (acide sébacique C10, acide subérique C8, acide adipique C6) pouvant soit être éliminés dans les urines, soit subir la β -oxydation à partir des deux extrémités.

La β -oxydation a été découverte par Georg Franz Knoop en 1904 [23]. La mitochondrie, tout comme le peroxysome, possède l'ensemble des enzymes nécessaires à la β -oxydation des AG. Celle-ci se réalise en deux phases distinctes. La première concerne le transport mitochondrial des AG à chaîne longue (cf. paragraphe 1.1.4.1), et la seconde la β -oxydation intra-mitochondriale.

Cette β -oxydation se caractérise par une séquence de quatre réactions enzymatiques appelée hélice de Lynen. A chaque tour d'hélice, un résidu d'acétyl-CoA est libéré (**Figures 4 et 5**).

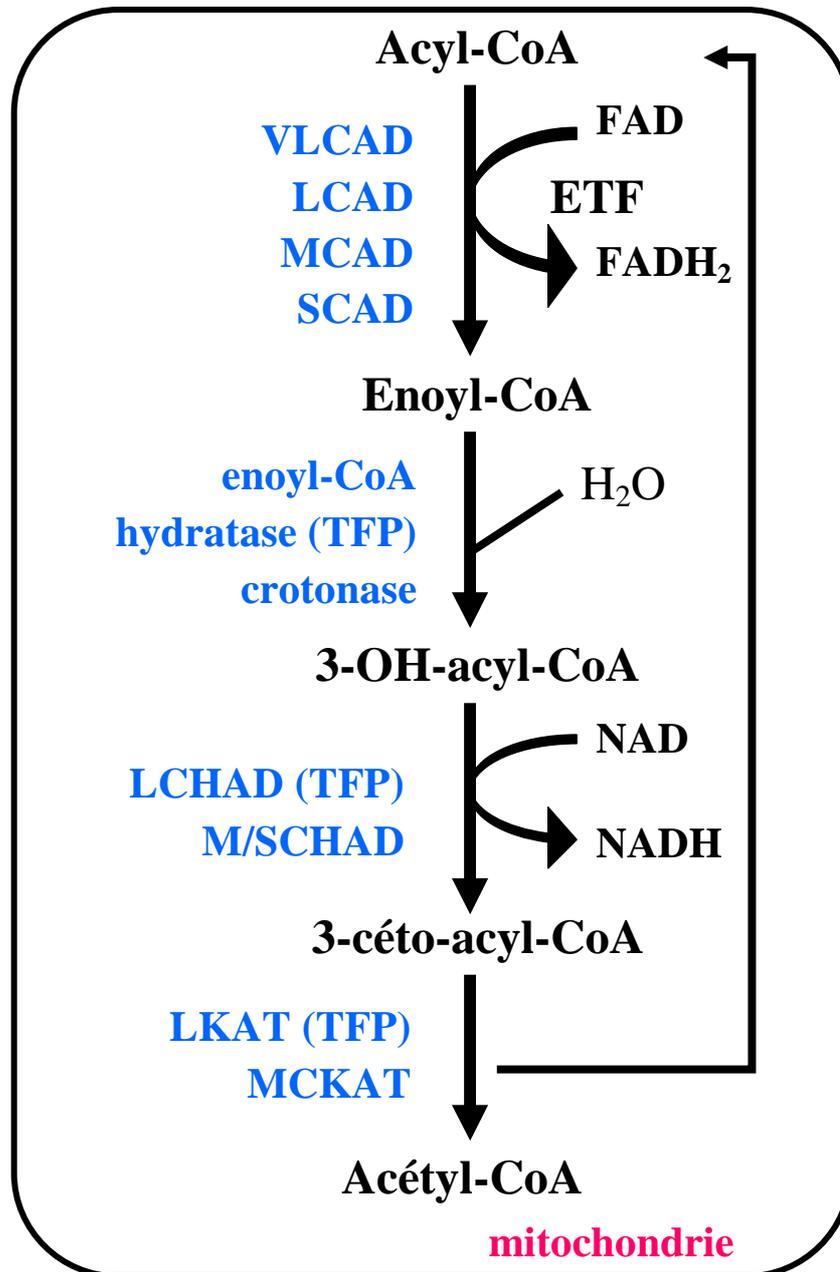


Figure 4: Cycle de la β -oxydation mitochondriale (d'après Houten,[18])

Enzymes impliquées : VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) ; LCAD (long chain acyl-CoA dehydrogenase) ; MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase) ; SCAD (short chain acyl-CoA dehydrogenase) ; TFP (enzyme trifonctionnelle) ; LCHAD (long chain 3 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) ; M/SCHAD (medium/short chain 3 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) ; LKAT (long chain 3-cétoacyl-CoA thiolase) ; MCKAT (medium chain 3-cétoacyl-CoA thiolase) ; ETF (Electron Transfer Flavoprotein).

Les quatre réactions sont les suivantes :

- Déshydrogénation de l'acyl-CoA par une Acyl-CoA Déshydrogénase qui possède un cofacteur : le flavine-adénine-dinucléotide (FAD) (issu de la vitamine B (riboflavine)) et fait également intervenir un système de transport d'électrons (ETF= *Electron Transfer Flavoprotein* et ETF-QO= *Electron Transfer Flavoprotein ubiQuinone Oxydoreductase*). Il existe plusieurs isoenzymes adaptées à la longueur de la chaîne de l'AG :

- la SCAD (*Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase* ou *acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte*) agit sur les AG à chaîne courte (2 à 4 C)

- la MCAD (*Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*) agit sur les AG à chaîne moyenne (6 à 10 C)

- la LCAD (*Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase* ou *acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue*) agit sur les AG à chaîne ramifiée.

- la VLCAD (*Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase* ou *acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à très longue chaîne*) agit principalement sur les AG à chaîne longue (C12 à C20) mais également sur les acides gras à très longue chaîne jusqu'à 24 C.

Cette étape conduit à la formation d'énoyl-CoA et de FAD réduite (FADH₂).

- Hydratation de la double liaison catalysée par une crotonase pour les chaînes moyennes et courtes ou par la protéine trifonctionnelle (activité énoyl-CoA hydratase) pour les chaînes longues.

- Déshydrogénation par la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase, possédant une coenzyme à NAD qui est réduit lors de la réaction et réoxydé dans la chaîne respiratoire. Pour cette étape, il existe plusieurs isoenzymes suivant la longueur de la chaîne : la M/SCHAD (*Medium/Short Chain 3 HydroxyAcyl-CoA Dehydrogenase* ou *3 hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne/courte*) pour les chaînes courtes et moyennes et la LCHAD (*Long Chain 3 HydroxyAcyl-CoA Dehydrogenase* ou *3 hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue*) pour les chaînes longues (activité enzymatique détenue par la protéine trifonctionnelle).

- Libération d'acétyl-CoA après clivage par la 3-cétothiolase. Pour les chaînes longues, il s'agit de la LKAT (*Long Chain 3-Cétoacyl-CoA Thiolase* ou *3 cétoacyl-CoA thiolase des chaînes longues*) (activité enzymatique détenue par la protéine trifonctionnelle). Pour les chaînes moyennes et courtes, il s'agit de la MCKAT (*Medium Chain 3-Cétoacyl-CoA Thiolase* ou *3 cétoacyl-CoA thiolase des chaînes moyennes*).

L'acyl-CoA du départ se retrouve donc amputé de deux carbones (acétyl-CoA) et subit d'autres cycles d'oxydation jusqu'à l'apparition d'un 3-céto-acyl-CoA à quatre atomes de carbone qui sera scindé en deux acétyl-CoA. Ainsi, à chaque cycle d'oxydation, un acyl-CoA est raccourci de deux atomes de carbone, un FADH₂, un NADH, H⁺ et un acétyl-CoA sont formés.

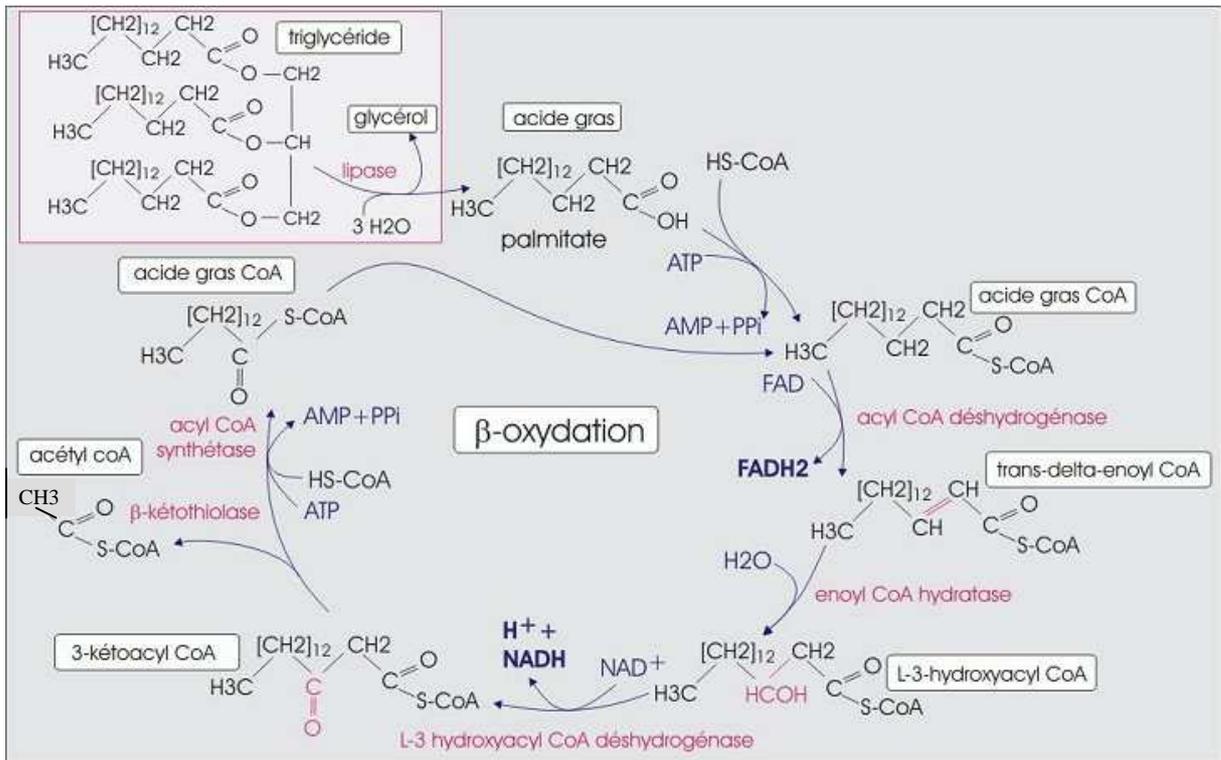


Figure 5: Exemple du cycle de la β-oxydation mitochondriale de l'acide palmitique (C16) (d'après [24])

Ici, l'acide palmitique (C16), une fois rentré dans la mitochondrie (navette carnitine), va subir la β-oxydation. Un cycle (ou un tour d'hélice de Lypen) conduit à la formation d'un acide gras amputé de deux carbones (acide myristique C14) et d'acétyl-CoA. Le cycle recommence jusqu'à libération de deux acétyl-CoA.

1.2.2 Rôle de la β-oxydation

Chez les individus sains, l'oxydation des AG permet de répondre à un besoin énergétique important lié à une déplétion en glycogène qui peut résulter soit d'un jeûne, soit d'une activité musculaire augmentée. Durant ces épisodes, les taux circulants de glucose et d'insuline diminuent et activent la lipase hormonosensible au niveau du tissu adipeux. Il y a alors

libération d'AG libres, lesquels se lient à l'albumine et sont distribués aux tissus périphériques [25].

En effet, toutes les cellules de l'organisme nécessitent un ou plusieurs substrats énergétiques pour assurer leur intégrité fonctionnelle. Certains organes, tels que le cœur et le muscle au repos ou à l'effort prolongé utilisent préférentiellement les AG comme principale source d'énergie cellulaire. On estime que l'oxydation des AG chez un sujet soumis à un régime normal, fournit plus de 40% des besoins énergétiques et durant le jeûne, celle-ci peut fournir jusqu'à 80% des besoins énergétiques totaux [26]. Le produit final de l'oxydation des AG, l'acétyl-CoA, se condense avec l'oxaloacétate en citrate, oxydé dans le cycle de Krebs (Figure 6).

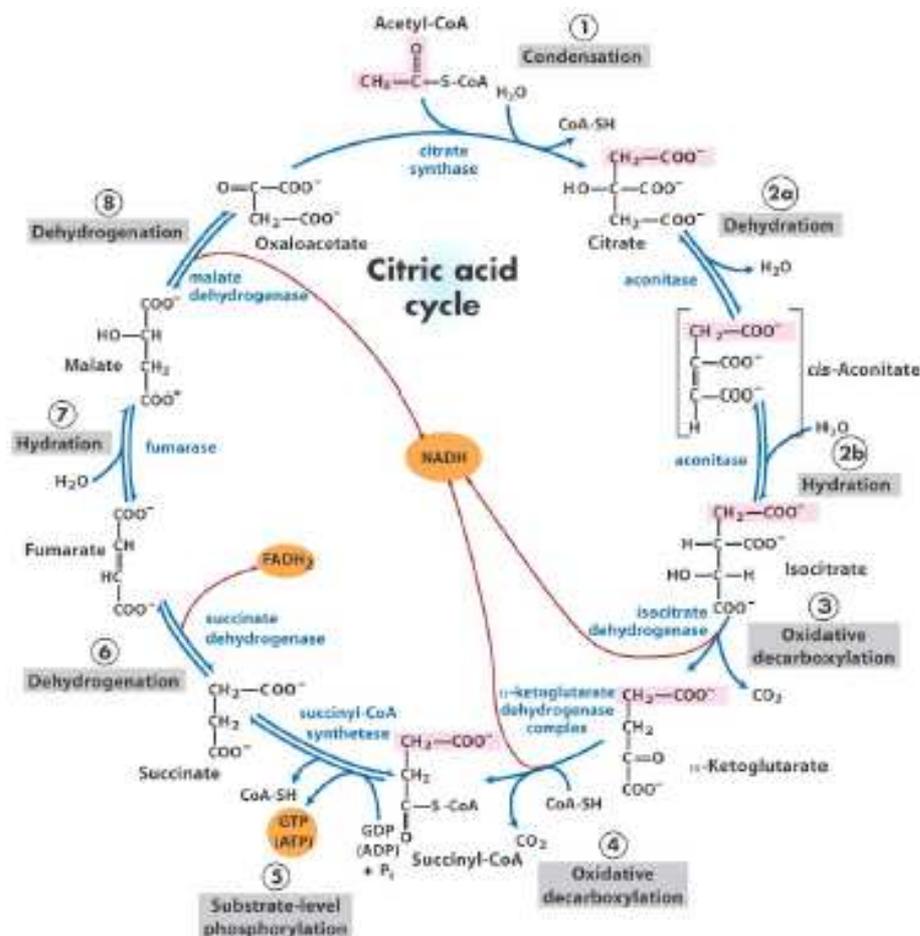


Figure 6: Schéma du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) (d'après [27])

L'acétyl-CoA, se condense avec l'oxaloacétate en citrate, oxydé dans le cycle de Krebs, dont la finalité est de produire des intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'adénosine triphosphate (ATP) dans la chaîne respiratoire.

Par ailleurs, le foie s'avère être également un site majeur d'utilisation des AG. En effet, l'énergie (ATP) nécessaire à la gluconéogenèse et à l'uréogénèse est fournie par l'oxydation des AG. D'autre part, l'acétyl-CoA est le précurseur de la cétogénèse (**Figure 7**).

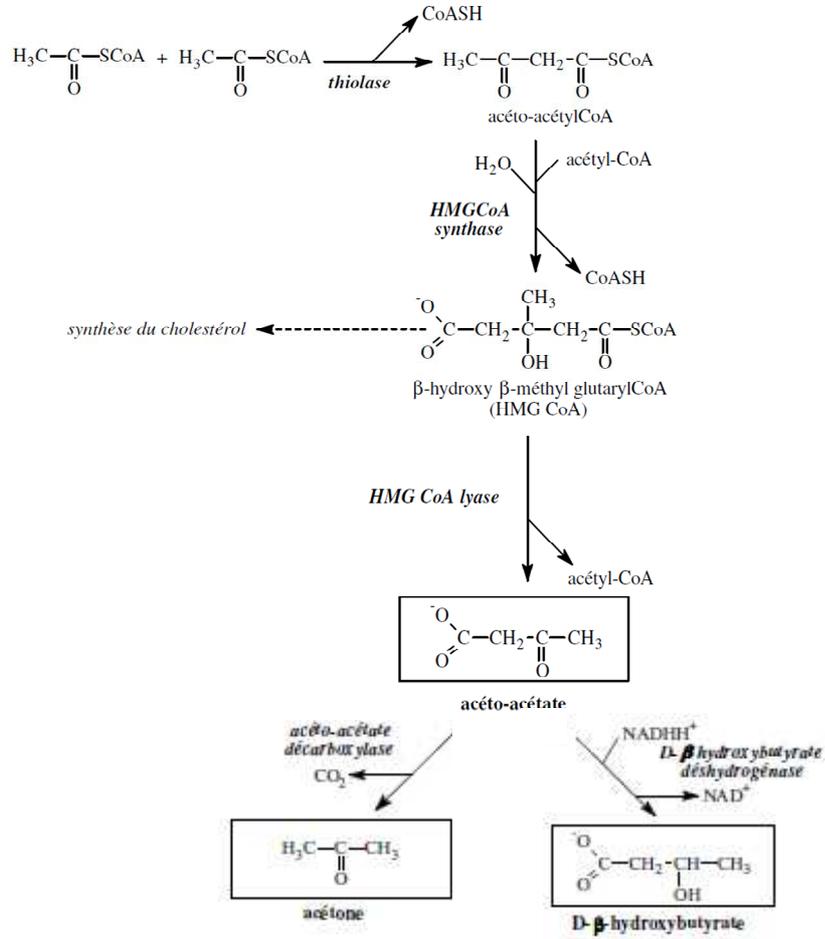


Figure 7: Schéma de la cétogénèse (d'après [28])

La cétogénèse est une voie métabolique uniquement présente dans les cellules hépatiques ; seconde voie d'utilisation de l'acétyl-CoA après le cycle de Krebs. Elle est particulièrement privilégiée lors d'un jeûne prolongé ou en cas de diabète (l'organisme ne peut plus puiser dans ses réserves de glucose pour fournir l'ATP). Elle aboutit à la formation de trois corps cétoniques (acétoacétate, 3-hydroxybutyrate et acétone).

Les corps cétoniques produits sont déversés dans la circulation et utilisés à des fins énergétiques par de nombreux tissus et en particulier par le cerveau qui est incapable de réaliser l'oxydation complète des AG. Ainsi lors d'un épisode de jeûne, le cerveau se retrouve particulièrement dépendant des corps cétoniques, sa principale source d'énergie [1].

1.3 La chaîne respiratoire mitochondriale

1.3.1 Vue d'ensemble [29]

La chaîne respiratoire est un ensemble physique et fonctionnel localisé dans la membrane interne des mitochondries. Son rôle est de produire de l'ATP et de l'eau à partir des hydrogènes des molécules énergétiques et de l'oxygène de l'air :

- les hydrogènes (protons H^+ et électrons e^-) sont apportés par les coenzymes NADH, H^+ et $FADH_2$, substrats de la chaîne respiratoire
- l'oxygène (sous forme moléculaire (O_2)) est apporté aux tissus par la respiration, la circulation sanguine et la diffusion tissulaire
- l'eau est produite au terme d'une chaîne de réactions d'oxydo-réduction
- l'ATP est synthétisée par phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en utilisant l'énergie produite lors du transfert des électrons, par la chaîne d'oxydo-réduction

Ainsi la chaîne respiratoire mitochondriale comporte deux sous-ensembles : la chaîne d'oxydo-réduction et le mécanisme de phosphorylation.

1.3.2 La chaîne d'oxydoréduction

Nous nous intéresserons en particulier à une enzyme flavinique : l'ETF-QO (*Electron Transfer Flavoprotein ubiQuinone Oxidoreductase*) qui intervient entre autre, dans la β -oxydation mitochondriale des AG.

En effet, comme nous l'avons vu précédemment, lors de la première réaction du cycle de la β -oxydation, la déshydrogénation des acyl-CoA est catalysée par des déshydrogénases qui sont des flavoprotéines à FAD. La réaction entraîne la formation d'une molécule de FAD réduite ($FADH_2$). Cette dernière sera oxydée (FAD) avec un gain de deux ATP grâce à l'ETF (*Electron Transfer Flavoprotein*) qui capte les hydrogènes et joue le rôle de coenzyme transporteur d'électrons. L'ETF-QO oxyde l'ETF et transmet les hydrogènes au coenzyme Q de la chaîne respiratoire (**Figure 8**).

La chaîne mitochondriale transporte les équivalents réducteurs (H^+ et e^-) des coenzymes réduits (NADH, H^+ et $FADH_2$) vers l'oxygène. Ce transport est réalisé par une série de systèmes d'oxydo-réduction au sein de quatre éléments fixes enchâssés dans la

membrane interne (les complexes respiratoires CI, CII, CIII, CIV) et de deux éléments mobiles (l'ubiquinone ou coenzyme Q et le cytochrome c).

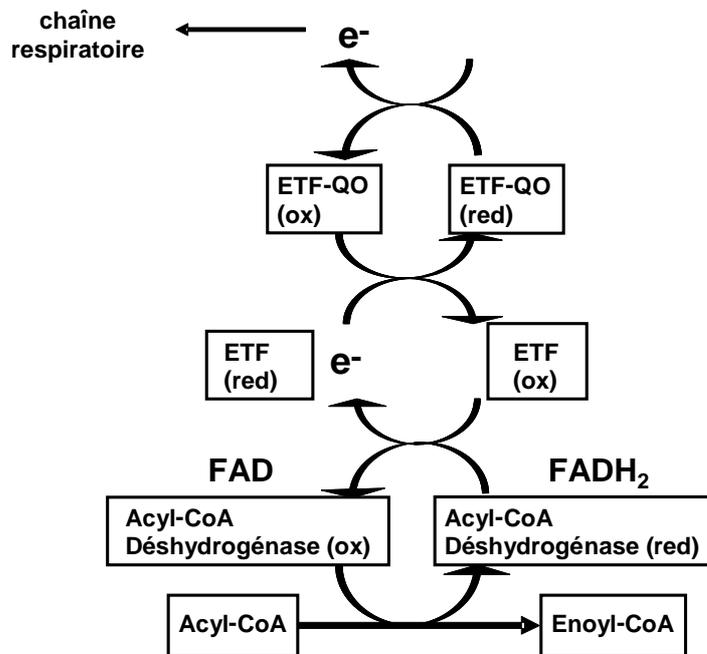


Figure 8: Le système de l'ETF (*Electron Transfer Flavoprotein*)

ox=oxydé, red=réduit

Chapitre 2 Conditions pathologiques

2.1 Les différents déficits en carnitine

2.1.1 Déficit primaire en carnitine

Le déficit primaire en carnitine (PCD ; OMIM 212140) est une pathologie autosomique récessive rare, causée par un défaut du transporteur de la carnitine (OCTN2), codé par le gène SLC22A5 (557 acides aminés), et localisé dans la membrane plasmique. La captation de la carnitine par les tissus (en particulier les muscles cardiaque et squelettique) est de ce fait restreinte et la perte rénale est majorée ; engendrant une déplétion systémique en carnitine. Une étude japonaise a estimé la prévalence de cette pathologie à 1/40 000 [30]. Le transporteur OCTN2 n'est pas exprimé dans le foie, un défaut de ce transporteur n'aura donc pas d'impact sur la cétogénèse hépatique.

Ce déficit peut se manifester de la période néonatale à l'âge adulte. Cliniquement, trois organes peuvent être atteints : le muscle cardiaque (conduisant à une cardiopathie sévère et progressive), le système nerveux central (affecté par une encéphalopathie due à une hypoglycémie sans cétose) et le muscle squelettique (myopathie) [31].

Biologiquement, le diagnostic repose sur un effondrement des taux de carnitine plasmatique libre et totale couplé à une excrétion urinaire conservée. Un défaut de captation *in vitro* de la carnitine par des lymphocytes ou fibroblastes peut être mis en évidence [32]. Enfin, la recherche de mutations sur le gène SLC22A5 peut confirmer le diagnostic.

Concernant le traitement, une supplémentation à vie de carnitine à forte dose s'avère relativement efficace [33].

2.1.2 Déficits secondaires en carnitine

2.1.2.1 Conditions pathologiques

- Prématurité

Les enfants prématurés ont un risque de présenter un déficit en carnitine pour plusieurs raisons. D'une part, la synthèse endogène de carnitine est limitée de part l'immaturation du

système enzymatique (avec notamment de faibles taux de γ -butyrobétaine dioxygénase). D'autre part, le stockage et donc les réserves de carnitine dans le tissu fœtal se font de façon croissante au cours de la dernière partie de la grossesse et sont de ce fait insuffisantes chez les prématurés.

Ces enfants sont donc dépendants, à la naissance, d'apports exogènes dans leur alimentation pour pallier à ce déficit. Dans le cas contraire, ils pourront présenter les signes cliniques d'un déficit en carnitine : apnée, retard de développement, troubles gastro-intestinaux, cardiomyopathie, myopathie périphérique...[34].

- Insuffisance rénale

Les reins ont un rôle important sur le métabolisme de la carnitine. Chez les individus sains, la carnitine est filtrée et la quasi totalité de la carnitine libre est réabsorbée au niveau tubulaire. Ainsi ce sont les acylcarnitines (carnitine estérifiée et de longueur de chaîne inférieure à 12 carbones) qui apparaissent dans les urines.

En cas d'atteinte rénale (tubulopathie, syndrome de Fanconi, insuffisance rénale chronique), une déplétion en carnitine est observée [35].

- Insuffisance hépatique

Chez les patients atteints de cirrhose, un déficit en carnitine est souvent retrouvé. Cette condition résulte d'une part d'un apport diminué en carnitine et en acides aminés (lysine, méthionine) et d'autre part d'une perte de capacité à synthétiser la carnitine (conversion altérée de γ -butyrobétaine en carnitine) [15, 36].

2.1.2.2 Situations acquises ou iatrogènes

- Insuffisance rénale et hémodialyse chronique

La carnitine libre et les acylcarnitines à chaîne courte et moyenne sont filtrées au niveau glomérulaire puis la carnitine libre est réabsorbée en quasi-totalité au niveau tubulaire. La carnitine est une petite molécule soluble dans l'eau et donc facilement dialysable, ceci entraînant une diminution des taux de carnitine libre en cas d'hémodialyse. Pour pallier à ce

déficit, les tissus vont relarguer de la carnitine et entraîner une chute des réserves. Ainsi l'installation du déficit en carnitine sera progressive et corrélée à la durée de la dialyse. De plus, on retrouve un taux élevé d'acylcarnitines plasmatiques, liée à la non filtration glomérulaire des acylcarnitines à chaîne courte et moyenne, conduisant à un ratio acylcarnitines/carnitine libre élevé [37].

- Malnutrition

Des taux abaissés de carnitine ont été décrits chez des patients (adultes et enfants) souffrant de malnutrition. En général, après intervention diététique, les taux s'améliorent [15].

- Nutrition parentérale totale

Il a été décrit que des patients sous nutrition parentérale totale sont susceptibles de présenter un déficit secondaire en carnitine en l'absence de supplémentation en carnitine [38].

