



HAL
open science

**Quantification des acides aminés à chaîne ramifiée sur
tache de sang séché par spectrométrie de masse tandem
couplée à une chromatographie liquide haute
performance: intérêt dans le suivi de la leucine**

Amandine Cousin

► **To cite this version:**

Amandine Cousin. Quantification des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang séché par spectrométrie de masse tandem couplée à une chromatographie liquide haute performance: intérêt dans le suivi de la leucine. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01107415

HAL Id: dumas-01107415

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01107415v1>

Submitted on 20 Jan 2015

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

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

Université Bordeaux – Victor Segalen
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2014

N°102

Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Amandine COUSIN

Née le 19 avril 1989 à Rennes

Le 15 octobre 2014 à l'université Bordeaux 2

Titre de la thèse

Quantification des acides aminés à chaîne ramifiée sur
tache de sang séché par spectrométrie de masse tandem
couplée à une chromatographie liquide haute performance
Intérêt dans le suivi de la leucinose

Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Samir MESLI Directeur de thèse

Jury

Madame le Professeur Pascale DUFOURCQ Présidente

Madame le docteur Delphine LAMIREAU Juge

Madame le Docteur Geneviève LACAPE Juge

Remerciements

A Madame le professeur Pascale DUFOURQ, présidente 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 Monsieur le docteur Samir MESLI, mon directeur de thèse

Je vous remercie de m'avoir orientée sur l'étude effectuée et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je vous remercie également pour le temps que vous m'avez accordé malgré votre emploi du temps chargé.

A madame le docteur Delphine LAMIREAU et Geneviève LACAPE

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 monsieur Dominique Ducint

Je vous remercie de l'aide que vous m'avez apporté tout au long de cette étude expérimentale. Vos connaissances des techniques utilisées au cours de cette étude ont été précieuses à mes yeux. Vous m'avez permis de mieux appréhender la spectrométrie de masse et la chromatographie.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire de biochimie spécialisé de l'hôpital Pellegrin. Merci pour votre accueil durant ces huit mois de stage.

A parents, merci pour votre confiance sans faille et votre soutien tout au long de ces années d'étude et en particulier cette dernière année. Malgré la distance qui nous sépare vous êtes toujours près de moi.

A mon compagnon, merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ce travail. Maintenant à mon tour de te soutenir dans ta thèse

A mon frère, merci de ton soutien et de ta disponibilité

A ma belle sœur, Justine, merci pour ton soutien et pour ton aide précieuse dans la relecture de mon travail

A ma cousine Mathilde, professeur d'anglais, merci de ton aide dans la traduction de certains de mes documents anglais.

A l'ensemble de ma famille et de ma belle famille, merci de votre soutien.

A l'ensemble de mes camarades de la fac, merci pour ces six années passées.

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Introduction.....	13
PARTIE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
CHAPITRE 1 MALADIES HÉRÉDITAIRES DU MÉTABOLISME.....	16
1.1 <i>Classification des MHM</i>	17
1.1.1 Maladies métaboliques par intoxication endogène.....	17
1.1.2 Les maladies du métabolisme énergétique	18
1.1.3 Les maladies du métabolisme des molécules complexes	19
CHAPITRE 2 LES ACIDES AMINÉS	20
2.1 <i>Structure des acides aminés</i>	20
2.2 <i>Acides aminés essentiels et non essentiels</i>	21
2.2.1 Origine endogène	21
2.2.2 Origine exogène.....	22
2.3 <i>Rôles des acides aminés</i>	23
2.3.1 Rôle biosynthétique	23
2.3.2 Rôle énergétique	24
2.4 <i>Echanges inter-organes des acides aminés</i>	25
2.5 <i>Les acides aminés ramifiés</i>	26
2.5.1 Caractéristiques des acides aminés ramifiés.....	26
2.5.2 Le catabolisme des acides aminés ramifiés.....	28
CHAPITRE 3 LES AMINOACIDOPATHIES DU MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS À CHAÎNE RAMIFIÉE	30

3.1	<i>Généralités</i>	30
3.2	<i>Désordres métaboliques</i>	31
3.2.1	Acidurie isovalérique	32
3.2.2	Acidurie propionique.....	32
3.2.3	Acidurie méthylmalonique	33
CHAPITRE 4	LA LEUCINOSE OU MALADIE À ODEUR DE SIROP D'ÉRABLE	33
4.1	<i>Diagnostic clinique</i>	34
4.2	<i>Diagnostic biochimique</i>	37
4.3	<i>Prise en charge de la Leucinose</i>	38
4.4	<i>Surveillance</i>	40
4.5	<i>Pronostic</i>	40
CHAPITRE 5	ORGANISATION DU DIAGNOSTIC DES MALADIES HÉRÉDITAIRES DU MÉTABOLISME :.	41
CHAPITRE 6	LA CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS	42
6.1	<i>Principe général de la chromatographie liquide</i>	42
6.2	<i>La chromatographie d'échange d'ions</i>	43
6.3	<i>Application au dosage des acides aminés plasmatiques</i>	44
CHAPITRE 7	LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM COUPLÉE À LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE	45
7.1	<i>La spectrométrie de masse</i>	45
7.1.1	Principe de la spectrométrie de masse	45
7.1.2	La source d'ionisation.....	47
7.1.3	Les analyseurs.....	48
7.1.4	Le détecteur.....	49
7.2	<i>Chromatographie liquide haute performance (HPLC)</i>	49
7.3	<i>Spectrométrie de masse : application dans le domaine des maladies héréditaires du métabolisme</i>	50
PARTIE 2	DONNÉES EXPÉRIMENTALES	52
CHAPITRE 1	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	53
CHAPITRE 2	MATÉRIEL ET MÉTHODE	54
2.1	<i>Matériel</i>	54
2.1.1	Spectromètre de masse tandem couplé à l'HPLC	54