- Grossesse

Chez les femmes enceintes, le taux de carnitine est abaissé et peut atteindre une valeur deux fois plus faible que les taux physiologiques au moment de l'accouchement. Cependant, les raisons de cette diminution restent encore obscures et les conséquences sur la femme et son fœtus ne sont pas encore déterminées [39].

- Maladie des vomissements de la Jamaïque [40]

Cette maladie est caractérisée par des vomissements importants et une hypoglycémie pouvant être mortelle. L'intoxication provient de l'ingestion de fruits d'akée (*Blighia sapida*) et en particulier d'hypoglycine A (présente dans le fruit) qui est métabolisée en acide méthylène-cyclopropyl-acétique (MCPA). Le MCPA forme avec le CoA et la carnitine, des esters non métabolisables. En conséquence la carnitine et le coenzyme A se trouvent mobilisés et ne sont plus disponibles pour la β -oxydation des AG, avec pour conséquence un profil biochimique identique à un déficit en ETF ou en ETF-QO.

- Traitements médicamenteux

Lors de certains traitements médicamenteux, on peut retrouver secondairement un déficit en carnitine, le ou les mécanisme(s) en cause étant spécifique(s) pour chaque médicament. Voici quelques exemples :

- Exemple de traitement chronique par le valproate [41]

L'acide valproïque est une molécule largement utilisée en tant qu'antiépileptique. Il s'agit d'un AG à chaîne ramifiée à 8 atomes de carbone.

Au sein de l'organisme, l'acide valproïque est majoritairement métabolisé via la β -oxydation. Il va donc se former de la valproylcarnitine, mais également d'autres acylcarnitines (3-hydroxyisovalérylcarnitine, 2-propylglutarylcarnitine) en quantité plus importante et qui pourrait être à l'origine d'une déplétion en carnitine totale. Par ailleurs, l'acide valproïque pourrait inhiber la synthèse de carnitine. Il a également été décrit une inhibition du transporteur de la carnitine (OCTN2) [41].

Ainsi, de part ces différents mécanismes, le traitement par acide valproïque au long cours peut engendrer un déficit secondaire en carnitine, avec des conséquences non négligeables sur le métabolisme :

- Une baisse du transport des AG à longue chaîne au sein de la mitochondrie est observée et donc de leur β -oxydation, entraînant une diminution de la production d'ATP et d'acétyl-CoA.

- Par ailleurs, l'oxydation microsomale de l'acide valproïque (conséquence directe de l'inhibition de la β -oxydation induite par l'acide valproïque lui-même), conduit à la formation de Δ^4 -valproate, un métabolite hépatotoxique.

- Enfin, la déplétion en carnitine affecte le cycle de l'urée et peut entraîner une hyperammoniémie, effet indésirable fréquent d'un traitement par acide valproïque. En effet, les réserves d'acétyl-CoA se retrouvent diminuées suite à l'inhibition de la β -oxydation des AG. Or l'acétyl-CoA est nécessaire à la synthèse d'acide N-acétylglutamique, activateur de la carbamylphosphate synthétase 1, enzyme du cycle de l'urée.

- Exemple de traitement par la zidovudine [42]

Le traitement par zidovudine (AZT) chez les patients atteints du VIH peut induire une diminution du taux de carnitine plasmatique. Concernant le mécanisme impliqué, il semblerait que l'AZT inhibe de façon non compétitive le transporteur de la carnitine au niveau de la membrane plasmique l'empêchant ainsi d'assurer son rôle au sein de la mitochondrie.

D'autres médicaments entraînant un déficit en carnitine ont été décrits : certains antibiotiques (pivampicilline [43, 31]), certains anticancéreux (adriamycine, ifosfamide, cisplatine, taxol...) [44]....

2.1.2.3 Erreurs innées du métabolisme (cf paragraphe 2.2)

2.2 Erreurs innées du métabolisme

2.2.1 Anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras

La voie métabolique de la β -oxydation mitochondriale comporte au moins 25 enzymes et transporteurs protéiques spécifiques. Le premier déficit décrit par Di Mauro date de 1973 : il s'agissait d'un déficit en CPTII [10]. Il a fallu attendre une dizaine d'années avant la description d'un second déficit, celui de la MCAD au début des années 1980 [45, 46]. Depuis, les connaissances ont progressé considérablement et actuellement on dénombre 18 déficits décrits affectant directement ou indirectement la β -oxydation des AG [47]. Ce groupe de maladies est désormais reconnu comme étant une cause importante de décompensation métabolique aigüe et de mort subite dans la période néonatale et la petite enfance.

Les déficits de la β -oxydation mitochondriale des AG constituent un groupe de maladies cliniquement et biochimiquement hétérogènes [48].

La symptomatologie clinique de ces maladies est variée et peut se présenter suivant les individus de façon aléatoire, isolée ou avec plusieurs symptômes en simultané. Ils peuvent être provoqués par un jeûne prolongé, un exercice physique, une infection, une exposition au froid ou encore un régime riche en graisses [47]. Chez les enfants particulièrement, ils

peuvent survenir au cours d'une infection virale mineure lorsqu'ils se nourrissent moins bien et qu'ils commencent à jeûner. De plus les signes de ces déficits ne sont pas persistants et le patient peut être asymptomatique entre deux crises métaboliques. En général, les symptômes sont associés à un déficit énergétique des tissus utilisant la β -oxydation des AG comme principale source d'énergie : cœur, foie, muscles [49]; ces symptômes sont également liés à l'accumulation secondaire toxique de métabolites intermédiaires et au déficit en carnitine engendré. La clinique est variée et peut être associée à des complications telles qu'une encéphalopathie hépatique, une myopathie, une cardiomyopathie, une neuropathie voire une mort subite.

Le plus souvent ces signes sont accompagnés biochimiquement d'une hypoglycémie hypocétosique (ou cétose moyenne) probablement causée par un déficit en glycogène hépatique et une néoglucogenèse altérée. Une acidose métabolique avec ou sans hyperammoniémie peut également être retrouvée. L'hyperammoniémie étant la conséquence d'un dysfonctionnement secondaire du cycle de l'urée causé par la disponibilité limitée de N-acétylglutamate et d'acétyl-CoA. [47]. La β -oxydation étant bloquée, les AG qui s'accumulent sont dégradés via l' ω -oxydation microsomale qui conduit à la production en quantité importante d'acides dicarboxyliques caractéristiques de certains déficits [48]. Un déficit secondaire en carnitine (sauf pour le déficit en CPTI) est également retrouvé, lié à l'élimination de l'excès d'AG sous forme d'acylcarnitines. La **Figure 9** présente les différents acylcarnitines potentiellement présents en cas d'anomalie de la β -oxydation et leur abréviation.

Acylcarnitine species		Acylcarnitine species	
C0	Free carnitine	C12	Dodecanoyl-
C2	Acetyl-	C6-DC	3-Methylglutaryl-
C3	Propionyl-	C12-OH	3-Hydroxy dodecanoyl-
		C14:2	Tetradecadienoyl-
C4	Butyryl-/ Isobutyryl-	C14:1	Tetradecenoyl-
C5:1	Tiglyl-	C14	Myristoyl-
C5	Isovaleryl-/ 2-Methylbutyryl-/ Pivaloyl-	C14-OH	3-Hydroxy tetradecanoyl-
C4-OH	3-Hydroxy butyryl-	C16	Palmitoyl-
C6:1	3-Methylglutaconyl-		
C6	Hexanoyl-	C16:1-OH	3-Hydroxy hexadecenoyl-
C5-OH	3-Hydroxy isovaleryl-	C16-OH	3-Hydroxy hexadecanoyl-
	2-Methyl 3-hydroxy butyryl-	C18:2	Linoleyl-
C7	Heptanoyl-	C18:1	Oleyl-
C8	Octanoyl-		
C3-DC	Malonyl-	C18	Stearoyl-
C8-OH	3-Hydroxy octanoyl-	C18:1-OH	3-Hydroxy oleoyl-
C10:2	Decadienoyl-	C18-OH	3-Hydroxy stearoyl-
C10:1	Decenoyl-		
C10	Decanoyl-		
C4-DC	Methylmalonyl-/succinyl		
C5-DC	Glutaryl-		
C10-OH	3-Hydroxy decanoyl-		

Figure 9: Les différents acylcarnitines, d'après Matern [50]

Les différents acylcarnitines et leur abréviation associée sont indiqués.

Ces déficits sont individuellement rares (~ 1/10 000 à 1/1 000 000), mais collectivement plus communs du fait du grand nombre d'enzymes différentes affectées. Leur transmission est typiquement autosomique récessive. La mortalité liée à ces déficits peut être importante s'ils

sont sous-diagnostiqués puisque certains enfants décèdent au cours du premier épisode et d'autres souffrent de séquelles neurologiques irréversibles.

Les anomalies de la β -oxydation des AG peuvent être séparées en deux groupes : les déficits du cycle de la carnitine et les déficits de la β -oxydation proprement dite. La **Figure 10** présente une vue d'ensemble de ces différents déficits que nous allons voir en détails.

Deficiency	Protein (abbreviation)	Defect described	Molecular defect resolved
<u>Cellular uptake of carnitine and fatty acids</u>			
Plasma membrane carnitine transporter	OCTN2	1975	1998
Long-chain fatty acid transporter	?	1998	–
<u>Mitochondrial carnitine cycle</u>			
Carnitine palmitoyltransferase 1 (liver form)	CPT1A	1981	1998
Carnitine acylcarnitine translocase	CACT	1992	1997
Carnitine palmitoyltransferase 2	CPT2	1973	1992
<u>Mitochondrial beta-oxidation system</u>			
Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase	VLCAD	1993	1995
Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	MCAD	1982	1990
Short-chain acyl-CoA dehydrogenase	SCAD	1984	1990
Isolated long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	LCHAD	1989	1994
Isolated long-chain 3-ketothiolase	LCKAT	2006	2006
Complete mitochondrial trifunctional protein	LCHAD	1992	1995
	LCKAT	1992	1995
Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	SCHAD	2001	2001
Medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase	MCKAT	1997	–
ETF dehydrogenase	ETFDH	1985	1993
ETF-alpha	ETF α	1986	1991
ETF-beta	ETF β	1991	1994
2,4-dienoyl-CoA reductase	DECR1	1990	–

Figure 10: Caractéristiques des déficits de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (d'après Wanders, [51])

Pour chaque déficit, l'abréviation de l'enzyme ou du transporteur, l'année de la première description ainsi que l'année de découverte moléculaire sont décrites.

2.2.1.1 Anomalies du cycle de la carnitine

- Déficit en Carnitine-Palmitoyl Transferase I (CPTI) (OMIM 600528)

Il existe plusieurs isoformes de la carnitine palmitoyltransférase I [52]:

- CPTIA ou L-CPTI : isoforme retrouvé dans le foie, les reins, les lymphocytes et fibroblastes
- CPTIB ou M-CPTI : isoforme retrouvé dans le muscle squelettique essentiellement
- le CPTIC : isoforme retrouvé exclusivement dans le cerveau

Actuellement, seuls des déficits en L-CPTI (CPTIA) ont été rapportés. Ce déficit a été décrit pour la première fois en 1981 par Bougnères [53] et seuls une trentaine de cas ont été publiés [54]. Cliniquement, les signes sont le reflet de la localisation tissulaire de l'isoforme. Ils apparaissent en période néonatale ou dans la petite enfance. Une encéphalopathie hépatique (de type syndrome de Reye) associée à une hypoglycémie hypocétosique ou une hépatomégalie associée ou non à une défaillance hépatique et des attaques hypoglycémiques sont essentiellement retrouvées [52]. Une hyperammoniémie peut également être présente. Chez certains patients, une acidose tubulaire rénale a été décrite [55]. L'élément le plus caractéristique de ce déficit, est le taux de carnitine plasmatique libre presque toujours élevé. Une diminution des acylcarnitines à chaîne longue associée à une augmentation des acylcarnitines à chaîne courte au niveau du plasma est également présente [56].

- Déficit en Carnitine-Palmitoyl Transferase II (CPTII) (OMIM 600650)

Contrairement à la CPTI, il n'existe qu'un seul isoforme pour la CPTII. Le premier déficit en CPTII a été rapporté par DiMauro en 1973 [10]. Ce déficit fait partie des déficits les plus communs de la β -oxydation des AG avec plus de trois cent cas publiés [57]. La présentation clinique de ce déficit peut se décliner sous trois phénotypes différents :

- une forme adulte (la plus courante): il s'agit d'une forme modérée dont la symptomatologie est essentiellement musculaire (myalgie, faiblesse musculaire, courbatures) et souvent déclenchée par l'exercice prolongé voire le jeûne, les températures extrêmes ou le stress. Ce déficit est la cause métabolique la plus commune de rhabdomyolyse chez l'adulte. Parfois la rhabdomyolyse peut se compliquer par une insuffisance rénale aiguë, une insuffisance respiratoire ou une atteinte cardiaque. Entre deux épisodes, les patients sont asymptomatiques.

- une forme infantile (apparaissant entre 6 mois et 2 ans) : il s'agit d'une forme intermédiaire caractérisée par une atteinte hépatique, une hépatomégalie transitoire ou une hypoglycémie hypocétosique généralement causée par un jeûne ou une infection. On peut également retrouver une atteinte cardiaque (cardiomyopathie, troubles du rythme).

- une forme néonatale : il s'agit de la forme la plus sévère, le plus souvent létale [58], les patients présentent en général une hypoglycémie hypocétosique, une hépatomégalie, des troubles respiratoires, une cardiomégalie associée à des troubles du rythme et de la conduction.

Biochimiquement, on retrouve une acidose métabolique et une hyperammoniémie durant les crises pour la forme néonatale et la forme infantile. Pour la forme adulte, on retrouve une élévation des taux de créatine kinase et de transaminases. De façon quasi-constante : un abaissement de carnitine libre et totale et une augmentation des acylcarnitines à longue chaîne (**Figure 11**) sont retrouvés dans le plasma [52, 59].

- Déficit en Carnitine/Acylcarnitine Translocase (CACT) (OMIM 613698)

La CACT est nécessaire pour le transport de tous les AG de C10 à C24. Le premier cas de déficit en CACT a été décrit par Stanley *et al* en 1992 [60]. Ce déficit était extrêmement rare, mais le programme de dépistage néonatal de certains pays a permis de diagnostiquer un certain nombre de cas [61].

Cliniquement, la plupart des patients présentent les premiers symptômes en période néonatale. On retrouve des épisodes d'hypoglycémie, une cardiomyopathie, une arythmie cardiaque, une apnée ; l'accumulation d'épisodes entraînant des dommages neurologiques, cardiaques et hépatiques. L'issue est le plus souvent fatale. Des formes d'apparition plus tardives ont été décrites, se traduisant par des crises d'hypoglycémie de jeûne [48].

Biochimiquement, ces patients présentent une hyperammoniémie, une hypoglycémie hypocétosique, mais également une élévation des taux de créatine kinase et de transaminases. Le taux de carnitine libre est bas et on retrouve une élévation des acylcarnitines à chaîne longue (**Figure 11**) au niveau du plasma. Ce profil anormal est le même que celui de la forme néonatale du déficit en CPTII, une mesure de l'activité enzymatique de la CACT est nécessaire pour confirmer le diagnostic [56].

2.2.1.2 Anomalies du cycle de la β -oxydation

- Déficit en Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD)
(OMIM 609575)

Le premier diagnostic correct de ce déficit date de 1993 [62, 63]. En effet, ce déficit a été originellement rapporté comme un déficit en LCAD avant que l'on démontre l'existence de deux enzymes différentes capables d'agir sur les AG à longue chaîne: la LCAD et la VLCAD. Des déficits en VLCAD ont essentiellement été rapportés jusqu'à aujourd'hui. Ce déficit fait partie de certains programmes de dépistage néonatal. Plus d'une centaine de cas ont été rapportés [64].

Cliniquement, on peut retrouver trois phénotypes majeurs. Tout d'abord, une forme néonatale sévère avec apparition précoce, une forte incidence de cardiomyopathie et un haut taux de mortalité ; ensuite une forme infantile intermédiaire caractérisée généralement par des hypoglycémies hypocétosiques, rarement des cardiomyopathies et un taux de mortalité plus faible ; enfin une forme adulte caractérisée par des rhabdomyolyses et une myoglobulinurie.

Biochimiquement, les acylcarnitines à chaîne longue s'accumulent (**Figure 11**) avec la tetradécénoylcarnitine (C14 :1) comme acylcarnitine prépondérante. Une corrélation génotype/phénotype existe pour ce déficit [59, 65].

- Déficit en Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD)
(OMIM 607008)

Il s'agit du déficit le plus commun de la β -oxydation des AG dont la prévalence est estimée entre 1/10 000 et 1/27 000 naissances dans les pays caucasiens [66]. La première description de la maladie date de 1976 par l'équipe de Gregersen [67] et sa caractérisation date du début des années 1980.

La présentation clinique de la maladie est essentiellement hépatique et très proche du déficit en CPTIA. Les patients atteints sont asymptomatiques jusqu'à un épisode de jeûne prolongé souvent associé à une infection virale. La première crise est fatale dans plus de 20% des cas et peut apparaître dès le premier jour de vie et jusqu'à l'âge d'environ 6 ans. Classiquement une hypoglycémie hypocétosique est retrouvée. Les autres signes retrouvés

sont une léthargie, des nausées, une encéphalopathie, une hépatomégalie et peuvent aller jusqu'à un arrêt cardio-respiratoire. Des cas chez l'adolescent et l'adulte ont également été rapportés.

Au niveau biologique, on retrouve une hypoglycémie hypocétosique, une acidose métabolique une hyperammoniémie, une augmentation des transaminases au moment de la crise. Des taux élevés de suberylglycine, de phénylpropionylglycine et d'hexanoylglycine sont typiquement retrouvés dans les urines. Le taux de carnitine libre et total peut être normal ou bas. Une augmentation des acylcarnitines à chaîne moyenne est observée (**Figure 11**) [59, 68]. Le dépistage néonatal de cette maladie est déjà en place dans de nombreux pays (onze pays européens, Canada, Australie, Etats-Unis...) [2].

- Déficit en Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD) (OMIM 606885)

Le premier déficit en SCAD a été décrit en 1987 par l'équipe d'Amendt [69]. Les patients présentent des symptômes avant l'âge de 5 ans majoritairement. Cliniquement sont retrouvés : un retard de développement, une hypotonie, une épilepsie, des troubles du comportement et une hypoglycémie. En général les signes et symptômes s'améliorent au cours du suivi. Ces données remettent en question l'intérêt clinique d'une telle pathologie et restent actuellement sans réponse.

Sur le bilan biologique, une accumulation de butyrylcarnitine (C4) au niveau du plasma et une élévation de l'acide éthylmalonique, de l'acide méthylsuccinique et éventuellement la présence de butyrylglycine au niveau des urines sont retrouvées. Le dépistage de ce déficit fait partie de certains programmes de dépistage néonatal mais l'intérêt de celui-ci reste à préciser [70].

- Déficit en Long Chain 3 Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD) / protéine trifonctionnelle (TFP)

La protéine trifonctionnelle (TFP) est un complexe enzymatique octamérique présentant quatre sous-unités α (OMIM 600890) et quatre sous unités β (OMIM 143450). Elle regroupe trois activités enzymatiques qui agissent sur les chaînes longues : l'énoyl-CoA hydratase et la LCHAD au niveau de la sous unité α et la LKAT au niveau de la sous unité β .

Deux déficits de ce complexe ont été décrits : un déficit isolé en LCHAD et un déficit affectant les trois activités enzymatiques (TFP). Le déficit isolé en LCHAD est beaucoup plus commun (au moins soixante cas décrits) [72] que celui de la TFP.

Le premier déficit avéré en LCHAD a été rapporté par l'équipe de Wanders en 1989 [73]. Cliniquement, les symptômes se présentent dans les premières années de vie, et se traduisent par une encéphalopathie associée à une hypoglycémie hypocétosique. La majorité des cas décèdent. Une forme moins sévère retrouve une hypoglycémie hypocétosique, des vomissements, une hypotonie, une hépatomégalie. On retrouve en particulier une rétinite pigmentaire ou une neuropathie périphérique suggérant un effet toxique des métabolites accumulés. Les femmes enceintes porteuses d'un enfant déficitaire en LCHAD présentent une incidence plus élevée d'HELLP syndrome (Hemolytic anemia, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count). Biochimiquement, on retrouve une hypoglycémie, une élévation de la créatine kinase et des transaminases. On note une élévation des 3-hydroxyacylcarnitines (C14, C16, C18) au niveau plasmatique et des acides 3-hydroxydicarboxyliques au niveau des urines [48, 59].

Le déficit en TFP, quant à lui, a été décrit en 1992 [74]. Sa présentation clinique se rapproche très nettement du déficit en LCHAD mais a tendance à être un peu plus sévère. Le bilan biologique est lui aussi similaire [59].

- Déficit en Medium/Short Chain 3 Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase M/SCHAD (OMIM 601609)

La première description de ce déficit date de 1996 [71]. Au départ ce déficit était présenté comme un déficit en SCHAD uniquement. En réalité, l'enzyme est également capable d'agir sur les chaînes moyennes. Peu de cas ont actuellement été rapportés mais la majorité se présente avec une symptomatologie dominée par des hypoglycémies hypocétosiques associées à un hyperinsulinisme.

Sur le plan biochimique, on note une élévation de l'acide 3-hydroxyglutarique dans les urines et une élévation de la 3-hydroxybutyrylcarnitine (C4-OH) au niveau du plasma [25, 48].

- Déficit en Electron Transfer Flavoprotein / Electron Transfer Flavoprotein ubiQuinone Oxydoreductase (ETF/ETF-QO) ou Déficit Multiple en Acyl-CoA Dehydrogenase (MADD) ou Acidurie Glutarique de type 2

Ce déficit se traduit par la réduction ou l'absence d'activité de l'un des deux transporteurs d'électrons avec pour conséquence un dysfonctionnement de l'activité enzymatique de sept acyl-CoA déshydrogénases et de deux *n*-méthyl-déshydrogénases (attention : l'activité de ces enzymes est normale quand on les mesure !). Par conséquent ce déficit affecte non seulement la β -oxydation des AG (car les acyl-CoA déshydrogénases touchées sont la VLCAD, LCAD, MCAD, SCAD) mais aussi le catabolisme de certains acides aminés ramifiés, de la lysine, de l'acide 2-hydroxyglutarique et de la sarcosine. Le déficit moléculaire fondamental touche le transport des électrons entre les acyl-CoA et l'ubiquinone au niveau de la chaîne de transport des électrons mitochondriale. Ainsi le déficit touche soit l'ETF (ETF-A : OMIM 608053 ; ETF-B : OMIM 130410), soit l'ETF-QO (OMIM 231675) mais il ne semble pas y avoir de différence entre les phénotypes cliniques.

La première description de ce déficit date de 1976 [75]. Les patients peuvent présenter trois types de phénotypes. Tout d'abord un phénotype avec apparition néonatale et anomalies congénitales : prématurés, hypoglycémie hypocétosique, acidose métabolique sévère, dysplasie des reins, dysmorphie faciale sont les principaux signes retrouvés avec un décès dans la première semaine de vie. Ensuite un phénotype d'apparition néonatale mais sans anomalies congénitales est possible: on retrouve les mêmes signes cliniques mais sans les anomalies congénitales graves, cela permet aux patients de survivre à la première semaine de vie, mais ils décèdent souvent d'une décompensation métabolique grave ou d'une cardiomyopathie. Enfin, il existe un phénotype d'apparition tardive (forme intermédiaire) : la présentation est hétérogène, on peut retrouver dans les premiers mois de vie des épisodes intermittents de vomissements, une acidose métabolique, une hypoglycémie hypocétosique, ou à l'âge adulte un pseudo-syndrome de Reye aigu et une myopathie proximale [59].

Le bilan biologique retrouve une augmentation de glutarylcarnitine (C5-DC), des acylcarnitines de toute longueur de chaîne, saturées et insaturées au niveau plasmatique et au niveau urinaire, une excrétion massive d'acide glutarique, des acides dicarboxyliques (C5-C10) et de nombreuses glycines (hexanoylglycine en particulier) [76].

Ainsi, chaque pathologie présente un profil d'acylcarnitines particulier. La **figure 11** synthétise ces différents profils.

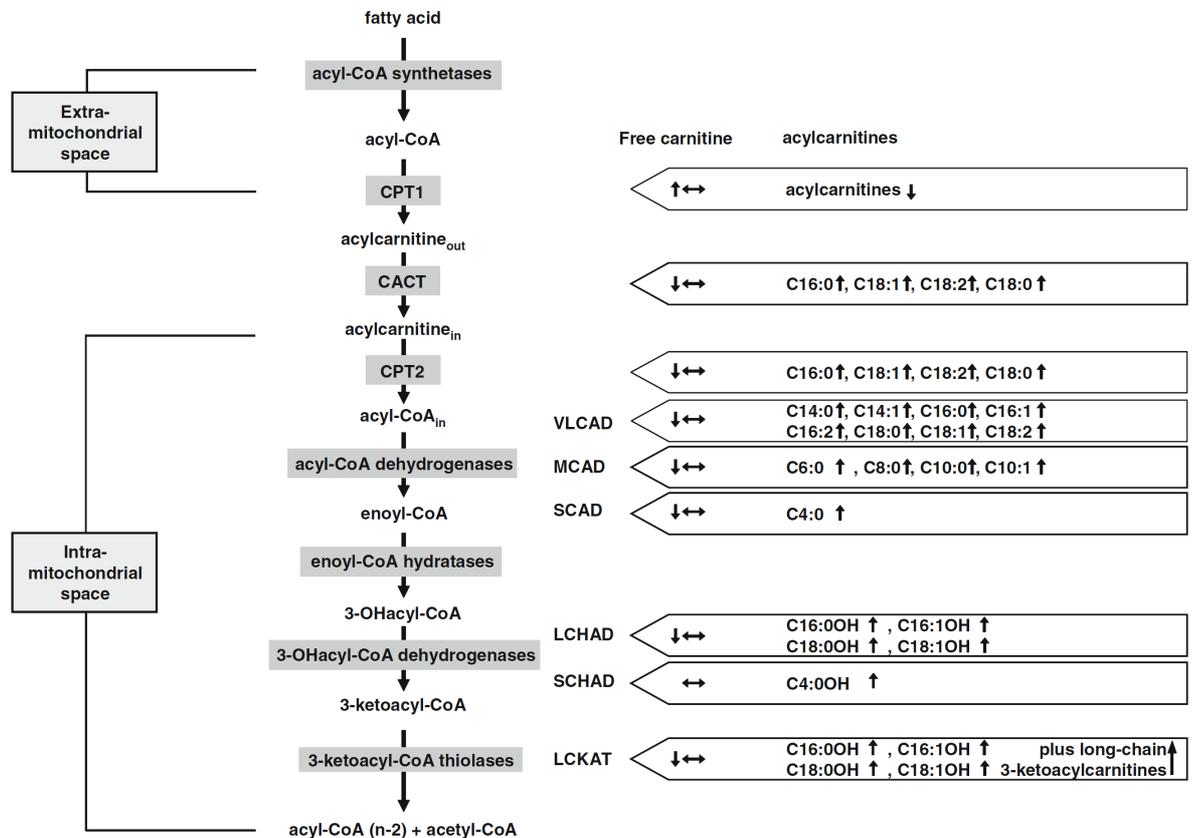


Figure 11: Vue d'ensemble des différentes anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras et acylcarnitines plasmatiques anormales associées (d'après Wanders

[51]

Ces dernières années, un certain nombre de ces pathologies a été inclus dans les programmes de dépistage néonatal. (**Figure 12**)

Disorder	USA	D	A	CH	NL	B	DK	GB	AUS
CTD	+ ¹	-	+	-	-	+	+	-	+
CPT I	+ ²	+	+	-	-	+	+	-	+
CPT II	+ ²	+	+	-	-	-	+	-	+
CACT	+ ²	+	+	-	-	+	+	-	+
VLCAD	+ ¹	+	+	-	+	+	+	-	+
LCHAD	+ ¹	+	+	-	+	+	+	-	+
mTFP	+ ¹	(+)	+	-	(+)	+	+	-	+
DE-RED	+ ²	-	-	-	-	-	-	-	-
MCAD	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
MCKAT	+ ²	(+)	+	(+)	(+)	+	+	(+)	+
SCAD	+ ²	-	+	-	-	+	-	-	+
M/SCHAD	+ ²	(+)							

Figure 12: Anomalies de la β -oxydation des AG inclus dans les programmes de dépistage néonatal de différents pays (d'après Lindner, [77])

+ Maladies incluses dans le programme officiel de dépistage néonatal (1 cible primaire, 2 cible secondaire)

(+) Maladies exclues d'un programme mais tout de même détectées (pour le diagnostic différentiel des maladies recherchées)

A Autriche, **AUS** Australie, **B** Belgique, **CH** Suisse, **D** Allemagne, **DK** Danemark, **GB** Grande Bretagne, **NL** Pays-Bas, **USA** Etats-Unis

MCAD Déficit en medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, **VLCAD** Déficit en very-long chain acyl-CoA dehydrogenase, **LCHAD/mTFP** Déficit en long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase/protéine mitochondriale trifonctionnelle, **CTD** Déficit en transporteur de la carnitine, **SCAD** Déficit en short-chain acyl-CoA dehydrogenase, **CPT I** Déficit en carnitine palmitoyltransferase-1, **CPT II** Déficit en carnitine palmitoyltransferase-2, **CACT** Déficit en carnitine acylcarnitine translocase, **MAD-GA II** Déficit en multiple acyl-CoA dehydrogenase/acidurie glutarique de type II, **MCKAT** Déficit en medium-chain ketothiolase, **M/SCHAD** Déficit en medium-/short-chain 3-OH-acyl-CoA dehydrogenase, **DE-RED** Déficit en dienoyl-CoA reductase.

2.2.1.3 Traitement des anomalies de la β -oxydation

Le traitement de l'ensemble de ces pathologies est sensiblement le même à quelques exceptions près. En effet, il est basé en première intention sur un traitement non spécifique.

En cas de décompensation aiguë, le traitement repose sur l'administration par voie injectable de glucose (10 mg/kg/min) dont l'objectif est de stimuler la sécrétion d'insuline à des taux suffisants pour inhiber l'oxydation des AG dans le foie et les muscles. On pourra également administrer de l'insuline si nécessaire (pour limiter le risque d'acidose lactique en cas de glycémie trop élevée).

Le traitement à long terme quant à lui repose essentiellement sur la prévention de périodes de jeûne prolongé (>8-12H). En cas d'infection, lorsque l'appétit diminue, un régime

particulier doit être instauré. Chez les patients dont le déficit est très sévère, une nutrition nocturne continue par sonde naso-gastrique peut être mise en place. Certains auteurs recommandent également de restreindre l'apport en graisses, notamment pour les patients avec un déficit sévère [26]. Mais dans les déficits prouvés de la β -oxydation des AG à longue chaîne, on peut supplémenter les patients avec des triglycérides à chaîne moyenne.

Il est possible par ailleurs donner de la riboflavine (100 mg/j) aux patients déficitaires en ETF/ETF-QO puisqu'il s'agit du cofacteur de ces enzymes [26].

2.2.2 Aciduries organiques

2.2.2.1 Définition

Les aciduries organiques sont des pathologies du métabolisme intermédiaire à transmission autosomique récessive. On les classe en deux groupes : les aciduries organiques classiques et les aciduries organiques cérébrales.

Pour la plupart de ces déficits, la carnitine va se comporter comme un épurateur des composés toxiques intermédiaires non métabolisés et éliminer ceux-ci sous forme d'acylcarnitines dans les urines. On retrouvera ainsi des taux effondrés de carnitine libre.

2.2.2.2 Les aciduries organiques classiques

Parmi les aciduries organiques classiques, les plus importantes sont dues à des anomalies impliquant le métabolisme des acides aminés ramifiés : acidurie propionique, méthylmalonique et isovalérique. On retrouve également, le déficit en 3-cétothiolase (nécessaire au métabolisme de l'isoleucine mais également à la cétolyse) et le déficit en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase (HMG-CoA Lyase) (nécessaire au métabolisme de la leucine mais également à la cétogénèse) (**Figure 13**).

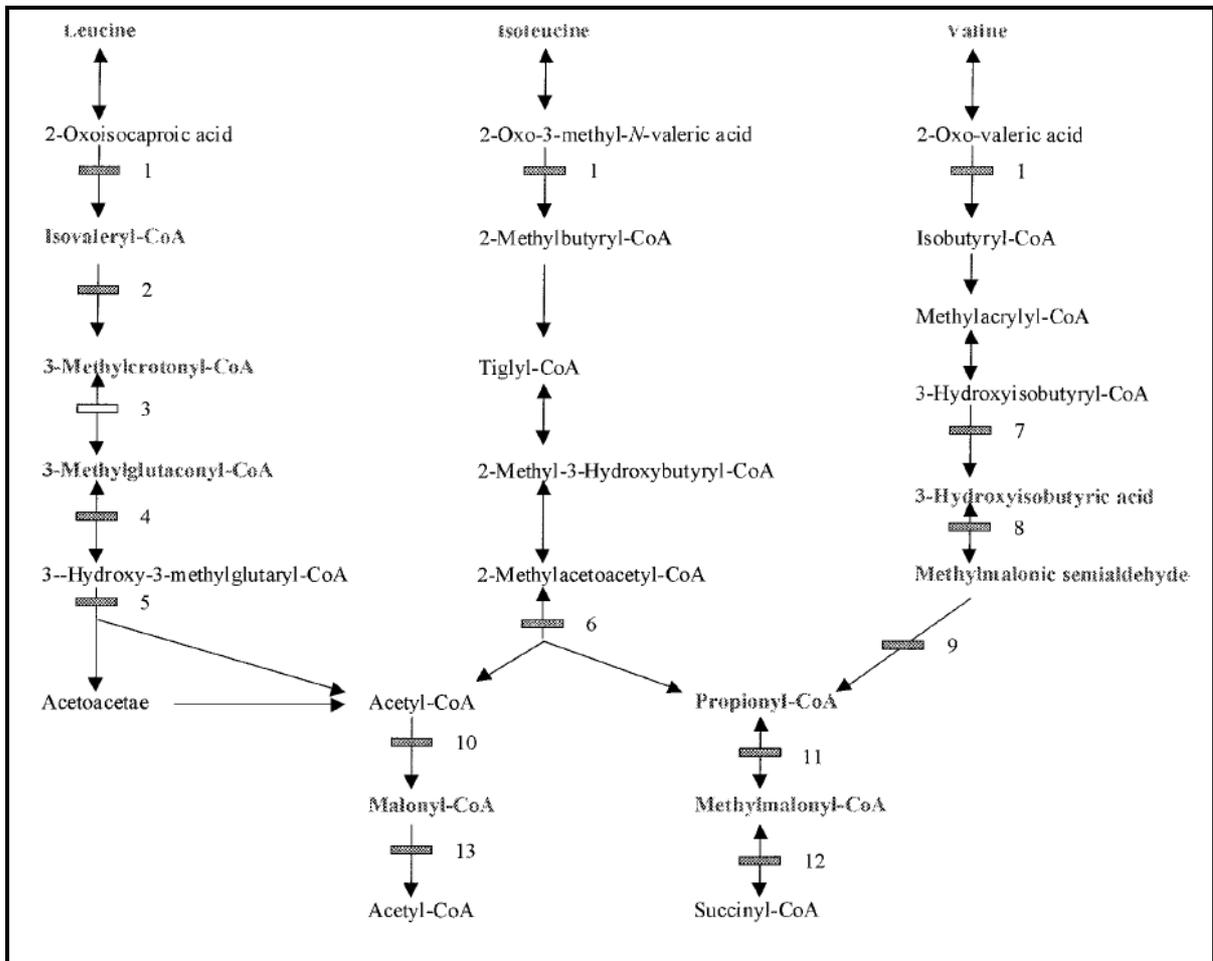


Figure 13: Schéma métabolique du catabolisme des acides aminés ramifiés (d'après Ogier de Baulny,[78])

(1) **BCKDH** : Branched Chain α -oxoacid Dehydrogenase; (2) **IVD** : Isovaleryl-CoA Dehydrogenase; (3) **MCC** : 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase ; (4) 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase ; (5) **HMG-CoA lyase** : 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase ; (6) 3-Cetothiolase ; (7) 3-Hydroxyisobutyryl-CoA Deacylase ; (8) 3-Hydroxyisobutyric Dehydrogenase ; (9) Methylmalonylsemialdehyde Dehydrogenase ; (10) Acetyl-CoA Carboxylase (dans la mitochondrie) ; (11) **PCC** : Propionyl-CoA Carboxylase ; (12) **MCM** : Methylmalonyl-CoA Mutase ; (13) Malonyl-CoA Decarboxylase

Cliniquement, on retrouve plusieurs phénotypes. Tout d'abord, une présentation néonatale se traduisant par une encéphalopathie métabolique de type « intoxication » après un intervalle libre : on retrouve une léthargie, des difficultés alimentaires, une déshydratation, une hypotonie axiale couplée à une hypertonie segmentaire, des myoclonies, des troubles neuro-végétatifs, tout ceci pouvant conduire à la formation d'un œdème cérébral, au coma et à une défaillance multi viscérale. On retrouve ensuite une forme chronique intermittente (pouvant apparaître jusqu'à l'âge adulte) caractérisée par des épisodes récurrents de coma acido-cétosique, une léthargie, une ataxie, des signes neurologiques focaux, une obnubilation,

pouvant entraîner le coma. Enfin, il existe une forme chronique progressive pour laquelle on retrouve un retard de croissance, des vomissements chroniques, une anorexie, une ostéoporose, une hypotonie, un retard psychomoteur et des infections récurrentes. La clinique du déficit en 3-cétothiolase est dominée par des épisodes aigus de nausées et vomissements pouvant évoluer vers le coma et l'apparition de séquelles neurologiques [79].

Biochimiquement, on retrouve des signes non spécifiques tels qu'une acido-cétose, une augmentation des lactates et de l'ammoniac (car défaut de synthèse de l'urée liée à un déficit en acétyl-CoA (requis pour la synthèse de N-acétylglutamate) et inhibition de la N-acétylglutamate synthétase (NAGS) par les acides organiques [80]. Concernant le déficit en HMG-CoA-lyase, on retrouve une hypoglycémie hypocétosique, une acidose métabolique et une atteinte hépatique.

Le diagnostic différentiel de ces aciduries organiques est basé d'une part sur le profil des acides organiques urinaires, et d'autre part sur le profil des acylcarnitines plasmatiques. Voici les acylcarnitines retrouvées pour chaque déficit [78, 81] :

- acidurie isovalérique : isovalérylcarnitine (C5)
- acidurie propionique : propionylcarnitine (C3)
- acidurie méthylmalonique : propionylcarnitine (C3), méthylmalonylcarnitine (C4-DC)
- déficit en 3-cétothiolase : tiglylcarnitine (C5 :1) et 2-méthyl-3-hydroxybutyrylcarnitine (C5-OH)
- déficit en HMG-CoA-lyase : 3-hydroxy-isovalérylcarnitine (C5-OH) et méthylglutarylcarnitine (C6-DC)

2.2.2.3 Les aciduries organiques cérébrales

Certaines aciduries organiques présentent des signes évocateurs d'une encéphalopathie mais sans anomalie du bilan biologique de base.

Parmi celles-ci, on retrouve l'acidurie glutarique de type I, il s'agit d'un déficit en glutaryl-CoA déshydrogénase, enzyme impliquée dans le métabolisme du tryptophane, de la lysine et de l'hydroxy-lysine (**Figure 14**).

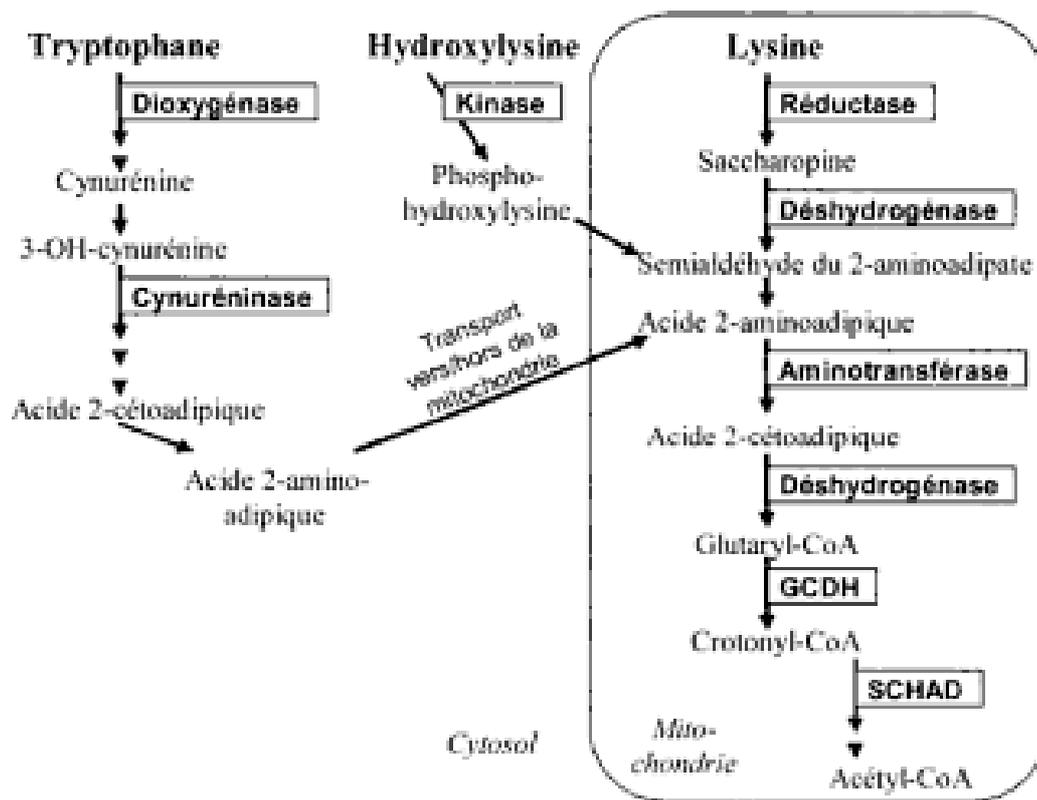


Figure 14: Schéma métabolique du catabolisme du tryptophane, de la lysine et de l'hydroxylysine (d'après [82])

La lysine est entièrement métabolisée dans la mitochondrie

GCDH : Glutaryl-CoA Dehydrogenase ; **SCHAD** : Short Chain Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase

Cliniquement les patients atteints développent une atteinte neurologique entre 3 et 36 mois suivi d'un épisode d'encéphalopathie (souvent provoqué par une infection par exemple). Les séquelles caractéristiques sont une destruction du striatum avec pour conséquence l'apparition d'une dystonie ou d'une dyskinésie sévères.

Biochimiquement, le diagnostic de cette pathologie se base sur le profil des acides organiques urinaires (acide glutarique, acide 3-hydroxy-glutarique) et sur la présence de glutarylcarnitine (C5-DC) sur le profil des acylcarnitines plasmatiques [83].

2.2.2.4 Traitement des aciduries organiques

Le traitement d'urgence (en cas de décompensation aiguë) a pour but de lutter contre le catabolisme des acides aminés par des apports en intraveineux de glucose à forte dose. L'acidose est traitée (par réhydratation ou administration de bicarbonates si besoin), les toxiques sont épurés (si nécessaire), les apports protéiques sont arrêtés provisoirement (48H) et de la carnitine est administrée pour favoriser le métabolisme mitochondrial et améliorer l'épuration des composés toxiques. [78].

Le traitement au long cours repose sur un régime pauvre en acides aminés dont le métabolisme est déficitaire, à savoir leucine, isoleucine et valine pour les aciduries organiques impliquant le métabolisme des acides aminés ramifiés et pauvre en lysine pour l'acidurie glutarique de type I [84] et supplémentation en acides aminés pour lesquels le métabolisme est normal. Enfin, une supplémentation en vitamines, oligo-éléments, minéraux complète le traitement. [26].

D'autres anomalies du métabolisme peuvent également être mise en évidence par le profil des acylcarnitines, comme par exemple les anomalies du métabolisme de la biotine (déficit en biotinidase, carboxylases...) ou encore les anomalies de la biogénèse des peroxysomes [85], mais ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

Chapitre 3 Exploration des erreurs innées du métabolisme : place des acylcarnitines

Le profil des acylcarnitines joue un rôle primordial dans le diagnostic des erreurs innées du métabolisme et en particulier pour le diagnostic des anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG et des aciduries organiques. En effet, la stratégie diagnostique de ces différents déficits se réalise en plusieurs étapes. Après les analyses biochimiques de base (AG libres, corps cétoniques et lactates), le bilan doit comporter une chromatographie des acides organiques urinaires et un profil d'acylcarnitines.

3.1 Analyse des métabolites dans les liquides biologiques

Ces analyses peuvent se réaliser sur les différents fluides biologiques à disposition (urines, sang,...).

3.1.1 Acides organiques urinaires

La méthode de choix est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les composés identifiés par cette technique et indicateurs d'un déficit de la β -oxydation des AG sont les acides dicarboxyliques et les acylglycines [86]. Cependant, toutes les anomalies de la β -oxydation des AG ne sont pas identifiables par la chromatographie des acides organiques urinaires. Dans le cas des aciduries organiques, certaines d'entre elles (acidurie méthylmalonique, acidurie propionique, acidurie isovalérique) présentent un profil typique permettant le diagnostic [78].

3.1.2 Profil des acylcarnitines et dosage de la carnitine totale et liée plasmatiques ou sur sang total

Les acylcarnitines sont des marqueurs importants d'un certain nombre de déficits. L'analyse des acylcarnitines sur sang total (papier buvard) ou sur plasma est un outil diagnostique puissant. En effet la plupart des anomalies de la β -oxydation des AG peut être

différenciée grâce à un profil particulier. La méthode de choix pour réaliser cette analyse est la spectrométrie de masse en tandem, méthode largement utilisée aujourd'hui.

Par ailleurs, il est important d'associer à ce profil un dosage de carnitine totale et libre. En effet, étant donné que les acylcarnitines résultent de la conjugaison des acyl-CoA avec de la carnitine libre, une déplétion en carnitine libre sanguine entraînera alors une diminution de la formation des acylcarnitines et pourra masquer une anomalie métabolique. De plus, pour le déficit en transporteur de la carnitine, le seul marqueur diagnostique est le taux de carnitine libre qui se retrouve effondré sans élévation associée des acylcarnitines [86]. Le déficit en CPT1A se caractérise par un taux normal voire élevé en période aiguë de la carnitine libre, associé à une diminution de toutes les acylcarnitines. Le dosage de la carnitine peut se réaliser par différentes techniques : méthodes radioisotopiques, radioenzymatiques, spectrophotométriques, radioisotopiques couplées à l'HPLC ou spectrométrie de masse en tandem [87].

Cependant, lorsqu'une anomalie métabolique est cliniquement suspectée mais que les profils métaboliques ne permettent pas de conclure (le prélèvement doit être réalisé en phase aiguë et réitéré si nécessaire), des investigations complémentaires sont nécessaires : études *in vitro*, études enzymatiques et biologie moléculaire.

3.2 Etudes de Screening *in vitro*

Les études *in vitro* sont utiles lorsque les analyses préliminaires n'ont pas permis de conclure. L'objectif de ces techniques est de proposer un screening via le profil des acylcarnitines, de certaines anomalies de la β -oxydation des AG et de certaines aciduries organiques en utilisant des mitochondries isolées, des fibroblastes ou des cellules du sang périphérique. Les cellules sont incubées dans un milieu supplémenté en précurseurs, en AG à longue chaîne (non marqués, marqués par des isotopes stables ou radioactifs) et un excès de carnitine libre (marquée ou non). La détection se fait ensuite par radio-HPLC, MS/MS ou GC/MS [86].

3.3 Etudes enzymatiques spécifiques

La mesure de l'activité enzymatique est une analyse possible pour confirmer un déficit. Cette mesure pourra se réaliser sur des fibroblastes, des biopsies tissulaires ou des lymphocytes pour les anomalies de la β -oxydation des AG [86]. L'estimation des activités enzymatiques du cycle de la β -oxydation est compliquée du fait du chevauchement des substrats (longueur de chaîne des AG) des différentes enzymes. Différentes techniques ont été développées pour réaliser le dosage de l'activité enzymatique : méthodes radioisotopiques, méthodes spectrophotométriques, méthodes spectrofluorimétriques, HPLC-UV, MSMS... [51]

3.4 Biologie moléculaire

L'analyse mutationnelle des gènes impliqués peut être réalisée sur l'ADN extrait à partir des leucocytes du sang périphérique, évitant ainsi le besoin d'avoir recours à la biopsie.

Cette étude peut confirmer le diagnostic si les autres tests n'étaient pas concluants. En effet, les gènes de la majorité des enzymes de la β -oxydation des AG ont été isolés et déterminés, rendant l'analyse moléculaire de ces déficits accessible. Cependant l'analyse mutationnelle reste difficile dans beaucoup de cas car il existe de nombreuses mutations d'un même gène pouvant induire une maladie : des mutations privées, des polymorphismes, un haut degré d'hétérogénéité allélique... L'analyse mutationnelle est cependant très utile dans les études familiales ou pour le diagnostic prénatal lorsque la mutation du cas index est connue. Pour certaines anomalies de la β -oxydation, les mutations prévalentes sont connues (MCAD, LCHAD, CPT2) [86].

D'autre part, cette analyse peut également permettre d'établir une corrélation génotype/phénotype existante pour certaines anomalies (déficit en CPTII, en VLCAD, LCHAD/TFP, MAD) [65].

Chapitre 4 La spectrométrie de masse

4.1 Rappel: principe [88, 89]

La spectrométrie de masse permet l'identification des composés d'un mélange complexe après séparation des différentes molécules, puis ionisation, et tri des ions formés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Un spectromètre de masse est composé de plusieurs éléments : une source permettant d'ioniser les composés d'intérêt, un analyseur permettant la séparation des divers ions produits et un détecteur du courant ionique couplé à un système de traitement informatique des données acquises.

Les principales sources utilisées dans le domaine de la biologie sont l'APCI (atmospheric pressure chemical ionisation), l'ESI (electrospray ionisation) et le MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation). L'ESI est plus utilisée pour l'étude de petites molécules en milieu liquide. Elle est produite par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide sortant d'un tube capillaire avec un faible débit (couramment 1 à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de plusieurs kV entre le capillaire et une contre-électrode séparés de 0.3 à 2 cm. Ce champ électrique intense génère une rupture du film liquide en gouttes qui vont se charger. Celles-ci vont diminuer de taille par perte des molécules de solvant qui les entourent et former des gouttelettes de plus en plus petites hautement chargées (spray). La formation du spray est parfois aidée par un flux gazeux de nébulisation situé au niveau du capillaire. L'évaporation des molécules de solvant est facilitée par une élévation de température de la source. L'accumulation de charges entraîne l'explosion des gouttelettes (limite de Rayleigh) qui subissent alors une cascade de fissions aboutissant à la désorption des ions (**Figure 15**). Les ions en phase gazeuse sont alors dirigés dans l'analyseur par une série de lentilles électromagnétiques. Les ions chargés produits sont soit positifs (= ionisation en mode positif), soit négatifs (= ionisation en mode négatif). Le mode d'ionisation sera fonction des molécules analysées et des ions qu'elles pourront produire.

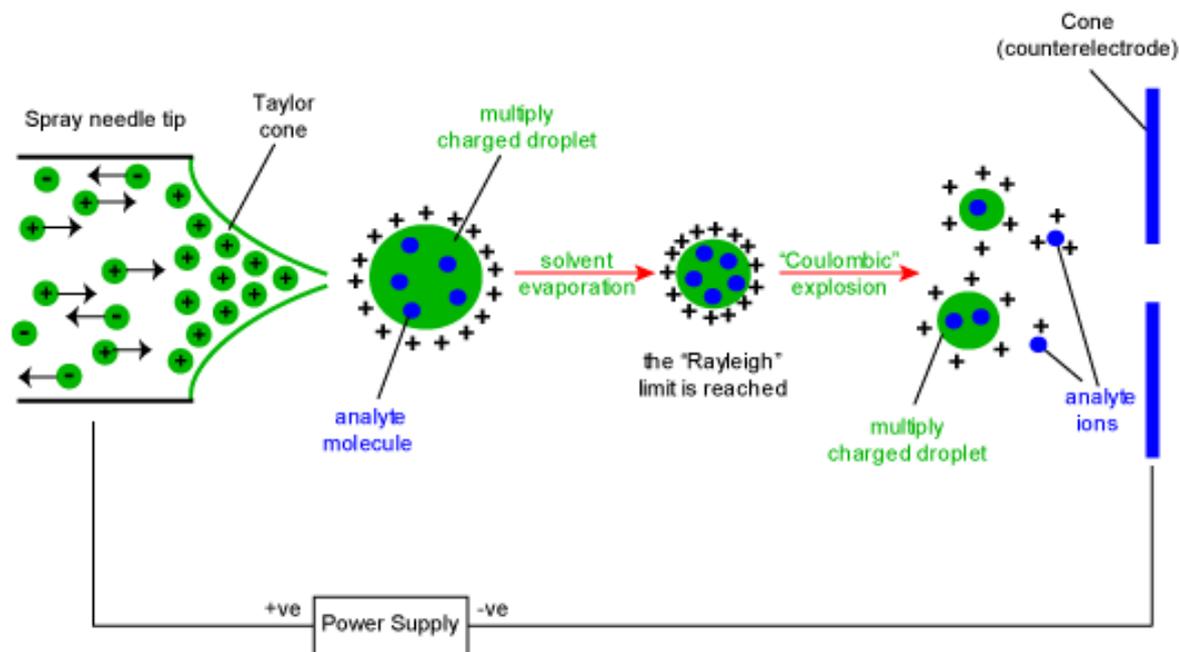


Figure 15: Principe de l'électrospray (ESI) [90]

Le champ électrique appliqué entre le capillaire et la contre-électrode génère la formation de gouttes qui vont se charger puis diminuer de taille par perte des molécules de solvant qui les entourent (évaporation) et former des gouttelettes de plus en plus petites hautement chargées (spray). L'accumulation de charges entraîne l'explosion des gouttelettes (limite de Rayleigh) qui subissent alors une cascade de fissions aboutissant à la désorption des ions.

L'analyseur détecte tous les ions formés, les sépare et simultanément détermine leur masse. L'analyseur le plus courant en biologie est de type quadripolaire et utilise la stabilité des trajectoires des ions dans un champ électrique oscillant pour les séparer selon leur m/z . Un quadripôle est constitué de quatre électrodes de section hyperbolique où sont appliqués un champ électrique constant et un champ électrique alternatif. Ainsi, les ions pénétrant dans le quadripôle subissent l'influence du champ quadripolaire : ils sont accélérés et atteignent le détecteur suivant des oscillations hélicoïdales. En fonction du champ électrique appliqué, seuls les ions possédant un rapport m/z spécifique évitent la collision avec les électrodes et peuvent traverser le quadripôle. Les autres ions ne répondant pas à ce critère entrent en collision avec la surface du quadripôle et n'atteignent pas le détecteur.

Enfin, les ions atteignent le détecteur (en général un multiplicateur d'électrons) qui va transformer le courant ionique en un courant électronique mesurable. Le signal analogique

obtenu sera finalement converti par un système informatique complexe en données digitales. L'utilisateur peut alors exploiter directement les données comme le spectre de masse.

4.2 La spectrométrie de masse en tandem [91]

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est devenue grâce aux évolutions techniques de ces dernières années, un outil indispensable pour la biologie médicale actuelle. Elle permet le dosage d'un très grand nombre de composés à haut débit à partir d'un très faible volume d'échantillon tout en restant sensible et spécifique.

Son principe de fonctionnement est le même que celui décrit ci-dessus à une exception près : l'existence d'un triple quadripôle (= trois quadripôles placés en série). Le premier quadripôle (Q1) permet d'isoler l'ion parent de la molécule d'intérêt à partir d'un mélange complexe. Cet ion sélectionné est ensuite fragmenté dans le deuxième quadripôle (Q2) appelé cellule de collision. On obtient des ions produits ou ions fils et des fragments neutres caractéristiques de la molécule d'intérêt. Enfin, le troisième quadripôle (Q3) analyse les ions produits (**Figure 16**).

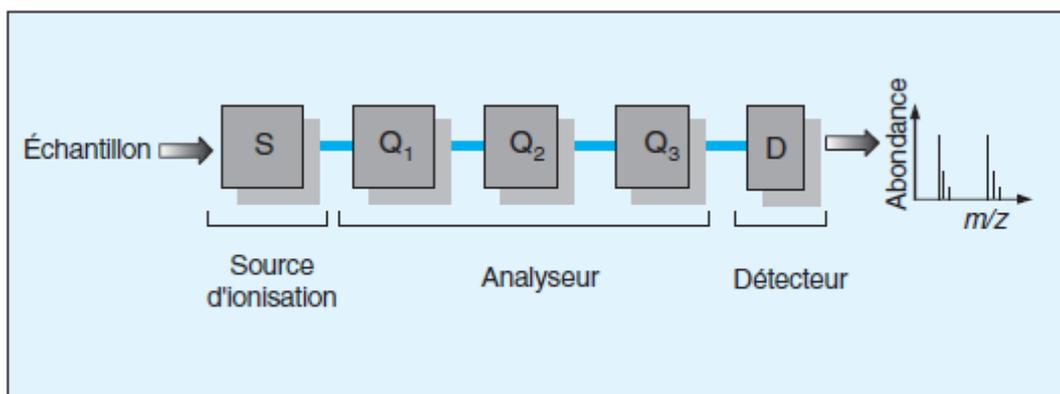


Figure 16: Schéma d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) (D'après Cheillan, [92])

L'analyseur est composé de trois quadripôles : Q1, Q2, Q3. Le graphique obtenu indique en abscisse les différents m/z et en ordonnée la quantité d'ions formés.

L'analyse en MS/MS peut se faire selon plusieurs modes. Le choix se fera en fonction des molécules à étudier.

- Le premier mode permet le balayage des ions fragments (Product Ion Scan) : l'ion précurseur de la molécule d'intérêt est sélectionné en Q1 puis fragmenté en Q2 et les ions produits sont déterminés en Q3. Ce mode permet d'identifier une substance inconnue dans un mélange complexe.
- Le second mode permet le balayage des ions parents (Precursor Ion Scan) : un ion fragment est sélectionné en Q3, et les ions parents donnant cet ion fils après fragmentation en Q2 sont balayés en Q1. Cette approche permet d'identifier une famille de molécules ayant une partie de structure similaire.
- Le troisième mode est celui du balayage en perte neutre (neutral loss scan) : il consiste à choisir un fragment neutre et à détecter toutes les fragmentations entraînant la perte de ce fragment. Comme le mode précédent, il est possible d'identifier une famille de molécules possédant une structure chimique commune.
- Le quatrième mode est celui du Multi Reaction Monitoring (MRM) : ce mode permet de choisir un ion précurseur et un ion fragment spécifique. Grâce à l'obtention d'un ou de plusieurs couples ions parents/ions fils spécifiques d'une molécule donnée, ce mode permet de quantifier simultanément de nombreux composés.

4.3 Application au profil des acylcarnitines

Les acylcarnitines possèdent un groupement ammonium quaternaire leur permettant de former des ions positifs polaires et non volatils. Dans les années 1980, lorsque l'intérêt de la détermination du profil des acylcarnitines s'est concrétisé, l'analyse par chromatographie gazeuse a été envisagée. Cependant, les acylcarnitines étant non volatiles, cette technique était impossible en l'état. Plus tard, les progrès des techniques de chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse (LC/MS) ont permis d'envisager l'analyse directe des acylcarnitines. Des essais en LC/MS utilisant une source FAB ont été réalisés mais sans grand succès du fait de la très faible sélectivité de la technique. Plusieurs méthodes permettant la détermination du profil des acylcarnitines ont été développées : méthode radio-enzymatique, chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et électrophorèse capillaire (CE) couplées à une détection UV ou fluorimétrique [93]. Enfin, l'introduction de la MS/MS a permis le développement au début des années 1990, de techniques permettant d'améliorer la détection et l'identification des acylcarnitines sans nécessiter une étape de chromatographie

liquide. [94]. Des techniques FAB/MSMS ont d'abord été développées pour la détermination des acylcarnitines sous forme de méthyl-esters suivi de techniques ESI/MSMS détectant les méthyl- ou butyl-esters (acylcarnitines dérivatisées) ou des acylcarnitines non dérivatisées [95]. La technique de spectrométrie de masse utilisant une source ESI est la méthode utilisée pour la détermination des acylcarnitines dans le domaine du dépistage néonatal [93].

Le technique ESI/MSMS est donc une méthode de choix pour la détermination du profil des acylcarnitines. La MSMS permet, grâce à sa grande sensibilité, d'analyser les acylcarnitines sans séparation chromatographique préalable. L'analyse est réalisée en mode positif et utilise le mode Precursor Ion Scan. En effet ce mode permet d'évaluer le profil complet des acylcarnitines et de la carnitine libre. L'ensemble des acylcarnitines dérivatisées et non dérivatisées (**Figure 17**) va produire un ion commun de masse 85 Da (correspondant à $^+\text{CH}_2\text{-CH=CH-COOH}$) après fragmentation et perte des groupes C_4H_8 (dérivatisation par butylation), $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ et de la chaîne RCOOH (**Figure 18**). Le profil est alors obtenu en sélectionnant tous les ions parents donnant cet ion 85 Da (**Figure 19**) [96, 97].

Afin de permettre la quantification des différentes acylcarnitines retrouvées sur le profil, des étalons internes deutérés de différentes longueurs de chaîne sont utilisés et ajoutés en concentration connue.

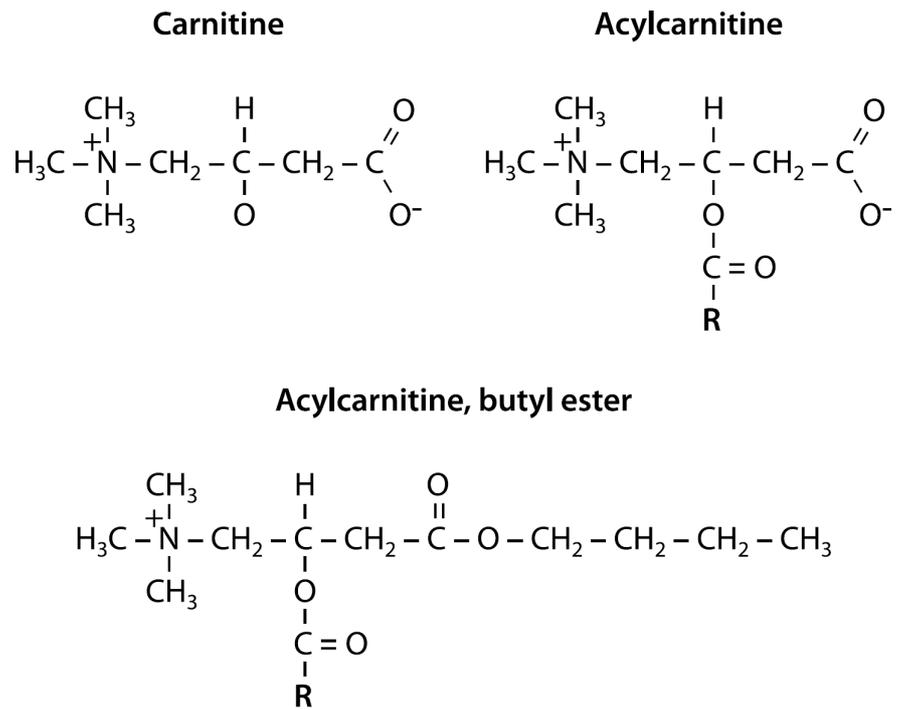


Figure 17: Structures de la carnitine, des acylcarnitines et des acylcarnitines butylés
(d'après Matern [50])

La méthode de dérivation choisie est la butylation. Le R représente l'acide gras lié à la carnitine.

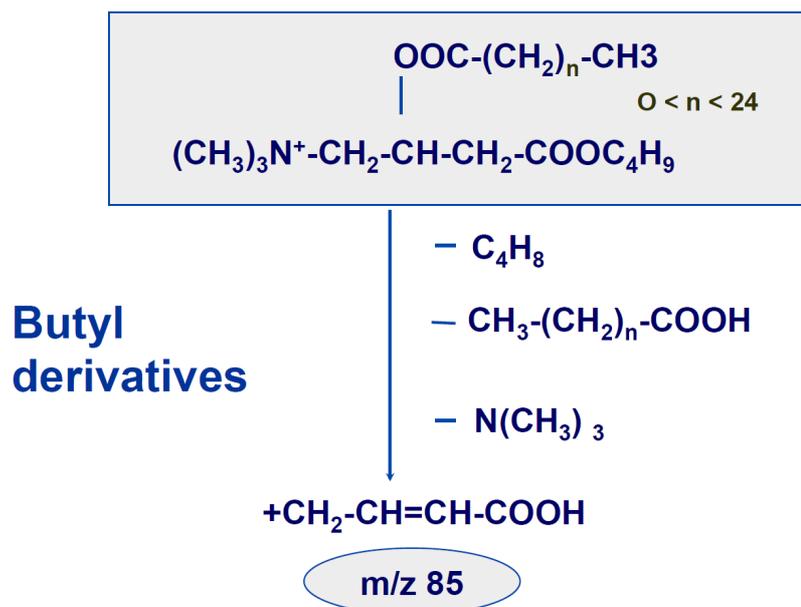


Figure 18: Fragmentation des acylcarnitines dans le spectromètre de masse (d'après Saban [98])

La méthode de dérivation choisie est la butylation.

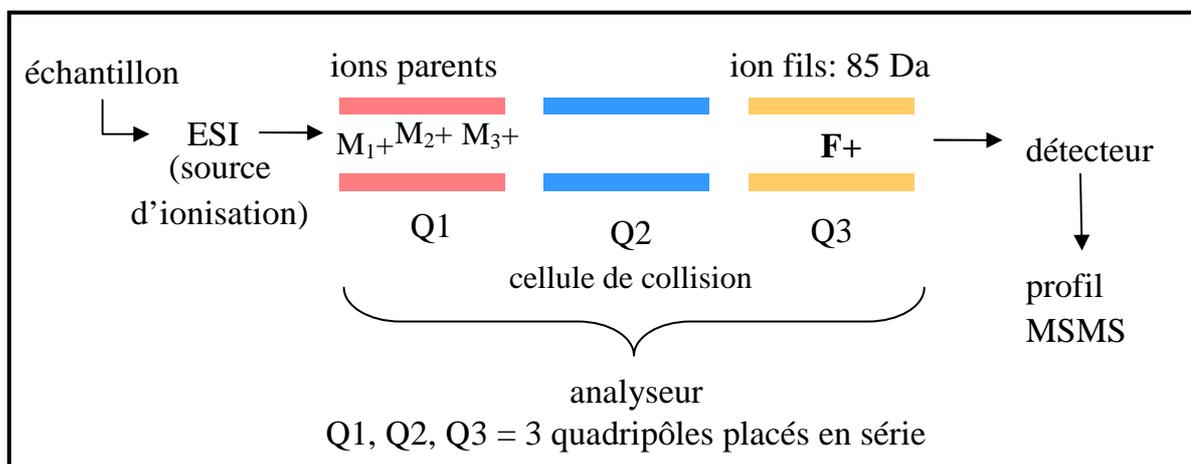


Figure 19: Application de la spectrométrie de masse en tandem au profil des acylcarnitines (mode Precursor Ion Scan)

Représentation schématique de l'analyse du profil des acylcarnitines par MSMS. L'échantillon est injecté dans le spectromètre de masse et passe dans l'analyseur constitué de trois quadripôles. Les ions parents (retrouvés en Q1) passe par la cellule de collision (Q2) et l'ion fils (85 Da) est détecté en Q3.

Partie 2: Données expérimentales

Chapitre 1 Objectifs de l'étude

La détermination du profil des acylcarnitines est un élément clé du diagnostic de certaines MHM, comme les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG et certaines aciduries organiques. Cette analyse fait partie des analyses de première intention du bilan du métabolisme intermédiaire aux côtés des acides organiques urinaires et des acides aminés plasmatiques.

L'objectif principal de cette étude est la mise en place, la validation technique et biologique du profil des acylcarnitines sur le plasma par spectrométrie de masse en tandem.

L'objectif secondaire est la réalisation de ce même profil sur sang total (sur papier buvard « Guthrie »).

Le résultat de l'analyse est un profil complet où figurent toutes les acylcarnitines de longueur comprise entre 2 et 18 carbones. Les recommandations en France concernant le Dépistage Néonatal (DNN) et le dépistage systématique du déficit en MCAD ont été publiées récemment [2]. Ce dépistage systématique sera réalisé à partir du buvard prélevé à J3 et l'analyse ne concerne que le dosage de certaines acylcarnitines à chaîne moyenne. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés au profil complet des acylcarnitines à partir d'un prélèvement plasmatique ou de sang total sur papier buvard.

Chapitre 2 Matériel et Méthode

2.1 Principe

Les acylcarnitines sont extraites de l'échantillon par de l'éthanol en présence d'une solution contenant des acylcarnitines de différentes longueurs de chaîne, deutérées et servant de standards internes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et évaporé à sec. Le résidu est dérivatisé avec de l'alcool butylique dans de l'acide chlorhydrique (M+56), permettant ainsi d'améliorer l'ionisation des acylcarnitines pour leur analyse par spectrométrie de masse en tandem (source d'ionisation electrospray). Après l'analyse, un profil des acylcarnitines est généré par le logiciel, lequel peut être interprété qualitativement. Il est possible de réaliser un calcul semi-quantitatif de la concentration de chaque acylcarnitine en se basant sur l'abondance du standard interne correspondant.

Pour mettre en œuvre cette technique, nous nous sommes rendus au laboratoire du Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme de Lyon (Dr Christine Vianey-Saban) afin d'observer les différentes étapes de cette analyse et l'adapter au CHU de Grenoble.

2.2 Règles préanalytiques

La détermination du profil des acylcarnitines peut se réaliser sur différents milieux. Il est possible de réaliser le profil sur des urines. Cependant le profil des acylcarnitines urinaires n'apporte pas toutes les informations puisque les acylcarnitines de plus de 12 carbones ne sont pas éliminées dans les urines [98]. Les milieux de choix sont le plasma ou le sang total sur papier buvard en seconde intention. Le plasma est préféré car il n'y a pas d'interférence des globules rouges.

Les profils les plus informatifs sont ceux obtenus au moment de la crise. Cependant il n'est pas toujours possible d'obtenir ces prélèvements précis et l'idéal est de prélever à jeun, de préférence le matin (après une nuit de jeûne).

Concernant l'analyse réalisée sur le plasma (plasma hépariné), l'échantillon de sang doit être acheminé rapidement au laboratoire. Le tube est centrifugé et le plasma doit être conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. Concernant l'analyse sur sang total, le sang est recueilli sur papier

buvard Guthrie (spot). Après séchage à l'air libre, le buvard est conservé à température ambiante.

2.3 Matériel

2.3.1 Extraction

- **Standards :**

Labeled carnitine Set B (NSK-B) – Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, Massachusetts, USA)

- conservation entre -5°C et +5°C avant utilisation ; après reprise par du méthanol, conservation 1 an à -20°C.
- composition :
 - L-carnitine (N-triméthyl-D₉) (M=171 g/mol)
 - L-acétylcarnitine (N-méthyl-D₃) (C2) (M=207 g/mol)
 - L-propionylcarnitine (N-méthyl- D₃) (C3) (M=221 g/mol)
 - L-butyrylcarnitine (N-méthyl- D₃) (C4) (M=235 g/mol)
 - L-isovalérylcarnitine (N-triméthyl- D₉) (C5) (M=255 g/mol)
 - L-octanoylcarnitine (N-méthyl- D₃) (C8) (M=291 g/mol)
 - L-myristoylcarnitine (N-triméthyl- D₉) (C14) (M=381 g/mol)
 - L-palmitoylcarnitine (N-méthyl- D₃) (C16) (M=403 g/mol)

- **Autres réactifs :**

- méthanol (Carlo-Erba, Val de Reuil, France)
- eau milliQ
- éthanol (Carlo-Erba, Val de Reuil, France)
- n-hexane (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- acétonitrile
- acide formique (Carlo-Erba, Val de Reuil, France)
- 3N butanol HCl (Regis Technologies Inc., Morton Grove, Illinois, USA)

- **Consommables et matériel :**

- tubes type eppendorf
- poinçonneuse de 6mm de diamètre (pour le sang total sur buvard)
- tubes à hémolyse en verre
- sonicateur
- pipette 100µl, 200µl, 1000µl
- cônes 100µl, 200µl, 1000µl
- dispensette
- pipettes pasteur
- évaporateur à sec sous azote
- micro-centrifugeuse
- vortex
- étuve
- flacons sans insert (SVWM740, Chromacol, Welwin Garden City, Grande Bretagne ou selon l'appel d'offre en cours)
- flacons avec insert (R06290, Interchim, Montluçon, France ou selon l'appel d'offre en cours)

2.3.2 Spectrométrie de masse

- injecteur et pompe HPLC: HP series 1100 (Agilent Technologies, Massy, France)
- API 3000 (Applied Biosystems, Sciex Instruments, Foster City, Californie, USA)
- exploitation des résultats : logiciel Analyst® version 1.5.2 (AB Sciex Instruments).

2.4 Méthode

2.4.1 Préparation des standards internes

Les standards internes sont fournis sous forme lyophilisée. Ils sont repris dans du méthanol avec un volume précis (7.6 ml) pour obtenir les concentrations cibles en carnitine et acylcarnitines désirées (**Tableau I**).

	concentration cible (reprise par 1 ml) ($\mu\text{mol/l}$)	concentration cible (reprise par 7,6 ml) ($\mu\text{mol/l}$)
L-carnitine (N-triméthyl- D_9)	152	20
L-acétylcarnitine (N-méthyl- D_3) (C2)	38	5
L-propionylcarnitine (N-méthyl- D_3) (C3)	7,6	1
L-butyrylcarnitine (N-méthyl- D_3) (C4)	7,6	1
L-isovalérylcarnitine (N-triméthyl- D_9) (C5)	7,6	1
L-octanoylcarnitine (N-méthyl- D_3) (C8)	7,6	1
L-myristoylcarnitine (N-triméthyl- D_9) (C14)	7,6	1
L-palmitoylcarnitine (N-méthyl- D_3) (C16)	15,2	2

Tableau I: Concentrations cibles de la carnitine et des acylcarnitines marquées

2.4.2 Extraction

L'objectif de cette étape est d'extraire les molécules d'intérêt (les différents acylcarnitines) de leur matrice afin de les remettre en solution dans un solvant approprié. Le schéma d'extraction est différent suivant le type de prélèvement analysé (plasma ou sang total).

- **échantillons plasmatiques**
 - identifier un tube type eppendorf (chiffre, lettre...) et ajouter :
 - 20 μl de plasma

- 20 µl de solution de standards internes marqués
 - 50 µl d'eau déminéralisée
 - 400 µl d'éthanol
 - mélanger manuellement (par retournements)
 - ajouter 400 µl de n-hexane et agiter pendant 2 minutes les tubes manuellement (par retournements successifs); rejeter la phase supérieure (= la phase hexanique) après avoir laissé reposer quelques instants
 - recommencer cette étape : ajouter 400 µl de n-hexane et agiter pendant 2 minutes puis rejeter la phase supérieure après avoir laissé reposer quelques instants
 - centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 14000 g (+4°C)
 - récupérer la phase intermédiaire au moyen d'une pipette pasteur et d'une dispensette et la transvaser dans un flacon sans insert préalablement identifié
 - évaporer à sec sous azote à température ambiante
- **sang total sur buvard**
 - identifier un tube à hémolyse en verre (chiffre, lettre...) et ajouter :
 - 1 tache de sang (6 mm de diamètre)
 - 10 µl de solution de standards internes marqués
 - 390 µl de méthanol
 - passer le tube 30 minutes aux ultra-sons
 - récupérer la phase liquide à l'aide d'une pipette pasteur et d'une dispensette et la transvaser dans un flacon sans insert préalablement identifié
 - évaporer à sec sous azote à température ambiante
- **dérivatisation : butylation (pour tous les types de prélèvements)**
 - reprendre l'extrait sec par 200µl de 3N butanol HCl, fermer les flacons et agiter au vortex
 - mettre à l'étuve 65°C pendant 15 minutes
 - agiter les flacons au vortex
 - évaporer à sec sous azote à 45°C
 - reprendre chaque échantillon par 400µl de phase mobile : acétonitrile / eau / acide formique (50/50/0.025%) ; agiter les flacons au vortex puis transvaser les échantillons repris dans un flacon avec insert identifié

2.4.3 Spectrométrie de masse

Après butylation, les échantillons sont injectés dans le spectromètre de masse en tandem par l'intermédiaire d'un passeur automatique d'échantillons et d'une pompe HPLC. L'échantillon est directement injecté au niveau du spectromètre de masse, sans étape de séparation préalable (colonne) : mode en injection continue (FIA = *Flow Injection Analysis*).

- **Paramètres HPLC (injecteur automatique et pompe)**
 - élution : mode isocratique (100% phase mobile : eau / acétonitrile / acide formique 50/50/0.025%)
 - volume injecté : 30 µl
 - débit : 80 µl/min
 - durée du run : 3 minutes
 - température de l'injecteur : 10°C
 - temps de lavage de l'aiguille: 5 secondes

- **Paramètres du spectromètre de masse**
 - mode d'ionisation : electrospray positif
 - mode d'acquisition des données : « precursor ion scan » (ion fils cible (Q3) m/z 85 Da)
 - balayage des masses (Q1) : 200 à 600 Da
 - temps de balayage : 3 secondes
 - gaz de nébulisation : 8 (valeur empirique, sans unité)
 - gaz de collision : 7 (valeur empirique sans unité)
 - gaz rideau : 8 (valeur empirique sans unité)
 - ion spray voltage: 5000V
 - température de la source : 300°C
 - potentiel de déclusterisation (DP): 30V
 - potentiel de focalisation (FP): 100V
 - potentiel d'entrée : 10V
 - énergie de collision (CE) : 35 à 70 eV
 - potentiel de sortie de cellule de collision (CXP) : 14V

2.4.4 Validation de la méthode : paramètres étudiés

L'étude du profil des acylcarnitines par MS/MS peut être assimilée à une méthode de type qualitative. En effet, en première intention le résultat de cet examen (sous forme de commentaire) n'apporte pas d'information sur la quantité des analytes, mais plutôt sur leur présence ou leur absence. L'étude du profil est opérateur dépendant et présente donc une part de subjectivité.

Cependant, en cas de présence anormalement élevée d'un analyte, il est possible de réaliser une estimation de sa quantité grâce aux étalons internes marqués présents en quantité connue (calcul proportionnel). On peut alors assimiler cet examen à une méthode semi-quantitative.

Ainsi plusieurs paramètres ont été étudiés afin d'évaluer et de valider la méthode [99] :

- Interférences analytiques

- Plasma hémolysé

Nous avons réalisé, grâce à une procédure interne au laboratoire (**Annexe 1**), une gamme de solutions avec une concentration croissante d'hémoglobine libre. Cette gamme nous a permis de reproduire une hémolyse (indices : H+, H++, H+++) sur un même plasma et nous avons pu observer l'effet de celle-ci sur le profil des acylcarnitines plasmatiques.

- Plasma lactescent

Nous avons réalisé, grâce à une procédure interne au laboratoire (**Annexe 1**), une gamme de solutions avec une concentration croissante en lipides, pour observer les conséquences de la lactescence sur le profil des acylcarnitines plasmatiques.

- Plasma ictérique

Nous avons analysé des plasmas présentant des taux de bilirubine totale de plus en plus élevés (80, 200 et 411 mmol/l) pour observer les conséquences de l'indice ictérique sur le profil des acylcarnitines plasmatiques.

- Rôle de l'anticoagulant

Nous avons prélevé un même échantillon sanguin sur différents tubes : un tube hépariné, un tube avec EDTA et un tube sec afin d'observer l'impact sur le profil des acylcarnitines de l'anticoagulant choisi.

- Stabilité des extraits

Les plasmas extraits et injectés ont été conservés dans leur flacon à 4°C pendant plusieurs semaines. Nous avons testé la stabilité de ces extraits, en les réinjectant 1 et 3 semaines après leur extraction.

- Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour un même examen dans des conditions standardisées (même opérateur, même lots et réactifs, même instrument, même calibrateur). Nous avons extrait un plasma que nous avons ensuite analysé et quantifié six fois le même jour afin d'évaluer les variations liées à la mesure proprement dite.

- Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (reproductibilité) consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même examen dans des conditions différentes, c'est-à-dire qu'un même échantillon est passé dans n séries différentes. Nous avons analysé et quantifié un même échantillon que nous avons passé dans six séries différentes.

- Valeurs physiologiques

Pour permettre l'interprétation biologique des profils des acylcarnitines, nous avons déterminé les valeurs physiologiques pour les deux types de prélèvements. D'une part nous avons analysé des plasmas d'adultes et d'autre part, nous avons analysé le sang total sur buvard de naissance (J3).

Les plasmas adultes ont été donnés par le service de neurologie du CHU de Grenoble (Dr G.Besson). L'ensemble des patients testés (contexte pathologique connu) ont été prélevés le matin à jeun. L'estimation des valeurs physiologiques a été réalisée sur 25 échantillons plasmatiques reçus au laboratoire et immédiatement congelés jusqu'à leur analyse. L'âge des patients s'échelonne entre 16 et 93 ans ; l'analyse a porté sur 15 femmes et 10 hommes.

Concernant l'analyse sur sang total, 90 buvards du dépistage néonatal ont été analysés selon la répartition suivante : 60 buvards proviennent de nouveau-nés dont le poids de naissance est supérieur à 2.5kg ; 21 buvards proviennent de nouveau-nés dont le poids de naissance est compris entre 1.5 et 2.5kg et 11 buvards proviennent de nouveau-nés dont le poids de naissance est inférieur à 1.5kg. Pour l'ensemble des buvards analysés, nous avons déterminé les valeurs physiologiques des acylcarnitines.

2.5 Application au screening néonatal de la MCAD

Dans la perspective (non testée dans le cadre de ce travail) d'un dépistage néonatal systématique d'un déficit en MCAD, l'acylcarnitine qui nous intéresse est l'octanoylcarnitine (C8) tantôt seule, tantôt en association avec d'autres acylcarnitines (il n'y a pas actuellement de standardisation des algorithmes de dépistage (déjà réalisé dans de nombreux pays)). La détection de cette pathologie passe donc par l'adaptation du profil des acylcarnitines à un dépistage systématique. La technique reste sensiblement la même à la seule différence près que les échantillons sont placés dans des microplaques (96 puits) pour permettre le haut débit. Concernant les standards internes, seule la L-octanoylcarnitine (N-méthyl- D₃) (C8) est nécessaire pour le dosage. Le reste des paramètres est inchangé.

Chapitre 3 Résultats

3.1 Validation de la méthode

3.1.1 Interférences analytiques

- Plasma hémolysé

Avec l'augmentation de l'intensité de l'hémolyse, on observe une augmentation des chaînes courtes (C2, C3, C4) mais également des chaînes longues (C12, C14, C16, C18) (**Figure 20**). Le coefficient de variation ($CV > 50\%$) confirme cette observation pour ces différentes acylcarnitines (**Tableau II**).

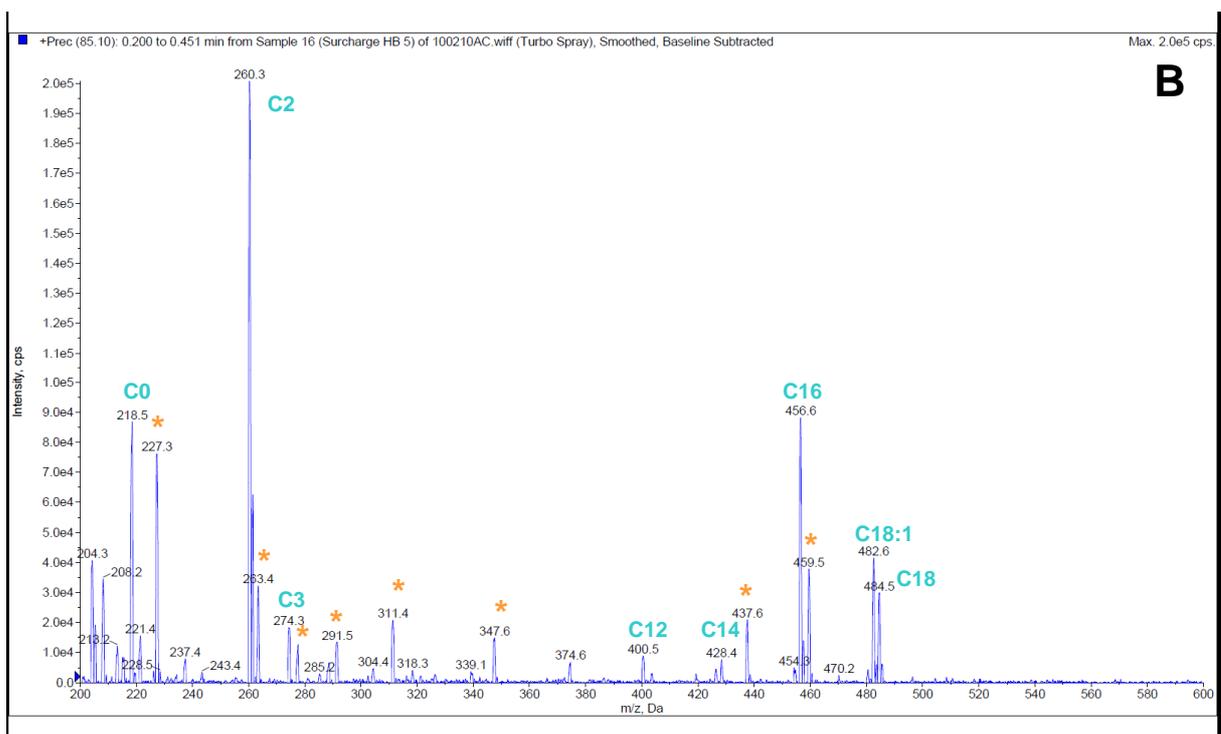
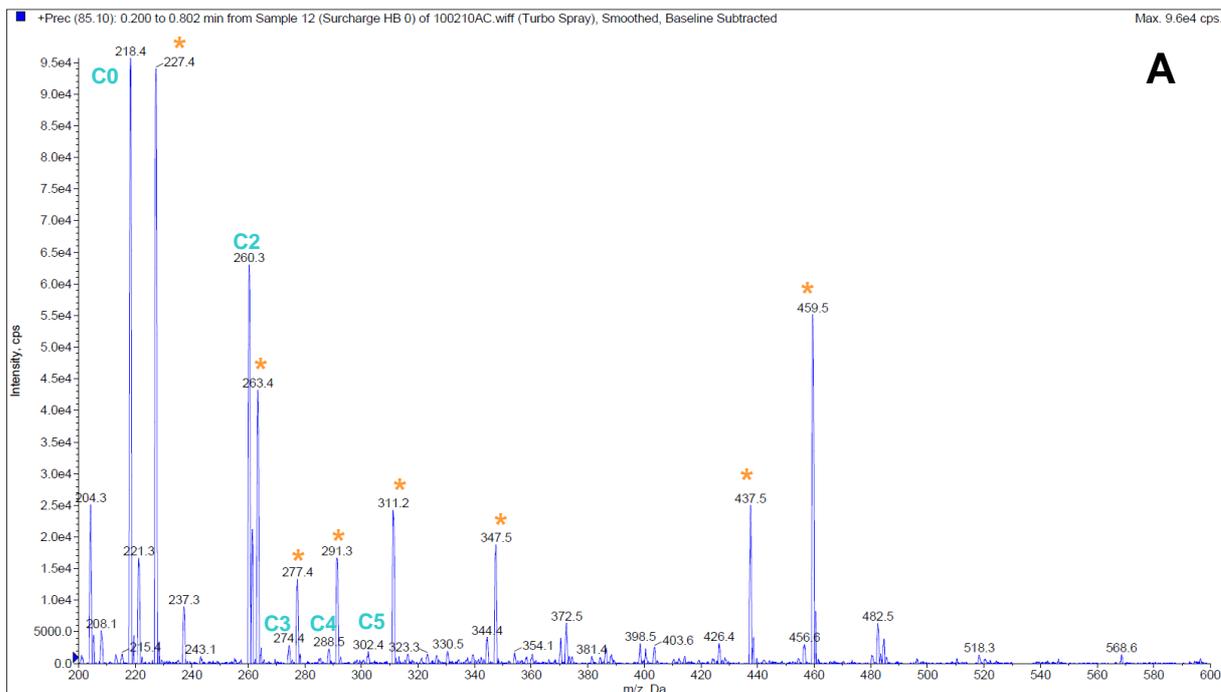


Figure 20: Exemple de profils d'acylcarnitines plasmatiques en fonction de l'hémolyse

A : avant hémolyse, B : après hémolyse.

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx).

- Plasma lactescent

Les résultats montrent des coefficients de variation variables en fonction des valeurs, mais globalement inférieurs à 25% (variations plus importantes sur les valeurs très faibles) (**Tableau III**).

- Plasma ictérique

Nous avons analysé des plasmas présentant des taux de bilirubine totale de plus en plus élevés (80, 200 et 411 mmol/l). Les profils des acylcarnitines plasmatiques obtenus montrent des différences. Cependant, les trois plasmas testés proviennent de trois patients différents et les écarts observés ne semblent pas corrélés aux taux de bilirubine totale.

- Rôle de l'anticoagulant

Les résultats montrent des coefficients de variation variables en fonction des valeurs, mais globalement inférieurs à 35% (variations plus importantes sur les valeurs très faibles) (**Tableau IV**). Le profil obtenu pour l'échantillon prélevé sur tube EDTA, présente également un certain nombre de pics supplémentaires (**Figure 21**) et l'intensité des différentes acylcarnitines est bien moins importante, liée à l'extinction chimique induite par l'EDTA.

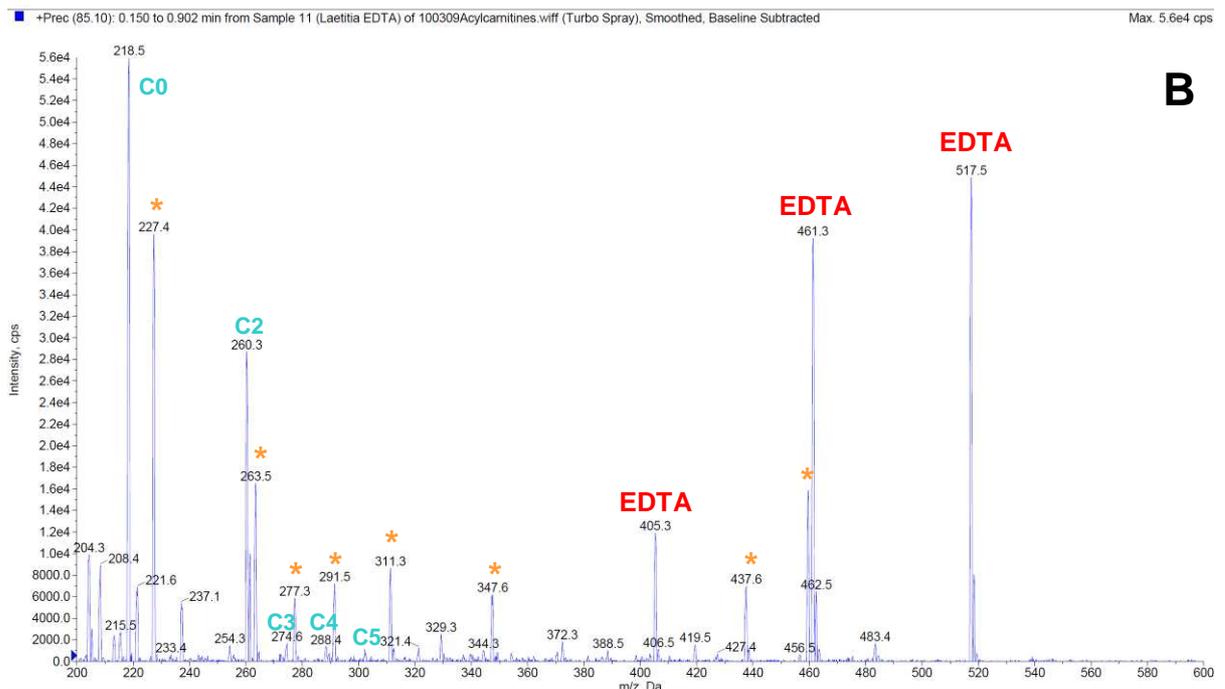
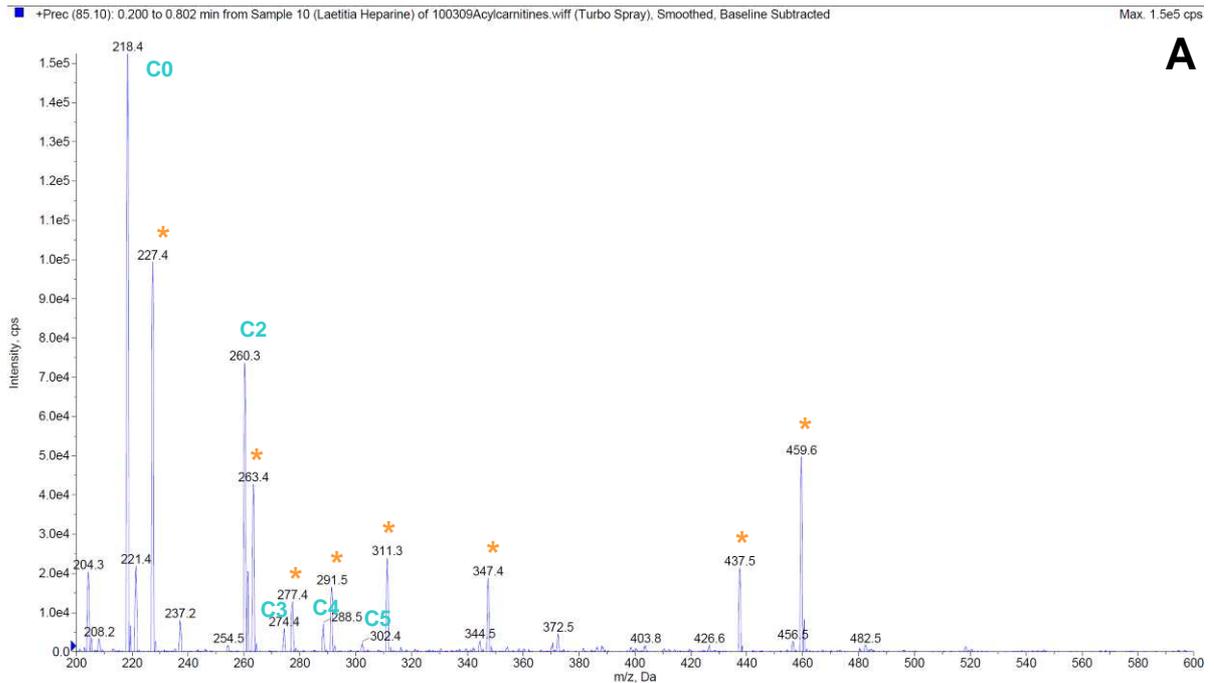


Figure 21: Exemple de profils d'acylcarnitines plasmatiques en fonction de l'anticoagulant utilisé

A : plasma hépariné, **B** : plasma EDTA, des pics supplémentaires font leur apparition avec l'EDTA.

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx).

3.1.2 Stabilité

Les résultats montrent que les coefficients de variation de la concentration des acylcarnitines présentes dans les échantillons se situent dans une fourchette allant de 0.5 à 34% (variation plus importante sur les valeurs très faibles) (**Tableau V**).

3.1.3 Répétabilité

Les résultats montrent des coefficients de variation variables en fonction des valeurs, mais globalement inférieurs à 20%. Les variations observées sont liées essentiellement à la manière de quantifier par intégration manuelle (**Tableau VI**).

3.1.4 Fidélité intermédiaire

Les résultats montrent des coefficients de variation variables en fonction des valeurs, mais globalement inférieurs à 35%. Les variations observées sont liées essentiellement à la manière de quantifier par intégration manuelle tout comme pour l'essai de répétabilité (**Tableau VII**).

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	Hémoglobine (Hb) ($\mu\text{mol/l}$)					moyenne	écart type	CV (%)
	Hb = 0	Hb = 12 (H+)	Hb = 47 (H++)	Hb = 118 (H++)	Hb = 165 (H+++)			
C0	19,70	20,40	20,50	15,60	21,40	19,52	2,27	12
C2	8,85	9,34	23,00	27,00	37,40	21,12	12,17	58
C3	0,20	0,23	1,96	2,91	1,58	1,38	1,17	85
C4	0,11	0,14	0,46	0,38	0,54	0,33	0,19	58
C5:1	0,03	0,02	0,05	0,04	0,08	0,04	0,02	51
C5	0,09	0,09	0,25	0,15	0,17	0,15	0,07	46
C4 OH	0,03	0,03	0,13	0,26	0,50	0,19	0,20	104
C6:1	0,06	0,04	0,04	0,09	0,06	0,06	0,02	31
C6	0,10	0,09	0,10	0,11	0,18	0,12	0,04	33
C5 OH	0,03	0,03	0,12	0,23	0,27	0,14	0,11	81
C8:1	0,07	0,06	0,09	0,10	0,12	0,09	0,02	26
C8	0,29	0,26	0,10	0,11	0,11	0,17	0,09	54
C3 DC	0,09	0,10	0,08	0,09	0,05	0,08	0,02	26
C10:2	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06	0,05	0,01	23
C10:1	0,20	0,21	0,08	0,10	0,09	0,14	0,06	46
C10	0,44	0,46	0,12	0,14	0,14	0,26	0,17	67
C4 DC	0,09	0,08	0,16	0,32	0,50	0,23	0,18	78
C5 DC	0,11	0,10	0,03	0,07	0,07	0,08	0,03	37
C12:2	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	27
C12:1	0,12	0,09	0,03	0,06	0,07	0,07	0,03	44
C12	0,09	0,10	0,19	0,30	0,53	0,24	0,18	75
C6 DC	0,02	0,03	0,05	0,04	0,07	0,04	0,02	48
C14:2	0,04	0,05	0,08	0,04	0,06	0,05	0,02	29
C14:1	0,14	0,16	0,16	0,24	0,23	0,19	0,04	23
C14	0,04	0,05	0,02	0,31	0,37	0,16	0,17	106
C8 DC	0,01	0,01	0,05	0,05	0,05	0,04	0,02	65
C14:1 OH	0,03	0,02	0,08	0,06	0,07	0,05	0,03	48
C14 OH	0,02	0,01	0,01	0,03	0,07	0,03	0,03	84
C16:2	0,01	0,01	0,04	0,05	0,03	0,03	0,02	64
C16:1	0,03	0,03	0,12	0,19	0,21	0,12	0,09	73
C16	0,11	0,09	1,72	3,24	3,77	1,79	1,71	96
C10 DC	0,06	0,06	0,14	0,23	0,26	0,15	0,10	64
C16:1 OH	0,01	0,02	0,10	0,08	0,06	0,05	0,04	71
C16 OH	0,01	0,01	0,03	0,05	0,05	0,03	0,02	64
C18:2	0,05	0,04	0,19	0,08	0,17	0,10	0,07	67
C18:1	0,21	0,18	1,10	1,41	1,68	0,92	0,69	75
C18	0,10	0,07	0,48	0,96	1,04	0,53	0,46	86
C12 DC	0,01	0,01	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02	69
C18:2 OH	0,01	0,01	0,07	0,07	0,05	0,04	0,03	71
C18:1 OH	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	49
C18 OH	0,00	0,00	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	78
C16 DC	0,01	0,01	0,02	0,04	0,02	0,02	0,01	69
C18:1 DC	0,03	0,02	0,03	0,05	0,04	0,04	0,01	29

Tableau II: Impact de l'indice d'hémolyse sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques

Résultats obtenus après surcharges croissantes en hémoglobine libre d'un même plasma. Le taux d'hémoglobine est indiqué pour chaque surcharge avec l'indice d'hémolyse correspondant. CV = coefficient de variation en pourcentage. En gras sont indiqués les résultats présentant un CV >50%.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	Triglycérides (TG) (mmol/l)					moyenne	écart type	CV (%)
	TG = 0	TG = 0,63	TG = 1,26	TG = 2,53	TG = 5,05			
Carnitine libre	28,60	26,00	25,90	25,70	26,20	26,48	1,20	5
C2	8,45	8,92	8,82	9,04	8,72	8,79	0,22	3
C3	0,33	0,29	0,29	0,26	0,35	0,30	0,03	11
C4	0,26	0,28	0,28	0,30	0,29	0,28	0,01	5
C5:1	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	35
C5	0,12	0,10	0,10	0,09	0,13	0,11	0,02	16
C4 OH	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	30
C6:1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00	26
C6	0,08	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,01	21
C5 OH	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,01	19
C8:1	0,04	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	18
C8	0,17	0,16	0,17	0,14	0,15	0,16	0,01	9
C3 DC	0,07	0,06	0,05	0,04	0,06	0,05	0,01	22
C10:2	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	31
C10:1	0,10	0,11	0,11	0,10	0,13	0,11	0,01	11
C10	0,25	0,23	0,25	0,24	0,20	0,23	0,02	10
C4 DC	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,00	8
C5 DC	0,10	0,09	0,12	0,09	0,08	0,10	0,02	17
C12:2	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	25
C12:1	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,01	14
C12	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06	0,05	0,01	20
C6 DC	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,00	15
C14:2	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	17
C14:1	0,06	0,05	0,04	0,04	0,06	0,05	0,01	21
C14	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	27
C8 DC	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	24
C14:1 OH	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	35
C14 OH	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	30
C16:2	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43
C16:1	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	39
C16	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,00	5
C10 DC	0,10	0,08	0,06	0,08	0,08	0,08	0,02	20
C16:1 OH	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	37
C16 OH	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	27
C18:2	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	22
C18:1	0,06	0,07	0,05	0,07	0,05	0,06	0,01	16
C18	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	19
C12 DC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	35
C18:2 OH	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	13
C18:1 OH	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	18
C18 OH	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	51
C16 DC	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	18
C18:1 DC	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	12

Tableau III: Impact de l'indice lipémique sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques

Résultats obtenus après surcharges croissantes de Médialipide® (riche en triglycérides) sur un même plasma; le tableau présente les résultats obtenus pour chaque surcharge. Le taux de triglycérides (mmol/l) est indiqué pour chaque surcharge. CV = coefficient de variation exprimé en pourcentage.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	Plasma hépariné	Plasma EDTA	Sérum	Moyenne	écart type	CV (%)
Carnitine libre	28,90	26,90	29,40	28,40	1,32	5
C2	9,69	9,90	10,10	9,90	0,21	2
C3	0,32	0,30	0,35	0,32	0,03	8
C4	0,33	0,27	0,33	0,31	0,03	10
C5:1	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	39
C5	0,11	0,13	0,12	0,12	0,01	7
C4 OH	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	42
C6:1	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	35
C6	0,06	0,09	0,05	0,06	0,02	33
C5 OH	0,01	0,04	0,04	0,03	0,02	52
C8:1	0,06	0,08	0,06	0,07	0,01	21
C8	0,21	0,22	0,17	0,20	0,02	13
C3 DC	0,05	0,08	0,05	0,06	0,02	33
C10:2	0,02	0,04	0,02	0,03	0,01	37
C10:1	0,13	0,18	0,15	0,16	0,03	17
C10	0,28	0,32	0,18	0,26	0,07	27
C4 DC	0,03	0,03	0,05	0,04	0,01	33
C5 DC	0,11	0,15	0,08	0,12	0,03	29
C12:2	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	48
C12:1	0,04	0,08	0,06	0,06	0,02	30
C12	0,05	0,06	0,05	0,05	0,01	17
C6 DC	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	44
C14:2	0,02	0,04	0,02	0,03	0,01	42
C14:1	0,07	0,09	0,06	0,07	0,01	18
C14	0,02	0,05	0,04	0,04	0,01	36
C8 DC	0,01	0,03	0,02	0,02	0,01	58
C14:1 OH	0,01	0,03	0,03	0,02	0,01	44
C14 OH	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	33
C16:2	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	33
C16:1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	10
C16	0,10	0,09	0,08	0,09	0,01	13
C10 DC	0,06	0,09	0,05	0,07	0,02	29
C16:1 OH	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	51
C16 OH	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	41
C18:2	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	22
C18:1	0,06	0,10	0,07	0,08	0,02	25
C18	0,02	0,06	0,02	0,03	0,02	65
C12 DC	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	40
C18:2 OH	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	23
C18:1 OH	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	56
C18 OH	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	69
C16 DC	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	14
C18:1 DC	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	22

Tableau IV: Impact de l'anticoagulant utilisé sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques

Pour chaque type d'anticoagulant étudié (hépariné, EDTA ou absence d'anticoagulant), la quantification des acylcarnitines a été réalisée. CV= coefficient de variation exprimé en pourcentage. En gras sont indiqués les résultats présentant un CV <35%.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	J0	J7	J20	moyenne	écart type	CV (%)
C0	12,40	12,50	12,40	12,43	0,06	0
C2	16,60	15,90	14,90	15,80	0,85	5
C3	0,31	0,26	0,33	0,30	0,04	13
C4	8,73	9,20	9,72	9,22	0,50	5
C5:1	0,03	0,03	0,04	0,03	0,01	21
C5	17,50	16,50	18,40	17,47	0,95	5
C4 OH	0,31	0,39	0,35	0,35	0,04	12
C6:1	0,10	0,13	0,08	0,10	0,03	25
C6	1,09	1,03	1,01	1,04	0,04	4
C5 OH	0,12	0,14	0,13	0,13	0,01	10
C8:1	0,16	0,14	0,12	0,14	0,02	14
C8	1,50	1,49	1,33	1,44	0,10	7
C3 DC	0,25	0,28	0,21	0,25	0,03	13
C10:2	0,05	0,04	0,04	0,04	0,00	11
C10:1	0,27	0,29	0,23	0,26	0,03	11
C10	1,25	1,23	1,10	1,19	0,08	7
C4 DC	0,17	0,18	0,14	0,16	0,02	12
C5 DC	10,00	10,80	8,89	9,90	0,96	10
C12:2	0,12	0,09	0,11	0,11	0,01	13
C12:1	0,22	0,25	0,25	0,24	0,02	7
C12	1,05	1,18	1,04	1,09	0,08	7
C6 DC	0,29	0,31	0,26	0,29	0,03	9
C14:2	0,06	0,11	0,07	0,08	0,03	34
C14:1	0,54	0,62	0,57	0,58	0,04	6
C14	1,26	1,29	1,32	1,29	0,03	2
C8 DC	0,29	0,27	0,31	0,29	0,02	7
C14:1 OH	0,10	0,09	0,08	0,09	0,01	11
C14 OH	0,22	0,19	0,14	0,18	0,04	22
C16:2	0,06	0,05	0,05	0,05	0,01	18
C16:1	0,28	0,27	0,25	0,27	0,01	5
C16	1,03	0,95	0,95	0,98	0,05	5
C10 DC	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00	1
C16:1 OH	0,45	0,46	0,36	0,42	0,05	13
C16 OH	0,14	0,12	0,12	0,13	0,01	10
C18:2	0,08	0,07	0,06	0,07	0,01	17
C18:1	0,16	0,22	0,19	0,19	0,03	17
C18	0,11	0,11	0,10	0,10	0,00	3
C12 DC	0,11	0,15	0,14	0,13	0,02	15
C18:2 OH	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	6
C18:1 OH	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01	23
C18 OH	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	5
C16 DC	0,21	0,21	0,24	0,22	0,02	8
C18:1 DC	0,06	0,06	0,05	0,06	0,00	7

Tableau V: Impact de la durée de conservation des extraits sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques

Les extraits plasmatiques ont été conservés dans leur flacon à +4°C pendant 7 et 20 jours avant d'être analysés de nouveau. CV= coefficient de variation exprimé en pourcentage.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	moyenne	écart type	CV (%)
C0	32,50	2,04	6
C2	11,25	0,48	4
C3	0,31	0,01	4
C4	0,27	0,03	12
C5:1	0,03	0,01	37
C5	0,12	0,01	11
C4 OH	0,03	0,00	11
C6:1	0,03	0,01	32
C6	0,11	0,01	11
C5 OH	0,04	0,00	10
C8:1	0,12	0,01	7
C8	0,37	0,02	6
C3 DC	0,10	0,01	10
C10:2	0,03	0,00	15
C10:1	0,24	0,03	13
C10	0,56	0,04	7
C4 DC	0,06	0,01	26
C5 DC	0,16	0,01	9
C12:2	0,01	0,00	39
C12:1	0,09	0,01	7
C12	0,11	0,01	6
C6 DC	0,02	0,00	17
C14:2	0,05	0,01	13
C14:1	0,10	0,01	9
C14	0,04	0,01	17
C8 DC	0,01	0,00	30
C14:1 OH	0,02	0,00	21
C14 OH	0,02	0,01	32
C16:2	0,01	0,00	35
C16:1	0,02	0,00	10
C16	0,09	0,01	11
C10 DC	0,03	0,01	22
C16:1 OH	0,01	0,00	10
C16 OH	0,01	0,00	34
C18:2	0,03	0,00	12
C18:1	0,09	0,01	7
C18	0,03	0,00	12
C12 DC	0,00	0,00	44
C18:2 OH	0,01	0,00	24
C18:1 OH	0,00	0,00	44
C18 OH	0,00	0,00	14
C16 DC	0,01	0,00	26
C18:1 DC	0,02	0,00	29

Tableau VI: Essai de répétabilité

Résultats obtenus sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques après 6 passages d'un même plasma dans la même série. CV= coefficient de variation exprimé en pourcentage. En gras sont indiqués les résultats présentant un CV <20%.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	moyenne	écart-type	CV (%)
C0	40,22	10,17	25
C2	12,59	2,63	21
C3	0,34	0,05	15
C4	0,32	0,06	20
C5:1	0,03	0,01	33
C5	0,14	0,02	17
C4 OH	0,03	0,01	41
C6:1	0,04	0,01	34
C6	0,14	0,05	35
C5 OH	0,06	0,02	36
C8:1	0,15	0,04	25
C8	0,43	0,11	25
C3 DC	0,12	0,03	21
C10:2	0,06	0,02	38
C10:1	0,26	0,09	33
C10	0,65	0,14	22
C4 DC	0,08	0,03	34
C5 DC	0,21	0,09	40
C12:2	0,02	0,00	28
C12:1	0,10	0,01	14
C12	0,12	0,03	21
C6 DC	0,02	0,00	8
C14:2	0,07	0,03	46
C14:1	0,12	0,02	21
C14	0,05	0,01	28
C8 DC	0,01	0,00	35
C14:1 OH	0,02	0,01	24
C14 OH	0,02	0,01	36
C16:2	0,01	0,00	28
C16:1	0,03	0,01	30
C16	0,10	0,03	31
C10 DC	0,04	0,01	33
C16:1 OH	0,01	0,00	34
C16 OH	0,01	0,01	46
C18:2	0,03	0,01	22
C18:1	0,10	0,03	26
C18	0,04	0,02	38
C12 DC	0,00	0,00	29
C18:2 OH	0,01	0,01	42
C18:1 OH	0,00	0,00	66
C18 OH	0,00	0,00	24
C16 DC	0,01	0,00	23
C18:1 DC	0,02	0,01	34

Tableau VII: Essai de fidélité intermédiaire

Résultats obtenus sur la quantification des acylcarnitines plasmatiques pour un même plasma analysé six fois dans six séries différentes. CV= coefficient de variation exprimé en pourcentage. En gras sont indiqués les résultats présentant un CV <35%.

3.1.5 Valeurs physiologiques

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	Moyenne	Médiane	Ecart type	Valeur minimum	Valeur maximum	5ème percentile	95ème percentile
Carnitine libre	41,12	42,30	13,19	16,70	68,00	22,94	59,12
C2	12,83	11,50	5,34	5,64	26,10	6,32	22,32
C3	0,48	0,49	0,18	0,19	0,90	0,21	0,77
C4	0,26	0,22	0,11	0,11	0,48	0,15	0,47
C5:1	0,03	0,03	0,02	0,01	0,07	0,01	0,06
C5	0,13	0,12	0,05	0,08	0,31	0,09	0,26
C4 OH	0,07	0,05	0,09	0,01	0,46	0,02	0,13
C6:1	0,04	0,03	0,02	0,01	0,08	0,02	0,07
C6	0,10	0,09	0,04	0,03	0,20	0,04	0,17
C5 OH	0,06	0,06	0,02	0,03	0,11	0,03	0,08
C8:1	0,14	0,11	0,09	0,06	0,39	0,06	0,34
C8	0,17	0,14	0,09	0,08	0,50	0,09	0,25
C3 DC	0,05	0,05	0,02	0,02	0,08	0,02	0,08
C10:2	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06	0,02	0,05
C10:1	0,15	0,13	0,07	0,05	0,36	0,06	0,29
C10	0,26	0,21	0,13	0,08	0,69	0,11	0,50
C4 DC	0,04	0,04	0,02	0,02	0,10	0,02	0,08
C5 DC	0,07	0,06	0,03	0,03	0,16	0,03	0,13
C12:2	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01
C12:1	0,06	0,06	0,03	0,02	0,14	0,03	0,11
C12	0,07	0,06	0,03	0,03	0,16	0,04	0,11
C6 DC	0,03	0,02	0,02	0,01	0,11	0,01	0,04
C14:2	0,04	0,03	0,02	0,01	0,11	0,01	0,10
C14:1	0,10	0,10	0,05	0,03	0,23	0,04	0,20
C14	0,05	0,05	0,01	0,02	0,08	0,02	0,06
C8 DC	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02
C14:1 OH	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,03
C14 OH	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,01	0,02
C16:2	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02
C16:1	0,03	0,03	0,01	0,01	0,06	0,02	0,05
C16	0,12	0,12	0,03	0,04	0,18	0,06	0,16
C10 DC	0,04	0,04	0,01	0,03	0,06	0,03	0,05
C16:1 OH	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02
C16 OH	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
C18:2	0,05	0,05	0,03	0,02	0,13	0,03	0,10
C18:1	0,18	0,17	0,06	0,06	0,30	0,08	0,29
C18	0,04	0,04	0,01	0,01	0,07	0,02	0,06
C12 DC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 OH	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01	0,03
C18:1 OH	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
C18 OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
C16 DC	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01
C18:1 DC	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02

Tableau VIII: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez l'adulte

Résultats obtenus après analyse de 25 plasmas d'adultes âgés de 16 à 93 ans, 10 hommes et 15 femmes.

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/l}$)	Moyenne	Médiane	Ecart type	Valeur minimum	Valeur maximum	5ème percentile	95ème percentile
Carnitine libre	40,88	37,40	14,35	20,40	96,90	24,51	70,80
C2	14,49	12,50	7,47	4,35	45,30	6,91	27,87
C3	0,96	0,88	0,50	0,33	2,77	0,40	1,70
C4	0,24	0,20	0,14	0,09	1,08	0,11	0,42
C5:1	0,03	0,03	0,01	0,01	0,08	0,02	0,05
C5	0,17	0,16	0,06	0,08	0,40	0,09	0,28
C4 OH	0,10	0,09	0,04	0,02	0,21	0,04	0,18
C6:1	0,04	0,03	0,01	0,02	0,08	0,02	0,06
C6	0,08	0,08	0,03	0,02	0,20	0,04	0,13
C5 OH	0,17	0,16	0,05	0,08	0,33	0,10	0,27
C8:1	0,09	0,08	0,04	0,02	0,21	0,04	0,15
C8	0,12	0,11	0,05	0,06	0,33	0,07	0,20
C3 DC	0,04	0,04	0,02	0,01	0,11	0,01	0,08
C10:2	0,05	0,04	0,02	0,00	0,14	0,02	0,09
C10:1	0,08	0,08	0,03	0,04	0,14	0,04	0,12
C10	0,14	0,12	0,08	0,05	0,41	0,06	0,29
C4 DC	0,14	0,13	0,05	0,06	0,32	0,08	0,20
C5 DC	0,05	0,04	0,02	0,01	0,10	0,02	0,08
C12:2	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,02
C12:1	0,05	0,04	0,03	0,01	0,18	0,01	0,11
C12	0,27	0,25	0,18	0,03	0,80	0,05	0,56
C6 DC	0,03	0,03	0,01	0,00	0,05	0,01	0,04
C14:2	0,08	0,04	0,08	0,01	0,30	0,02	0,25
C14:1	0,18	0,17	0,10	0,03	0,52	0,05	0,34
C14	0,28	0,26	0,12	0,08	0,77	0,13	0,50
C8 DC	0,03	0,03	0,01	0,01	0,07	0,02	0,06
C14:1 OH	0,04	0,04	0,02	0,02	0,09	0,02	0,07
C14 OH	0,03	0,03	0,01	0,01	0,06	0,01	0,05
C16:2	0,03	0,03	0,01	0,01	0,07	0,02	0,05
C16:1	0,17	0,16	0,07	0,04	0,37	0,08	0,30
C16	2,66	2,55	1,08	0,83	6,60	1,07	4,36
C10 DC	0,17	0,15	0,05	0,08	0,31	0,09	0,26
C16:1 OH	0,05	0,05	0,02	0,01	0,11	0,03	0,08
C16 OH	0,03	0,03	0,01	0,01	0,07	0,01	0,05
C18:2	0,19	0,15	0,11	0,06	0,56	0,08	0,44
C18:1	1,28	1,25	0,42	0,56	2,54	0,67	1,95
C18	0,66	0,62	0,24	0,27	1,40	0,32	1,09
C12 DC	0,03	0,03	0,01	0,01	0,06	0,02	0,05
C18:2 OH	0,02	0,02	0,01	0,01	0,06	0,01	0,04
C18:1 OH	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01	0,04
C18 OH	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02
C16 DC	0,02	0,01	0,02	0,00	0,08	0,00	0,05
C18:1 DC	0,03	0,02	0,01	0,01	0,07	0,01	0,05

**Tableau IX: Valeurs physiologiques des acylcarnitines sur sang total de nouveau-nés
(prélèvement à J3)**

Résultats obtenus après analyse de 91 prélèvements : 60 buvards de nouveau-nés dont le poids de naissance est supérieur à 2.5 kg, 21 buvards de nouveau-nés dont le poids de naissance est compris entre 1.5 et 2.5 kg et 11 buvards de nouveau-nés dont le poids de naissance est inférieur à 1.5 kg.

3.1.6 Exemples de profils d'acylcarnitines

De nombreuses conditions physiologiques, pathologiques, nutritionnelles ou médicamenteuses entraînent un profil particulier et spécifique. Voici quelques exemples :

- Sujet sain

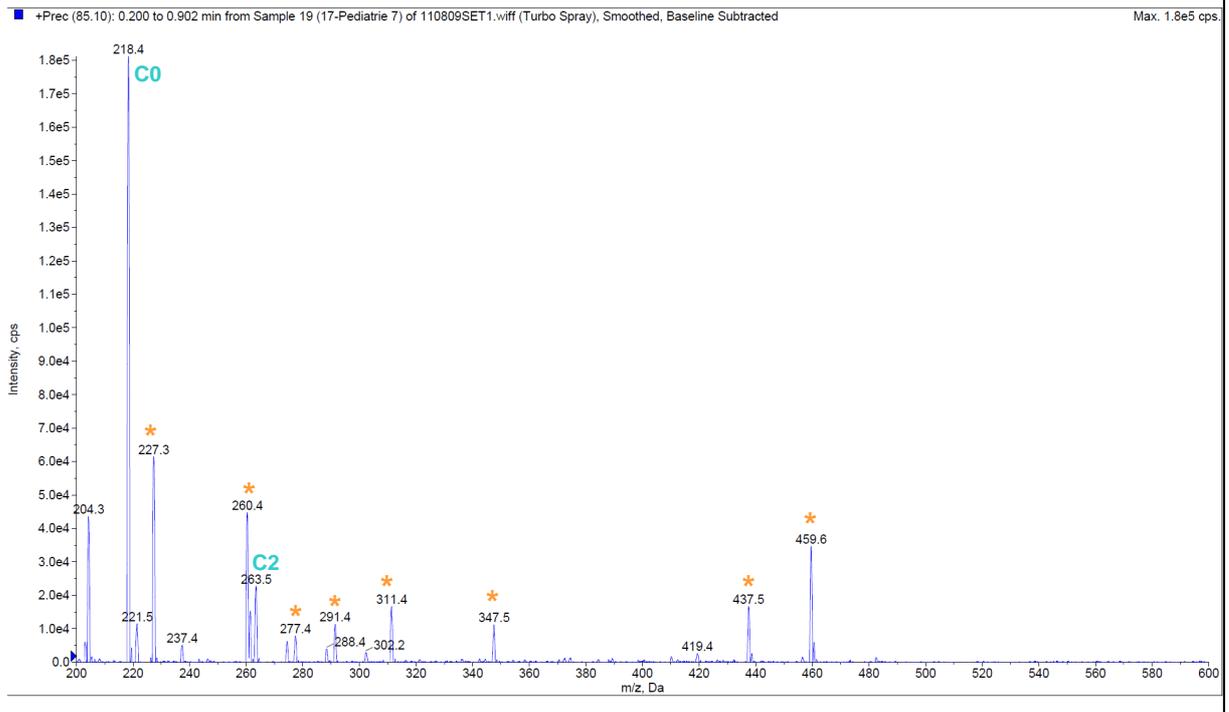


Figure 22: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un sujet sain

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx).

- Patient en hypocarnitinémie

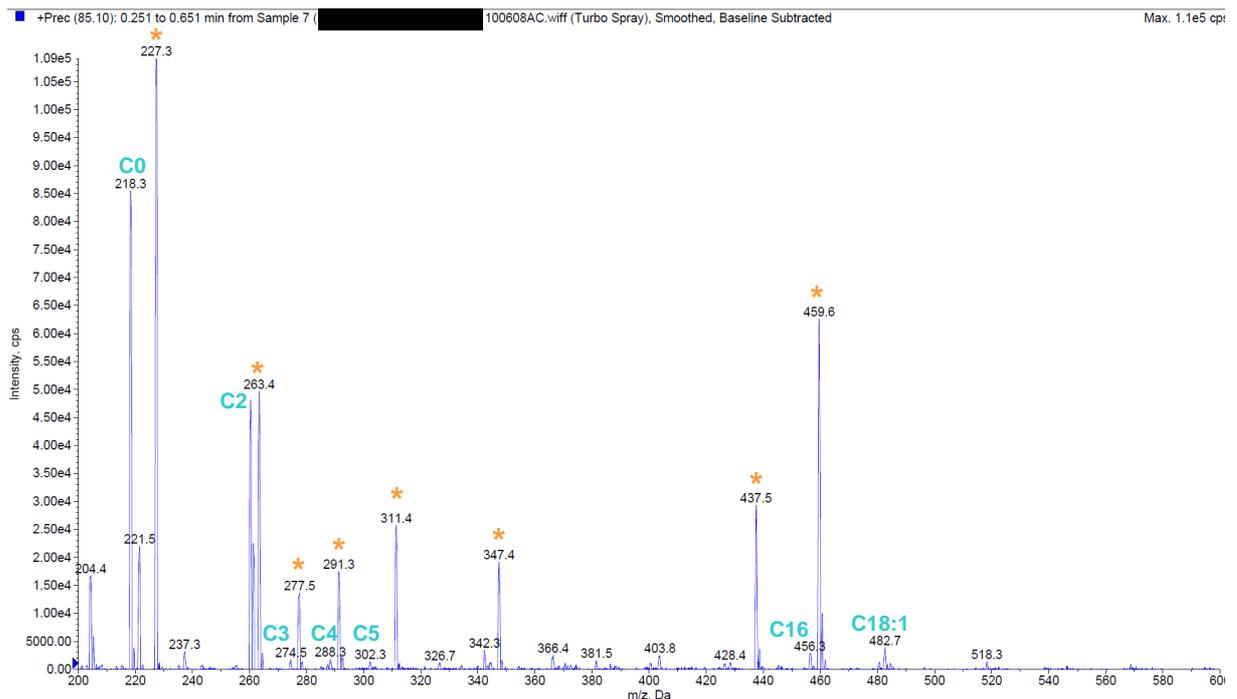


Figure 23: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient présentant une hypocarnitinémie

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (C_{xx}). On observe une diminution du signal de la carnitine libre (C0) et de l'acétylcarnitine (C2).

- Patient traité par céfotaxime (Claforan®)

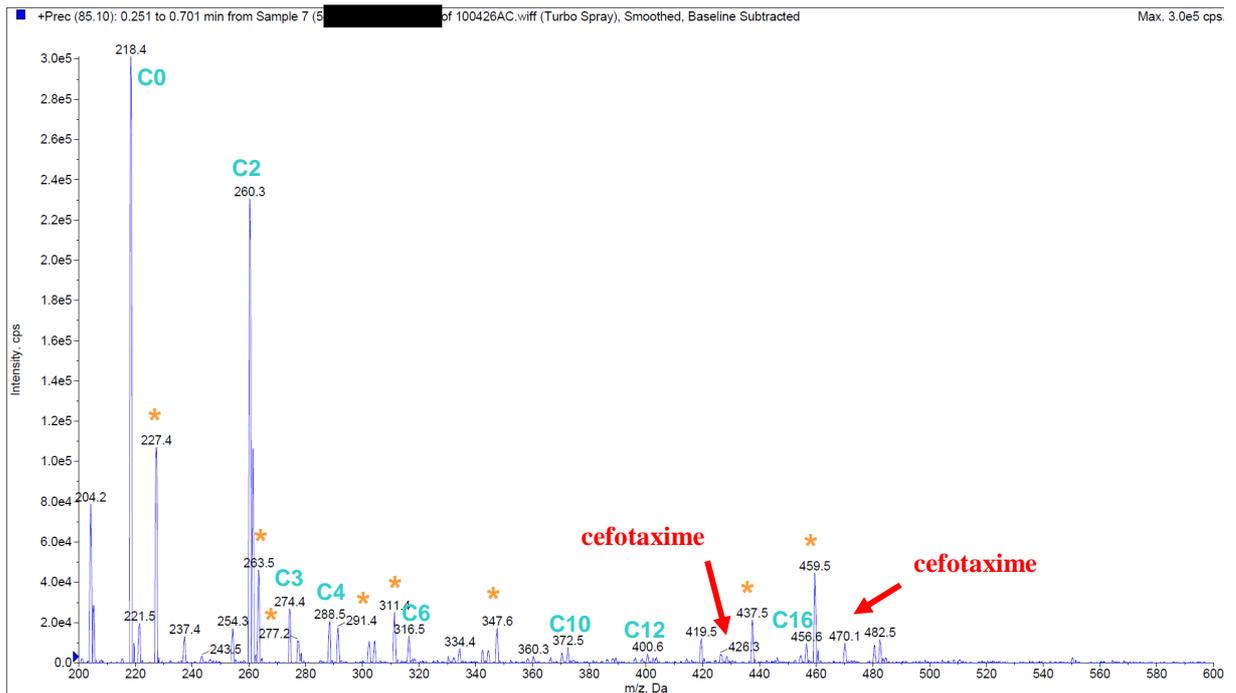


Figure 24: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient traité par céfotaxime (Claforan®)

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). On observe l'apparition de deux pics à 426 et 470 Da.

- Patient traité par épuration extra-rénale

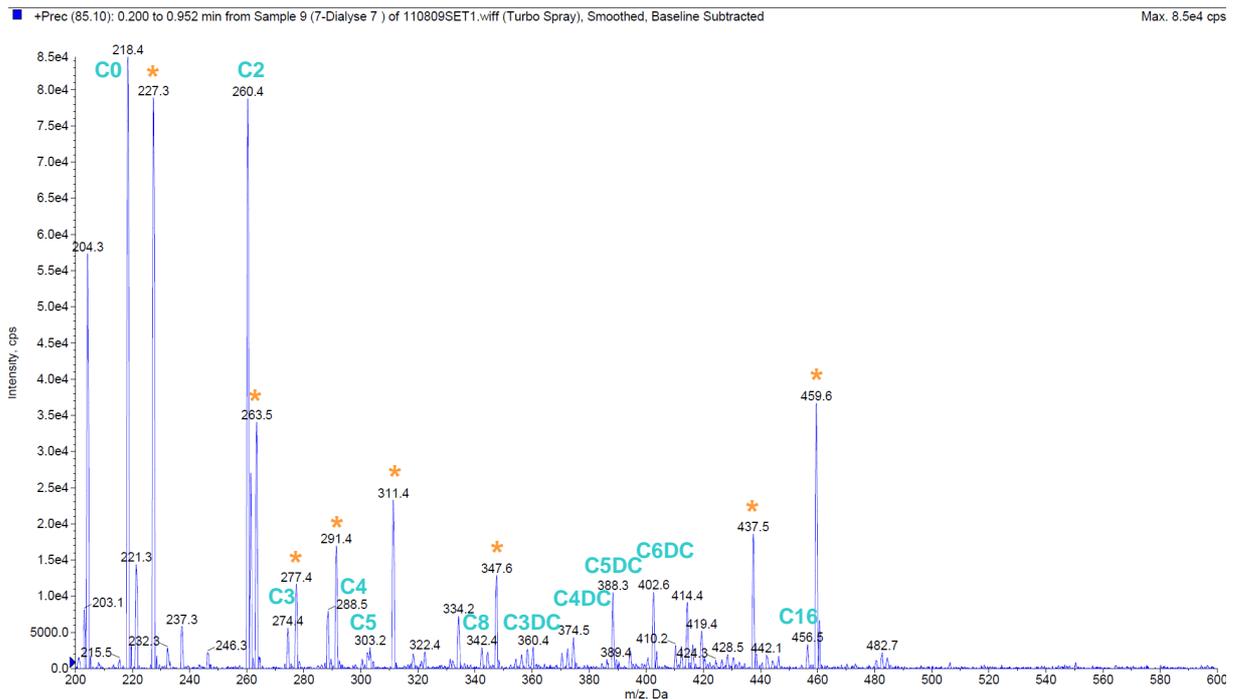


Figure 25: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient traité par épuration extra-rénale

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'élévation des dicarboxylacylcarnitines en C3, C4, C5 et C6.

- Patient en cétose

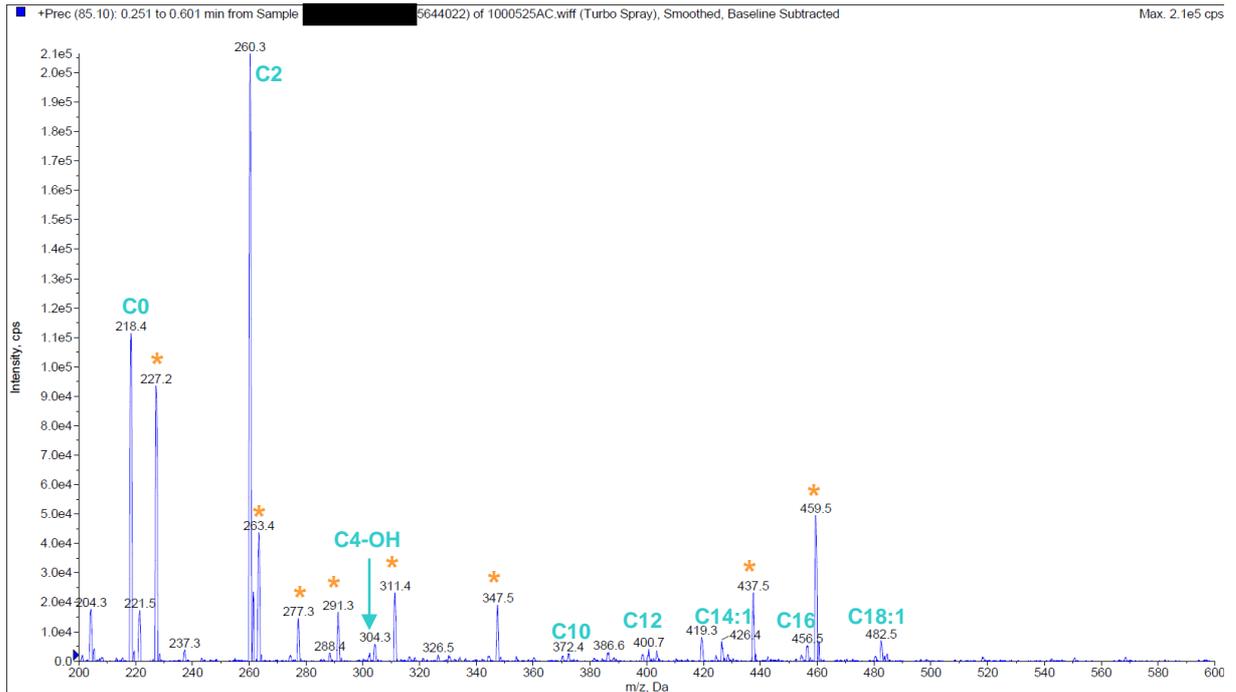


Figure 26: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient en cétose

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'élévation d'acétylcarnitine (C2) et de 3-OH-butyrylcarnitine (C4-OH), on retrouve également une augmentation des acylcarnitines à chaîne moyenne et longue (C10, C12, C14 :1, C16, C18 :1) secondaire à la cétose.

- Mort subite inattendue du nourrisson (MSIN)

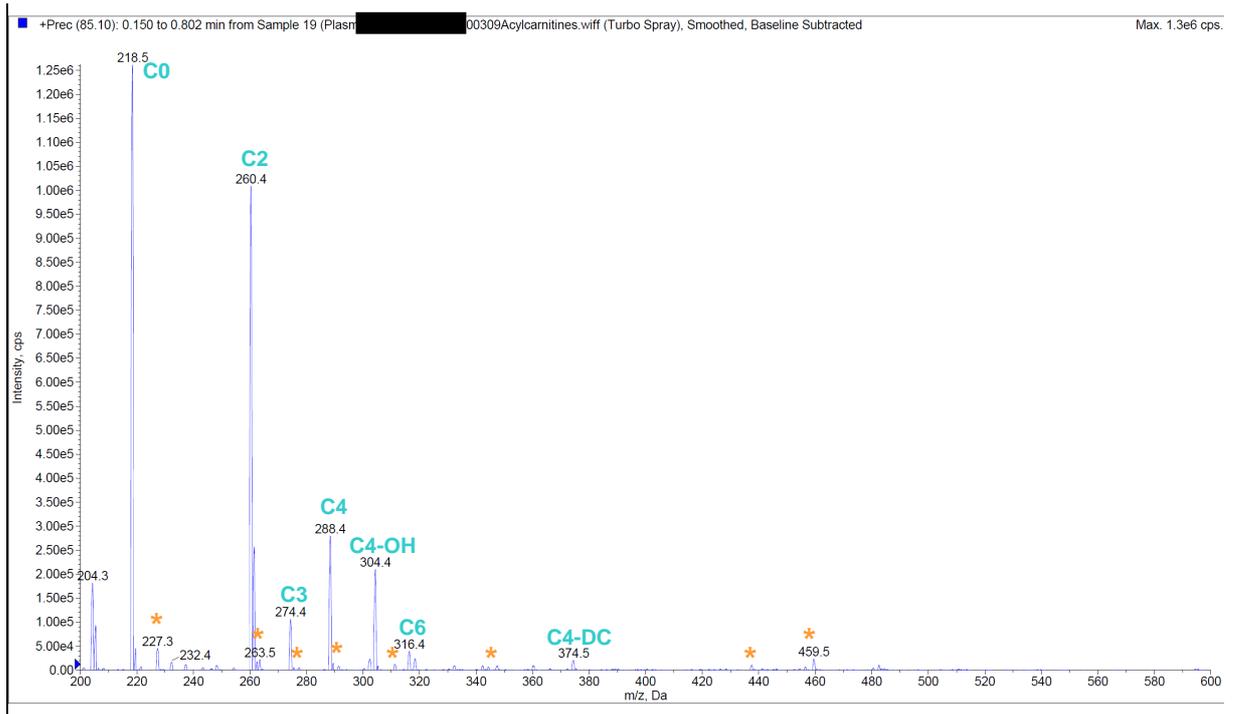


Figure 27: Exemple de profil d'acylcarnitines sériques chez un patient décédé d'une MSIN

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'élévation des chaînes courtes et des chaînes moyennes.

- Anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG

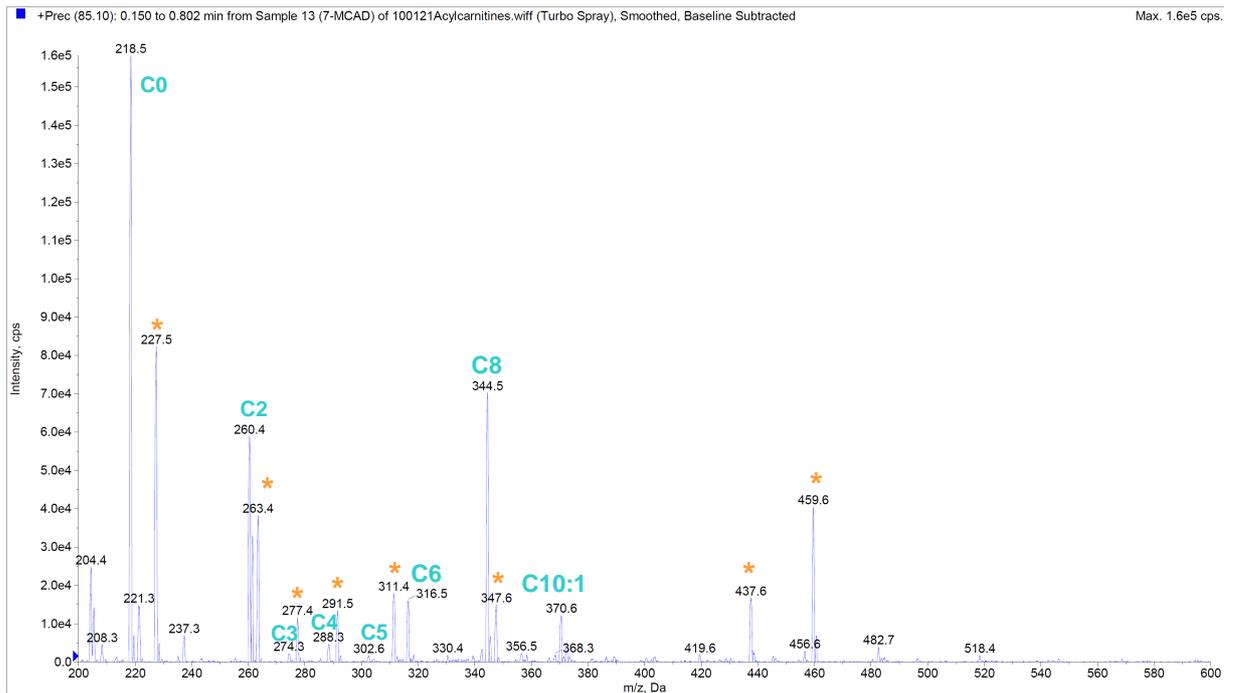


Figure 28: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'un déficit en MCAD

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'élévation de C8, C6 et C10 :1.

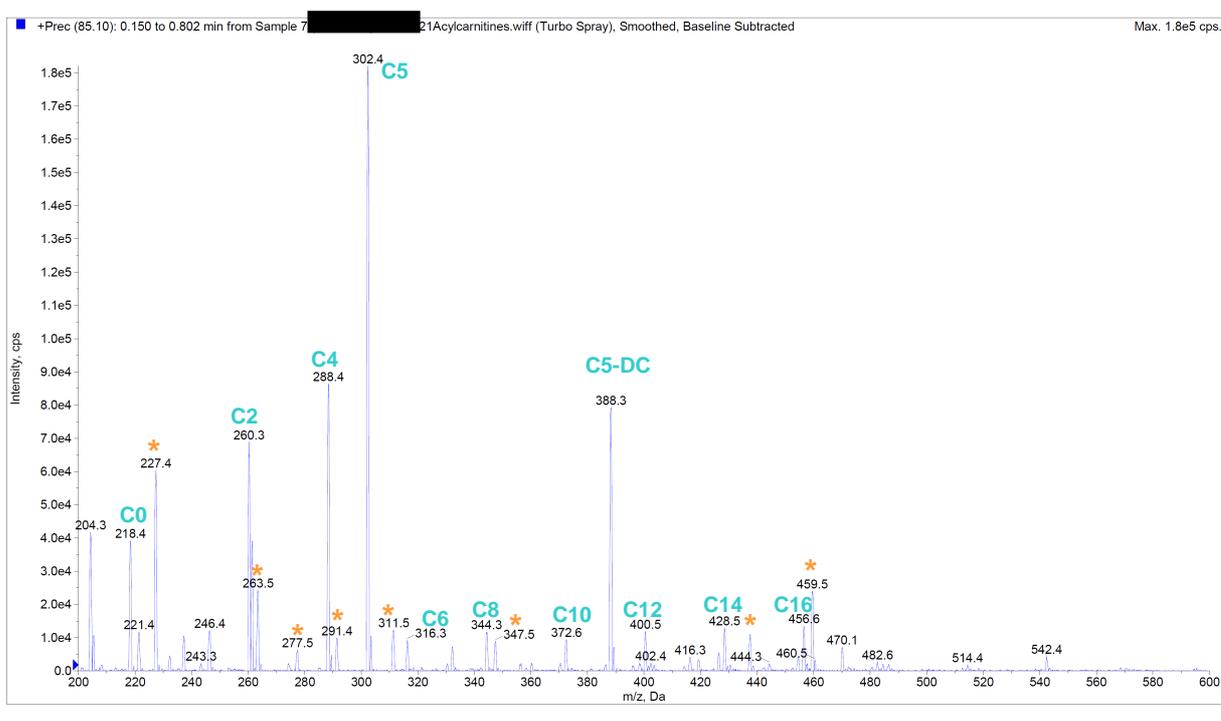


Figure 29: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'une acidurie glutarique de type 2

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'accumulation de chaînes courtes (C4), moyennes (C6, C8, C10) et longues (C12, C14, C16), d'isobutyrylcarnitine (C4), d'isovaléryl et de 2-méthylbutyrylcarnitine (C5) et de glutarylcarnitine (C5-DC).

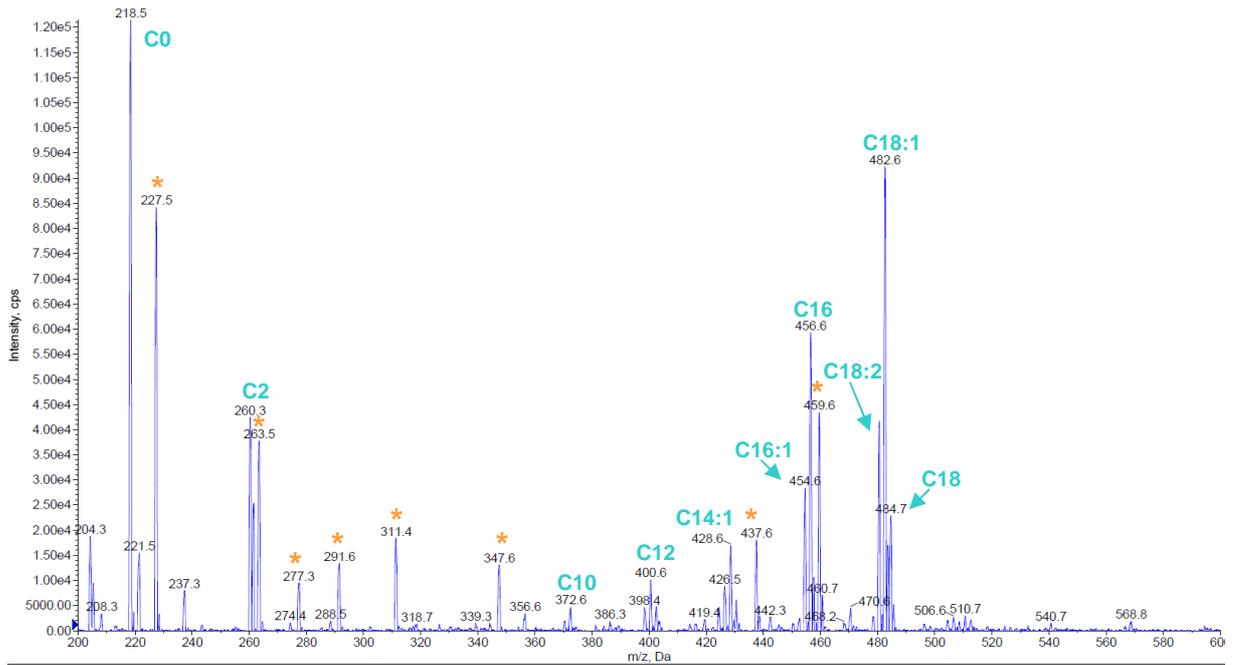


Figure 30: Exemple de profil d’acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d’un déficit en CPT2

Les pics marqués d’un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l’accumulation d’acylcarnitines en C16 et C18 (C16 :1, C16, C18 :2, C18 :1, C18).

- Aciduries organiques

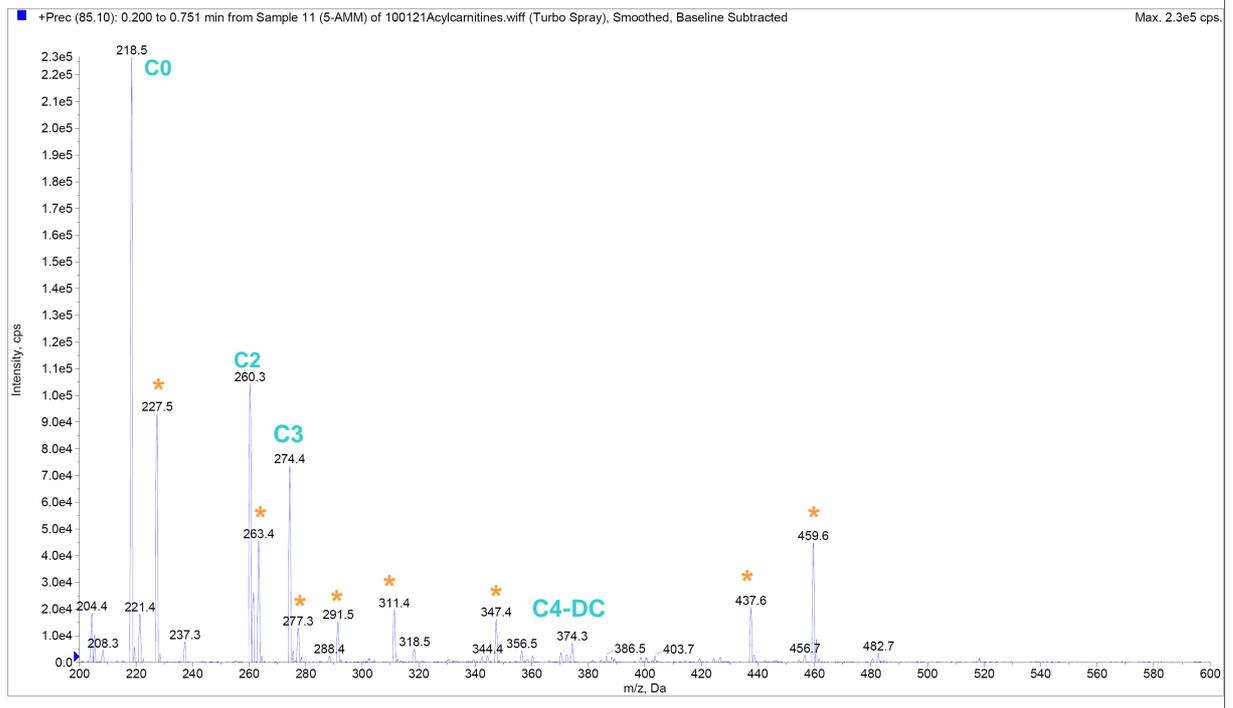


Figure 31: Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d'une acidurie méthylmalonique (AMM)

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par l'élévation de propionylcarnitine (C3) et de méthylmalonylcarnitine (C4-DC).

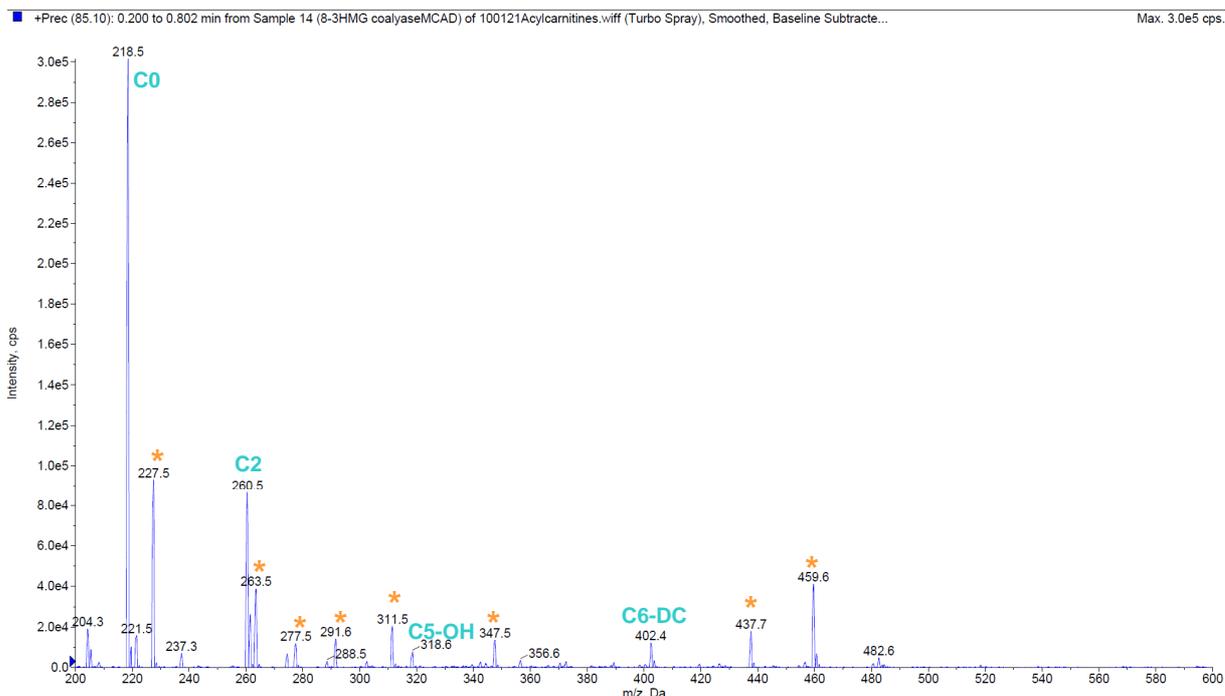


Figure 32: Exemple de profil d’acylcarnitines plasmatiques chez un patient atteint d’un déficit en 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase

Les pics marqués d’un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx). Le profil est caractérisé par la présence de 3-OH isovalérylcarnitine (C5-OH) et de méthylglutarylcarnitine (C6-DC).

Chapitre 4 Discussion

Cette étude a consisté d'une part en la mise au point technique du profil des acylcarnitines plasmatiques par MSMS et d'autre part en la validation biologique de ces profils. Le profil des acylcarnitines plasmatiques est un outil biologique incontournable dans le cadre du diagnostic de MHM et en particulier des anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG.

4.1 Technique utilisée

La technique utilisée, la MSMS, présente de nombreux avantages, et a été développée pour la détermination du profil des acylcarnitines depuis le début des années 1990. D'autres techniques ont été développées pour réaliser cette analyse (méthode radio-enzymatique, chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et électrophorèse capillaire (CE) couplées à une détection UV ou fluorimétrique), mais la MSMS reste la technique de choix pour cette analyse. En effet elle est tout d'abord sensible et spécifique, ce qui permet d'analyser de multiples métabolites à partir de faibles quantités de prélèvement (20 μ l de plasma pour le profil des acylcarnitines). De plus, la préparation de l'échantillon est très simple et l'analyse rapide, ce qui est adapté aux grandes séries. Cette technique s'adapte tout à fait aux situations nécessitant un diagnostic d'urgence, comme l'exigent certaines MHM telles que les anomalies de la β -oxydation des AG ou les aciduries organiques. Ainsi, il est possible de rendre en quelques heures un profil d'acylcarnitines et orienter la démarche diagnostique et thérapeutique.

La préparation des échantillons a été réalisée en incluant une étape de dérivatisation (butylation). L'avantage de cette dérivatisation est le gain de sensibilité, mais elle entraîne également une hydrolyse partielle des acylcarnitines. D'autres techniques existent, en particulier il est possible de réaliser l'extraction des acylcarnitines sans passer par cette étape de dérivatisation. Cette technique entraîne un gain de temps pour le rendu de résultat, cependant l'inconvénient reste la perte de sensibilité par rapport aux techniques utilisant la dérivatisation, notamment pour la détection des acylcarnitines dicarboxyliques et donc pour le diagnostic éventuel d'anomalies de la β -oxydation des AG [101]. Le choix de la méthode résulte donc du meilleur compromis possible pour l'application au laboratoire.

Les différents critères de validation de la méthode étudiés confirment la fiabilité de cette analyse. Ils démontrent en particulier que cette technique est robuste. La conservation des échantillons sur plusieurs semaines est possible (CV acceptables) (**Tableau V**). De plus, ces critères permettent à l'utilisateur d'adopter certaines attitudes de précaution.

Tout d'abord, l'analyse des résultats souligne qu'il est important de connaître l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement sanguin au moment de l'interprétation du profil des acylcarnitines. Ainsi nous avons vu qu'avec l'EDTA, le profil présente des pics supplémentaires provenant directement de l'anticoagulant (m/z de 405, 461 et 517) et surtout une diminution du signal des acylcarnitines d'intérêt diagnostique [100]. En effet, l'EDTA va se fragmenter et produire un ion fils de 85 Da ; il sera donc sélectionné par le spectromètre de masse avec le reste des acylcarnitines. Il est important de prendre en compte que la technique MSMS n'est pas parfaitement sélective pour cette analyse puisque en réalité le mode Precursor Ion Scan ne permet pas d'obtenir un profil d'acylcarnitines mais plutôt un profil de tous les ions qui après fragmentation conduisent à un ion de 85 Da. D'autre part, les analyses sur plasma hépariné ou sur sérum sont possibles et n'ont pas montré de différence significative.

Par ailleurs, il est capital de connaître les caractéristiques du plasma analysé afin de réaliser une interprétation correcte du profil observé. Ainsi, si l'indice de lactescence et l'indice ictérique ne semblent pas influencer le profil des acylcarnitines (concernant l'indice ictérique, les essais réalisés ne sont que préliminaires et nécessitent des tests complémentaires pour confirmer cette observation), il est indispensable d'avoir connaissance de l'indice d'hémolyse. En effet, nous avons pu observer que l'hémolyse perturbe le profil des acylcarnitines avec en particulier une augmentation des chaînes longues (C16, C18).

Au vu de ces éléments, il semble important d'associer à chaque série de détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques, plusieurs contrôles internes. Tout d'abord un patient témoin présentant un profil normal pour s'assurer que la série n'est pas souillée par un artefact quelconque qui pourrait perturber l'interprétation des profils. De plus l'utilisation d'un témoin pathologique peut également être intéressante pour confirmer la spécificité de la technique pour chaque série.

De plus, cette technique présente également une limite quant à la séparation des isomères. En effet, nous avons vu que le profil obtenu est celui de tous les ions qui après fragmentation conduisent à un ion de 85 Da. Dans ce contexte, les acylcarnitines isomériques (C4, C5, C4-OH et C5-OH) ne seront pas différenciées sur la base de leur masse. Ainsi, d'autres méthodes

ont été développées afin de permettre l'identification des isomères basée sur des techniques de séparation chromatographique (HPLC). Ces techniques présentent toutefois une durée d'analyse plus longue que les techniques basées sur l'injection directe (FIA). Récemment, des techniques basées sur la séparation des acylcarnitines C4 et C5 isobariques ont été développées par UPLC/MSMS (UPLC = Ultra Performance Liquid Chromatography) et pourraient être utilisées en seconde intention, après avoir réalisé le profil des acylcarnitines, en cas de profil anormal ou douteux [109].

D'autre part, il est également possible de réaliser la quantification des acylcarnitines grâce aux standards internes (deutérés) présents en quantité connue dans l'échantillon. Cette quantification est utile lorsque le profil est perturbé et présente des acylcarnitines anormales. Les critères évalués (répétabilité et fidélité intermédiaire) confirment la fiabilité de cette quantification assimilée à une estimation (CV acceptables). En effet, l'ensemble des signaux peut être quantifié, comme nous l'avons vu avec l'établissement des valeurs physiologiques, mais cette quantification est uniquement significative pour les acylcarnitines anormales présentes en grande quantité (la quantification des petites quantités étant opérateur-dépendant). De plus elle n'est utile que pour le suivi des patients et non pour le diagnostic.

De ce fait, nous avons établi des valeurs physiologiques chez l'adulte (plasma) et chez le nouveau-né sur buvard Guthrie (prélevé à J3) propres au laboratoire (**Tableaux VIII et IX**). Ces valeurs vont permettre de faciliter l'interprétation des profils. Cependant, certaines tranches d'âges (en particulier la pédiatrie) n'ont pas été évaluées et nécessitent des analyses supplémentaires.

La réalisation du profil des acylcarnitines peut se réaliser sur plasma, sérum ou sang total comme nous l'avons vu. Cette détermination est également possible dans d'autres milieux comme par exemple la bile et les urines. Il faut toutefois être vigilant car toutes les acylcarnitines ne se retrouvent pas dans ces milieux. En effet, les acylcarnitines dont la longueur de chaîne est inférieure à douze carbones seront éliminées dans les urines, les acylcarnitines à chaîne longue l'étant dans la bile. L'analyse sur la bile se réalise de la même façon que l'analyse sur sang total, en déposant le liquide sur buvard Guthrie. Pour l'analyse dans les urines, le volume d'urine utilisé sera fonction de la créatinine urinaire. Ces analyses peuvent être intéressantes dans le cadre des MSIN et compléter le diagnostic lorsque l'analyse sur le sang est difficilement interprétable [50].

L'ensemble des critères évalués se conforme aux recommandations émises par le COFRAC (Comité Français d'Accréditation) [99] dans le cadre de la validation d'une

méthode qualitative et semi-quantitative et répond aux exigences de la norme ISO 15 189 relative à l'accréditation obligatoire des laboratoires de biologie médicale. Par ailleurs, il existe un contrôle qualité européen (ERNDIM = European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism) propre aux profils des acylcarnitines et auquel le laboratoire pourra participer afin d'assurer la qualité et la performance du rendu des résultats.

4.2 Interprétation des profils obtenus

Nous avons vu que certaines interférences ont été décrites avec le profil des acylcarnitines, en particulier des interférences médicamenteuses. L'exemple d'un traitement par cefotaxime (Claforan®), présenté dans le chapitre des résultats, montre l'existence de deux pics anormaux sur le profil, de masse moléculaire 426 Da (pouvant correspondre au C14:1) et 470 Da (pouvant correspondre au C16:1OH) [102] (**Figure 24**), il est donc indispensable de connaître le traitement administré au patient pour assurer une interprétation correcte du profil. D'autres interférences médicamenteuses ont également été décrites ; voici quelques exemples : acide valproïque et valproylcarnitine (C8) [41], acid pivalique et pivaloylcarnitine (C5) [103]. D'autres composés exogènes peuvent également induire des profils atypiques comme par exemple le dextrose (contenu dans certaines perfusions) qui entraîne l'apparition de pics à 325, 399 et 473 Da [104] ou encore la crème EMLA® qui contient de la prilocaïne et de la lidocaïne qui vont produire des pics à 221 et 235 Da respectivement [105]. Enfin, certains artefacts alimentaires sont également possibles, c'est le cas par exemple d'une alimentation enrichie en triglycérides à chaîne moyenne (une augmentation des acylcarnitines à chaîne moyenne est alors observée) [106].

D'autre part, la réalisation du profil des acylcarnitines sur sang total (buvard Guthrie) est très simple. Elle présente toutefois quelques limites. En effet, la réalisation de l'analyse sur sang total entraîne l'existence d'interférences avec les membranes des globules rouges, ce qui a pour conséquences l'augmentation des deux acylcarnitines particulières : la palmitoylcarnitine (C16) et l'oleylcarnitine (C18:1). De ce fait, le diagnostic d'une forme atténuée de déficit en CPTII peut être difficile [98]. Il faut donc être très prudent quant à l'interprétation biologique de ces profils.

Dans le cadre d'une MSIN, la réalisation du profil des acylcarnitines a toute son importance. Certes le profil est perturbé (**Figure 26**) avec élévation des chaînes courtes et des

chaînes moyennes (due à la défaillance du métabolisme [107]), mais il permet dans certains cas de trouver une cause à ce décès inexpliqué. [108]. Il est important cependant de prélever les échantillons sanguins dans un délai rapide pour permettre une interprétation correcte des profils. Aussi, en cas de difficulté d'interprétation du profil, il est possible de réaliser un second profil sur le buvard Guthrie de naissance (J3). Ce contrôle permet alors d'orienter le diagnostic.

Par ailleurs, les différents profils exposés dans le chapitre résultat démontrent la nécessité de connaître un maximum de renseignements cliniques et le moment du prélèvement. En particulier il est important de prélever au moment de la crise et si besoin de réitérer le prélèvement. En effet, entre deux épisodes aigus, il est possible de retrouver un profil normal [50]. De plus certaines conditions pathologiques peuvent entraîner un profil perturbé (hypocarnitinémie, insuffisance rénale, cétose par exemple), comme le montrent les profils présentés dans les résultats (**Figures 23, 25 et 26**). En cas d'hypocarnitinémie, il est notamment impératif de réitérer le profil des acylcarnitines après supplémentation en carnitine. En effet, dans ce contexte, la majorité des pathologies est masquée du fait de la non disponibilité de la carnitine.

Le profil des acylcarnitines permet de diagnostiquer un certain nombre de pathologies. Parmi celles-ci, on retrouve les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG (**Figures 28 à 30**) et les aciduries organiques (**Figures 31 et 32**). Chaque pathologie se retrouve associée à un profil particulier. Il est donc important de connaître l'ensemble des pathologies pouvant être diagnostiquées ainsi que les anomalies associées (**Figure 33**).

Ainsi, même si l'étape de préparation des échantillons est rapide, la validation biologique des profils des acylcarnitines est beaucoup plus complexe. En effet, nous avons vu que beaucoup d'interférences sont possibles, mais une pathologie peut également présenter des profils différents en fonction du moment de prélèvement. Aussi, cette validation requiert une maîtrise des pathologies et une grande expertise.

Designation	Acylcarnitine name	Disorder	
C0 ↓	Free carnitine	Carnitine uptake defect Secondary carnitine deficiencies (e.g., in organic acidemias and FAOs)	
C0 ↑	Free carnitine	CPTI deficiency (with C16, C18 ↓)	
C3 ↑	Propionyl	Propionic acidemia Methylmalonic acidemias Succinyl-CoA synthetase deficiency	
C4 ↑	Butyryl	SCAD deficiency Formiminoglutamic aciduria (with more prominent peak at m/z 287) Ethylmalonic encephalopathy (with C5) Multiple acyl-CoA dehydrogenase (MAD) deficiency (with C5, and other longer chain species)	
C5 ↑	Isobutyryl	Isobutyryl-CoA dehydrogenase (IBD) deficiency	
	Isovaleryl	Isovaleric acidemia	
	Methylbutyryl	Methylbutyryl-CoA dehydrogenase (SBCAD) deficiency	
C4-OH ↑	3-Hydroxybutyryl	SCHAD deficiency	
C5-OH ↑	3-Hydroxyisovaleryl	3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) deficiency Holocarboxylase synthetase deficiency HMG-CoA lyase deficiency (with C6DC) Biotinidase deficiency 3-Methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency	
		3-Hydroxy-2-methylbutyryl	3-Oxothiolase deficiency (with C5:1) 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (MHBBD) deficiency
		Octanoyl	MCAD deficiency (with C6, C10, C10:1)
		Malonyl	Malonyl-CoA carboxylase deficiency
	C4DC ↑	succinyl/methylmalonyl	Succinyl-CoA synthetase (SUCLA2) deficiency
C5DC ↑	Glutaryl	Glutaric acidemia type I	
C10-OH ↑	3-Hydroxy decanoyl	M/SCHAD deficiency, MCKAT deficiency	
C14:1 ↑	Tetradecenoyl	VLCAD deficiency (with C14, C14:2)	
C16 ↑	Palmitoyl	CPTII deficiency (with C18:2, C18:1, C18) Carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency (with C18:2, C18:1, C18)	
		C16-OH ↑	3-Hydroxypalmitoyl

Figure 33: Profils d'acylcarnitines associés à différentes maladies (d'après Rinaldo, [97])

Pour chaque acylcarnitine retrouvé de façon anormale, les pathologies et les anomalies associées sont évoquées.

Comme nous l'avons vu, cette technique présente une limite quant à la séparation des isomères. Ainsi, les acylcarnitines isomériques (C4, C5, C4-OH et C5-OH) ne seront pas différenciées sur la base de leur masse. Il faut donc être très vigilant au moment de l'analyse du profil. En effet deux isomères peuvent conduire au diagnostic de deux pathologies différentes (**Tableau X**).

Acylcarnitine	Isomères	Pathologie associée
C4-OH	L-3-hydroxybutyrylcarnitine	déficit en SCHAD
	3-hydroxyisobutyrylcarnitine	déficit en 3-hydroxyisobutyryl-CoA déacylase
	D-3-hydroxybutyrylcarnitine	défaut d'utilisation des corps cétoniques
C5	2-méthylbutyrylcarnitine	déficit en 2-méthylbutyryl-CoA deshydrogénase
	isovalérylcarnitine	acidémie isovalérique
	pivaloylcarnitine	dérivé de l'acide pivalique (antibiotique)
C4	butyrylcarnitine	déficit en SCAD
	isobutyrylcarnitine	déficit en isobutyryl-CoA deshydrogénase
C5-OH	3-hydroxyisovalérylcarnitine	élevés dans 7 aciduries organiques différentes
	2-méthyl-3-hydroxybutyrylcarnitine	

Tableau X: Exemples d'acylcarnitines isomères (d'après [50, 86])

Pour chaque acylcarnitine isomérique, les différents isomères et les pathologies associées sont énoncés.

Aussi, devant tout patient présentant une hypoglycémie majeure (glucose plasmatique < 2.6 mmol/L), la piste des MHM doit être envisagée. Après avoir réalisé un bilan biochimique de base et un bilan hormonal (hyperinsulinisme), un bilan métabolique (**Tableau XI**) comprenant une chromatographie des acides organiques urinaires, une chromatographie des acides aminés plasmatiques et un profil des acylcarnitines plasmatiques permettra de cibler les pathologies entraînant une hypoglycémie avec en particulier les anomalies de la β -oxydation des AG. De plus, un trouble du cycle de l'urée, une insuffisance hépatique sévère (tyrosinémie, galactosémie par exemple), une hyperammoniémie transitoire ou une activité musculaire accrue doivent être investigués. D'autre part, lorsque les acides organiques urinaires sont évocateurs, il est primordial de connaître le contexte car la notion de cétose ou une alimentation par triglycérides à chaîne moyenne entre autres, peuvent entraîner une acidurie dicarboxylique [26].

analyse	conditions	volume
acides organiques urinaires	urines de crise ou à défaut urines du matin	5 ml
acides aminés plasmatiques	sang prélevé au moment de la crise ou à défaut à jeun	1 microtube hépariné (bouchon vert)
profil des acylcarnitines plasmatiques	sang prélevé au moment de la crise ou à défaut à jeun	1 microtube hépariné (bouchon vert)

Tableau XI: Prélèvements à réaliser dans le cadre d'un bilan métabolique suite à une hypoglycémie majeure

Enfin, la mise au point du profil des acylcarnitines a été réalisée dans le but de diagnostiquer des MHM, mais son intérêt ne se limite pas à cela et les applications fondamentales sont larges. En effet le métabolisme des AG se retrouve au carrefour de nombreuses voies métaboliques (cétogénèse, cycle de Krebs...) et la détermination du profil des acylcarnitines pourra s'avérer être un élément intéressant dans l'étude de certaines pathologies telles que le syndrome d'apnées du sommeil, l'obésité ou le diabète par exemple. De récentes études sur les modèles animaux mais également sur les hommes ont été réalisées et ont montré des modifications de profils permettant de progresser dans la compréhension du mécanisme de dysrégulation de la β -oxydation des AG dans de telles conditions pathologiques.

TITRE : «Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem : Développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme».

Conclusion

La β -oxydation des acides gras permet de répondre à un besoin énergétique important notamment pour le cœur et le muscle qui l'utilisent préférentiellement comme source d'énergie cellulaire, et est essentielle à la néoglucogénèse et la cétogénèse. On connaît aujourd'hui des déficits enzymatiques et de transporteurs touchant cette voie.

Le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme, et en particulier des anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras et des aciduries organiques, est un point clef d'un laboratoire de biochimie hospitalier car la présentation clinique de ces maladies peut relever d'un caractère d'urgence vitale (hypoglycémie, faiblesse musculaire, cardiomyopathie...).

Nous avons mis en place la détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem. Après une étape d'extraction liquide/liquide, les échantillons sont injectés directement dans le spectromètre de masse. Cette technologie est aujourd'hui largement utilisée dans le domaine de la biologie médicale et en particulier pour le diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme et présente de nombreux avantages de sensibilité, spécificité et rapidité d'analyse.

Les critères de validation de la méthode ont permis de mettre en évidence la robustesse et la fiabilité de la technique que nous pouvons réaliser sur plasma mais également sur sang total (buvard Guthrie). Nous avons également démontré les limites de cette technique avec notamment des précautions à prendre quant à l'interprétation biologique de ces profils. En effet, le profil des acylcarnitines est certes un outil diagnostique puissant capable de détecter plus d'une vingtaine de maladies, il n'en reste pas moins que son interprétation ne peut se

réaliser sans l'expertise médicale dans le domaine ni la connaissance d'un maximum de renseignements cliniques et du moment du prélèvement.

Ainsi le CHU de Grenoble est désormais en mesure de proposer un bilan complet du métabolisme intermédiaire et peut répondre de ce fait à l'urgence diagnostique des pathologies héréditaires du métabolisme.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 27 Septembre 2011

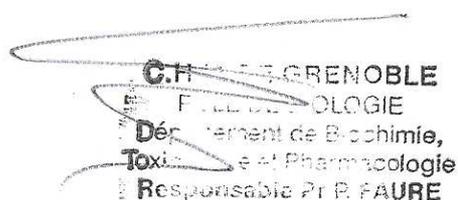
LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Patrice FAURE



Bibliographie

- [1] De Lonlay P, Djouadi F, Bonnefont JP, Saudubray JM, Bastin J. Mitochondrial beta-oxidation of fatty acids: an essential metabolic pathway of muscular function. *Arch Pediatr*. Mai 2002 ;9 Suppl 2:175s–178s.
- [2] Haute Autorité de Santé. Evaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par la technique de spectrométrie de masse en tandem en population générale en France 1er volet : dépistage du déficit en MCAD. *Recommandations en santé publique*; juin 2011.
- [3] Gulewitsch W, Krimberg R. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Über das Carnitin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 1905;45:326–330.
- [4] Tomita M, Sendju Y. Über die Oxyaminverbindungen, welche die Biuretreaktion zeigen. III. Spaltung der m-amino-b-oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponenten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 1927;169:263–277.
- [5] Bhattacharyya PK, Carter HE, Fraenkel G, Weidman KR. The identity of vitamin BT with carnitine. *Arch Biochem Biophys*. Jan 1952;35(1):241–242.
- [6] Carter HE, Bhattacharyya PK, Weidman KR, Fraenkel G. Chemical studies on vitamin BT isolation and characterization as carnitine. *Arch Biochem Biophys*. Juill 1952;38:405–416.
- [7] Fritz I. The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta Physiol Scand*. Oct 1955 Oct;34(4):367–385.
- [8] Kaneko T, Yoshida R. On the absolute configuration of L-carnitine (vitamine BT). *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1962;35:1153–1155.
- [9] Engel AG, Angelini C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome. *Science*. Mars 1973;179(76):899–902.
- [10] DiMauro S, DiMauro PM. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science*. Nov 1973;182(115):929–931.
- [11] DeVivo D, Tein I. Primary and secondary disorders of carnitine. *International pediatrics : the journal of the Miami Children's Hospital*. 1990;5:8.
- [12] Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J*. Déc 1992;6(15):3379–3386.

- [13] Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):455–473.
- [14] Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* Févr 2002 ;361(Pt 3):417–429.
- [15] Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:30.
- [16] Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem.* 1998 Aug;273(32):20378–20382.
- [17] Saleh J, Sniderman AD, Cianflone K. Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clin Chim Acta.* Août 1999;286(1-2):163–180.
- [18] Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* Oct 2010;33(5):469–477.
- [19] Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, et al. L-carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int.* Juin 2005;76(6):458–465.
- [20] McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* Févr 1997;244(1):1–14.
- [21] Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis.* Avr 2003;41(4 Suppl 4):S4–12.
- [22] Arduini A, Mancinelli G, Radatti GL, Dottori S, Molajoni F, Ramsay RR. Role of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocytes. *J Biol Chem.* Juin 1992;267(18):12673–12681.
- [23] Knoop F. Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr Chem Physiol Pathol.* 1904;6:150–162.
- [24] Université de Bordeaux (plateforme Ulysse): http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.108.b3/content/anno03.html (consulté en août 2011).
- [25] Bennett MJ. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis.* Oct 2010;33(5):533–537.
- [26] Fernandes J, Saudubray L, den Berghe GV, Walter J. *Inborn Metabolic Diseases: diagnosis and treatment*; 4ème édition. Springer; 561p; 2006.
- [27] Université de Strasbourg (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire): <http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/enseignement> (consulté en août 2011).

- [28] Académie de Montpellier: http://pedagogie.ac-montpellier.fr/Disciplinesstibiotechn documents/Fiche_corps_cetoniques.pdf (consulté en juillet 2011).
- [29] Hecketsweiler B. Voyage en biochimie : Circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique, 3ème Edition, Elsevier, 72p; 2004.
- [30] Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Nezu J, et al. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet.* Nov 1999;8(12):2247–2254.
- [31] Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci.* Nov 2004 ;1033:42–51.
- [32] Tein I, De Vivo DC, Bierman F, Pulver P, Meirleir LJD, Cvitanovic-Sojat L, et al. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res.* Sept 1990;28(3):247–255.
- [33] Cederbaum SD, Koo-McCoy S, Tein I, Hsu BYL, Ganguly A, Vilain E, et al. Carnitine membrane transporter deficiency: a long-term follow up and OCTN2 mutation in the first documented case of primary carnitine deficiency. *Mol Genet Metab.* Nov 2002 ;77(3):195–201.
- [34] Whitfield J, Smith T, Sollohub H, Sweetman L, Roe CR. Clinical effects of L-carnitine supplementation on apnea and growth in very low birth weight infants. *Pediatrics.* Mars 2003;111(3):477–482.
- [35] Belay B, Esteban-Cruciani N, Walsh C, Kaskel F. The use of levo-carnitine in children with renal disease: a review and a call for future studies. *Pediatr Nephrol.* Mars 2006 ;21(3):308–317.
- [36] Rudman D, Sewell CW, Ansley JD. Deficiency of carnitine in cachectic cirrhotic patients. *J Clin Invest.* Sept 1977;60(3):716–723.
- [37] Ahmad S. L-carnitine in dialysis patients. *Semin Dial.* 2001;14(3):209–217.
- [38] Bowyer BA, Fleming CR, Ilstrup D, Nelson J, Reek S, Burnes J. Plasma carnitine levels in patients receiving home parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* Janv 1986 ;43(1):85–91.
- [39] Ringseis R, Hanisch N, Seliger G, Eder K. Low availability of carnitine precursors as a possible reason for the diminished plasma carnitine concentrations in pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2010;10-17.
- [40] Medscape Reference: <http://emedicine.medscape.com/article/1008792> (consulté en septembre 2011).
- [41] Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiten JPN, Ijlst L, Duran M, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inheret Metab Dis.* Avr 2008 ; 31(2): 205-216

- [42] Scruggs ER, Naylor AJD. Mechanisms of zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy. *Pharmacology*. 2008;82(2):83–88.
- [43] Rose SJ, Stokes TC, Patel S, Cooper MB, Betteridge DJ, Payne JE. Carnitine deficiency associated with long-term pivampicillin treatment: the effect of a replacement therapy regime. *Postgrad Med J*. Nov 1992;68(805):932–934.
- [44] Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol*. Mars 2000;182(3):339–350.
- [45] Rhead WJ, Amendt BA, Fritchman KS, Felts SJ. Dicarboxylic aciduria: deficient [1-14C] octanoate oxidation and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts. *Science*. Juill 1983;221(4605):73–75.
- [46] Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Hall CL, Corkey BE, Yang W, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. *Pediatr Res*. Nov 1983;17(11):877–884.
- [47] Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An overview of beta-oxidation disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009;63:266–277.
- [48] Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol*. Sept 2008;15(3):140–149.
- [49] Saudubray JM, Martin D, De Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, et al. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis*. Juin 1999;22(4):488–502.
- [50] Matern D. Acylcarnitines, including In Vitro loading tests; dans *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* par Blau. N, Duran. M, Gison. KM, Elsevier, 2008:p171-206.
- [51] Wanders RJA, Ruiten JPN, Ijlst L, Waterham HR, Houten SM. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inherit Metab Dis*. Oct 2010;33(5):479–494.
- [52] Bonnefont J, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*. 2004;25(5-6):495–520.
- [53] Bournères PF, Saudubray JM, Marsac C, Bernard O, Odièvre M, Girard J. Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyl transferase deficiency. *J Pediatr*. Mai 1981;98(5):742–746.
- [54] Bennett MJ, Narayan SB, Santani AB; Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency; dir. dans: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *SourceGeneReviews [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 Jul 27 [updated 2010 Sep 07].

- [55] Bergman AJ, Donckerwolcke RA, Duran M, Smeitink JA, Mousson B, Vianey-Saban C, et al. Rate-dependent distal renal tubular acidosis and carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Pediatr Res*. Nov 1994;36(5):582–588.
- [56] Longo N, Di San Filippo CA, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. Mai 2006;142C(2):77–85.
- [57] Wieser T; Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency. Dir. dans: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *SourceGeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2004 Aug 27 [updated 2009 Jun 25].
- [58] Hug G, Bove KE, Soukup S. Lethal neonatal multiorgan deficiency of carnitine palmitoyltransferase II. *N Engl J Med*. Déc 1991;325(26):1862–1864.
- [59] Olpin SE. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Mars 2004;70(3):293–308.
- [60] Stanley CA, Hale DE, Berry GT, Deleeuw S, Boxer J, Bonnefont JP. Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N Engl J Med*. Juill 1992;327(1):19–23.
- [61] Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis*. Oct 2010;33(5):501–506.
- [62] Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonsgard JH, et al. A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. Mars 1993;191(3):1369–1372.
- [63] Bertrand C, Largillière C, Zobot MT, Mathieu M, Vianey-Saban C. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. Janv 1993;1180(3):327–329.
- [64] Leslie.N, Tinkle.B, Strauss.A, Shooner.K, Zhang.K; Very Long Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. Dir. in: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *SourceGeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 Jul 27; Initial Posting: May 28, 2009.
- [65] Sim KG, Carpenter K, Hammond J, Christodoulou J, Wilcken B. Quantitative fibroblast acylcarnitine profiles in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: phenotype/metabolite correlations. *Mol Genet Metab*. Août 2002;76(4):327–334.
- [66] Grosse SD, Khoury MJ, Greene CL, Crider KS, Pollitt RJ. The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: an update. *Genet Med*. Avr 2006;8(4):205–212.
- [67] Gregersen N, Lauritzen R, Rasmussen K. Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria. *Clin Chim Acta*. Août 1976;70(3):417–425.
- [68] Schatz UA, Ensenauer R. The clinical manifestation of MCAD deficiency: challenges towards adulthood in the screened population. *J Inherit Metab Dis*. Oct 2010;33(5):513–520.

- [69] Amendt BA, Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, et al. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients. *J Clin Invest.* Mai 1987;79(5):1303–1309.
- [70] Van Maldegem BT, Wanders RJA, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* Oct 2010;33(5):507–511.
- [71] Bennett MJ, Weinberger MJ, Kobori JA, Rinaldo P, Burlina AB. Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a new defect of fatty acid oxidation. *Pediatr Res.* 1996 Jan;39(1):185–188.
- [72] Spiekerkoetter U, Khuchua Z, Yue Z, Bennett MJ, Strauss AW. General mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either alpha- or beta-subunit mutations exhibits similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit turnover. *Pediatr Res.* Févr 2004;55(2):190–196.
- [73] Wanders RJ, Duran M, Ijlst L, De Jager JP, Van Gennip AH, Jakobs C, et al. Sudden infant death and long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Lancet.* Juill 1989 ;2(8653):52–53.
- [74] Wanders RJ, Ijlst L, Poggi F, Bonnefont JP, Munnich A, Brivet M, et al. Human trifunctional protein deficiency: a new disorder of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 1992;188(3):1139–1145.
- [75] Przyrembel H, Wendel U, Becker K, Bremer HJ, Bruinvis L, Ketting D, et al. Glutaric aciduria type II: report on a previously undescribed metabolic disorder. *Clin Chim Acta.* Janv 1976;66(2):227–239.
- [76] Olsen RKJ, Olpin SE, Andresen BS, Miedzybrodzka ZH, Pourfarzam M, Merinero B, et al. ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain.* Août 2007;130(Pt 8):2045–2054.
- [77] Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis.* Oct 2010;33(5):521–526.
- [78] Ogier de Baulny HO, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol.* Févr 2002;7(1):65–74.
- [79] Dionisi-Vici C, Deodato F, Röschinger W, Rhead W, Wilcken B. 'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(2-3):383–389.
- [80] Levrat V, Forest I, Fouilhoux A, Acquaviva C, Vianey-Saban C, Guffon N. Carglumic acid: an additional therapy in the treatment of organic acidurias with hyperammonemia? *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:2.

- [81] Dietzen DJ, Rinaldo P, Whitley RJ, Rhead WJ, Hannon WH, Garg UC, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry; executive summary. *Clin Chem*. Sept 2009;55(9):1615–1626.
- [82] Zschocke J, Hoffmann G. *Vademecum Metabolicum*. Schattauer Verlag, 168 p; 2005.
- [83] Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I—revised recommendations. *J Inherit Metab Dis*. Juin 2011;34(3):677–694.
- [84] Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Burlina AB, Burlina AP, et al. Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J Inherit Metab Dis*. Févr 2007;30(1):5–22.
- [85] Duranti G, Boenzi S, Rizzo C, Ravà L, Ciommo VD, Carozzo R, et al. Urine acylcarnitine analysis by ESI-MS/MS: a new tool for the diagnosis of peroxisomal biogenesis disorders. *Clin Chim Acta*. Déc 2008;398(1-2):86–89.
- [86] Sim KG, Hammond J, Wilcken B. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chim Acta*. Sept 2002;323(1-2):37–58.
- [87] Wan L, Hubbard RW. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer. *Clin Chem*. Avr 1998;44(4):810–816.
- [88] Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: principles and applications*. John Wiley and Sons, Ltd; 3ème édition; 2007.
- [89] Watson J. *Introduction to Mass Spectrometry*. Lippincott Raven; 3ème édition; 1997.
- [90] School of Chemistry - Bristol University: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html> (consulté en août 2011).
- [91] Bioforma: Protéomique, Spectrométrie de masse et analyses multiples; n°46 (2010).
- [92] Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2004;62(3):269–277.
- [93] Vernez L, Wenk M, Krähenbühl S. Determination of carnitine and acylcarnitines in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(11):1233–1238.
- [94] Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:17–45.
- [95] Ghoshal AK, Guo T, Soukhova N, Soldin SJ. Rapid measurement of plasma acylcarnitines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Clin Chim Acta*. Août 2005;358(1-2):104–112.

- [96] Osorio J. Effect of acetonitrile concentration on acylcarnitines measurement by tandem mass spectrometry. *Biosalud*. 2010;9 n°1:9 – 16.
- [97] Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med*. Févr 2008;10(2):151–156.
- [98] Vianey-Saban.C; Acylcarnitine profile Which method? Diagnostic value, pitfalls,... San Diego(USA) ; SSIEM 2009.
- [99] COFRAC: Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale, SH-GTA-04; avril 2011.
- [100] Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. Nov 2003;49(11):1797–1817.
- [101] Jesús VRD, Chace DH, Lim TH, Mei JV, Hannon WH. Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. Mai 2010;411(9-10):684–689.
- [102] Vianey-Saban C, Boyer S, Levrat V, Cheillan D et al. Interference of Cefotaxime in plasma acylcarnitine profile mimicking an increase of 3-hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1-OH) using butyl esters. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27 (Suppl 1):94.
- [103] Abdenur JE, Chamoles NA, Guinle AE, Schenone AB, Fuertes AN. Diagnosis of isovaleric acidaemia by tandem mass spectrometry: false positive result due to pivaloylcarnitine in a newborn screening programme. *J Inherit Metab Dis*. Août 1998 ;21(6):624–630.
- [104] SSIEM 42ème Annual Symposium, Paris, France, 6-9 September, 2005. Abstracts. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28 Suppl 1:1–262.
- [105] Kuster T, Torresani T, Kleinert P, Durka S, Neuheiser F, Heizmann CW, et al. Filter paper cards contaminated with EMLA cream produce artefacts on acylcarnitine analysis. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(5):707–709.
- [106] Iacobazzi V, Pasquali M, Singh R, Matern D, Rinaldo P, Di San Filippo CA, et al. Response to therapy in carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency due to a novel missense mutation. *Am J Med Genet A*. Avr 2004;126A(2):150–155.
- [107] Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci Int*. Janv 2007;165(2-3):165–171.
- [108] Barski R, Henderson MJ, Olpin SE, Walter JH, Williams T. Three cases of fat oxidation disorders causing sudden unexpected death in infancy that demonstrate the importance of sample timing post mortem. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34 (Suppl 3):S154.
- [109] Forni S, Fu X, Palmer SE, Sweetman L. Rapid determination of C4-acylcarnitine and C5-acylcarnitine isomers in plasma and dried blood spots by UPLC-MS/MS as a second tier

test following flow-injection MS/MS acylcarnitine profile analysis. *Mol Genet Metab.* Sept 2010;101(1):25–32.

Annexe

Annexe 1 : Interférences analytiques

Annexe 1

Interférences analytiques

Cette procédure détaille les procédés de réalisation de solutions de surcharges permettant de tester l'impact sur le dosage lié aux interférences analytiques, tel que l'hémolyse et la lactescence.

I] Hémolyse

Cette hémolyse est générée par l'hémoglobine issue de la lyse des érythrocytes. L'objectif est de créer une solution concentrée d'hémoglobine libre, à partir de laquelle des surcharges correspondants à des indices H+/H++/H+++ pourront être réalisées.

A – préparation de l'hémolysât

- Centrifuger un tube hépariné de 5 ml.
- Eliminer le plasma et prélever 400µl de globules rouges
- Ajouter 4ml de sérum physiologique
- Agiter et centrifuger 10 min
- Eliminer le surnageant et répéter cette opération de lavage encore deux fois.
- Ensuite introduire de 500µl à 2ml d'eau distillée (suivant le taux d'hémoglobine (Hb) globulaire) et congeler cette préparation pour lyser les globules.
- Centrifuger 15 min et récupérer le surnageant.

B – préparation des surcharges

	0	1	2	3	4	5
Plasma µl	450	450	450	450	450	450
Hémolysât µl	0	2.5	5	10	25	35
Na Cl µl	50	47.5	45	40	25	15
[Hb] µmol/l	0	12	24	47	118	165
Indice hémolyse	PH	H+	→	H++	→	H+++

Déterminer la concentration d'hémoglobine sur le point n°5 par la méthode de Drabkin.

III] Lactescence

La lactescence issue d'un plasma à forte concentration en lipides. De la même manière l'objectif est de réaliser une surcharge d'une solution lipidique, en l'occurrence du Média-lipide à 20%.

Média lipide :

- Triglycérides à chaîne moyenne 10g
- huile de soja 10g
- glycérol 2.5g
- lécithine d'œuf 1.2g
- Oléate de sodium 0.03g
- QSP eau ppi 100g

A – Préparation des dilutions du Média-lipide 20%

dilution	Média-lipide 20%	QSP sérum physiologique
1/10	10 ml	100 ml
1/20	5 ml	100 ml
1/40	2.5 ml	100 ml
1/80	1.25 ml	100 ml

B – Préparation des surcharges

	0	1	2	3	4
Dilution du Média-lipide	0	1/10	1/20	1/40	1/80
Média-lipide µl	0	50	50	50	50
Plasma µl	450	450	450	450	450
Na Cl µl	50	0			
[TG] mmol/l	0	5.05	2.53	1.26	0.63

Référence :

Protocole VALTEC, ABC 1986, Vol 44, p 686 à 745



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 ».

²VAN NOOLEN Laetitia

Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem :

Développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme

MOTS CLES

Acylcarnitines, β -oxydation, spectrométrie de masse en tandem, maladie héréditaire du métabolisme

RESUME

Les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras constituent un groupe à part entière des maladies héréditaires du métabolisme. On connaît environ un vingtaine de déficits qui peuvent se manifester à tout âge et de diverses manières : hypoglycémie, myocardiopathie ou épisodes de rhabdomyolyse... Leur diagnostic biochimique repose sur la détermination du profil des acylcarnitines. En effet la carnitine permet de détoxifier les acyl-coenzyme A qui s'accumulent dans la mitochondrie, on les retrouve alors sous forme d'acylcarnitines qui s'accumulent en cas d'anomalies de la β -oxydation.

Nous avons mis en place au laboratoire, la détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem. En effet, grâce à ses nombreux avantages, la spectrométrie de masse est devenue un outil diagnostique puissant indispensable à la biologie médicale actuelle. Les critères de validation de la méthode ont été analysés (stabilité, interférences analytiques, anticoagulant utilisé, répétabilité, reproductibilité...) et les limites de la technique concernant la validation biologique des profils ont également été étudiées.

Ainsi, le CHU de Grenoble est désormais en mesure de proposer un bilan complet du métabolisme intermédiaire (chromatographie des acides organiques urinaires, chromatographie des acides aminés plasmatiques, profil des acylcarnitines plasmatiques) et peut répondre à l'urgence diagnostique des pathologies héréditaires du métabolisme.

ADRESSE DE L'AUTEUR

42 rue Pierre Sépard
38000 GRENOBLE
lvannoolen@chu-grenoble.fr