2.2	<i>Matériel et consommables</i>	55
2.3	<i>Méthode</i>	55
2.3.1	Echantillons	55
2.4	<i>Conditions chromatographiques</i>	56
2.4.1	Conditions chromatographiques : Phase (1)	57
2.4.2	Conditions chromatographiques : Phase (2)	57
2.4.3	Conditions chromatographiques : Phase (3)	58
2.4.4	Conditions chromatographiques : Phase (4)	58
2.4.5	Conditions chromatographiques : Phase (5)	58
2.5	<i>Résolution</i>	59
2.6	<i>Etalonnage</i>	59
2.7	<i>Contrôle de qualité interne</i>	61
2.8	<i>Préparation des échantillons (patients, étalons et contrôles de qualité)</i>	61
2.9	<i>Validation de la méthode selon la norme ISO 15189 (COFRAC) : paramètres étudiés</i>	63
2.9.1	Évaluation de la répétabilité	64
2.9.2	Évaluation de la fidélité intermédiaire	64
2.9.3	Évaluation de la contamination.....	65
2.9.4	Évaluation de la limite supérieure de la linéarité.....	65
2.9.5	Comparaison de méthodes	66
CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION		67
3.1	<i>Optimisation de la méthode chromatographique</i>	67
3.2	<i>Validation analytique</i>	79
3.2.1	Linéarité.....	80
3.2.2	Conservation des échantillons	84
3.2.3	Études de la répétabilité et de la reproductibilité	84
3.2.4	Contamination	86
3.2.5	Comparaison des méthodes.....	86
Conclusion		94
Bibliographie		96

Liste des figures

FIGURE 1 STRUCTURE GENERALE D'UN ACIDE AMINE	20
FIGURE 2 DIGESTION ET ABSORPTION DES PROTEINES	23
FIGURE 3 LE METABOLISME GENERAL DES ACIDES AMINES	24
FIGURE 4 ECHANGES INTER-ORGANES DES ACIDES AMINES EN PERIODE DE JEUNE	25
FIGURE 5 STRUCTURE DE LA L-LEUCINE	26
FIGURE 6 STRUCTURE DE LA L-ISOLEUCINE	26
FIGURE 7 STRUCTURE DE LA L-VALINE	27
FIGURE 8 STRUCTURE DE LA L- ALLOISOLEUCINE.....	27
FIGURE 9 SCHEMA DU CATABOLISME DES ACIDES AMINES RAMIFIES.....	29
FIGURE 10 INTEGRATION DES METABOLITES ISSUS DE LA VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE DANS LE CYCLE DE KREBS	30
FIGURE 11 LES DEFICITS ENZYMATIQUES DE LA VOIE DE DEGRADATION DES ACIDES AMINES A CHAINE RAMIFIEE	31
FIGURE 12 CHROMATOGRAMME D'UN PATIENT ATTEINT DE LEUCINOSE	37
FIGURE 13 PYRAMIDE D'ORGANISATION DU DIAGNOSTIC DES MHM SELON RICQUIER ..	42
FIGURE 14 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ECHANGE D'ION POUR LE DOSAGE DES ACIDES AMINES	45
FIGURE 15 SCHEMA D'UN SPECTROMETRE DE MASSE TANDEM	47
FIGURE 16 PRINCIPE DE L'ELECTROSPRAY (ESI)	48
FIGURE 17 PRINCIPE DE L'HPLC	50
FIGURE 18 EXEMPLE D'UN DEPOT DE SANG SUR PAPIER BUVARD TYPE GUTHRIE	56
FIGURE 19 RESOLUTION DES PICS EN CHROMATOGRAPHIE.....	59
FIGURE 20 CONSERVATION DES PAPIERS BUVARD « ETALONS »	60
FIGURE 21 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS	62
FIGURE 22 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION TEST CONTENANT DE LA VALINE, ISOLEUCINE, LEUCINE AVEC LES CONDITIONS PHASE 1.	70
FIGURE 23 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UN MELANGE DE VALINE, LEUCINE, ISOLEUCINE	71

FIGURE 24 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION DE VALINE, LEUCINE, ISOLEUCINE	73
FIGURE 25 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'ELUTION D'UN MELANGE DE VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE	74
FIGURE 26 SPECTRE ET CHROMATOGRAMMES D'ELUTION D'UN MELANGE LEUCINE, VALINE, ISOLEUCINE.	76
FIGURE 27 PROFIL ACIDES AMINES (COURT) OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE D' ECHANGE D'IONS (JEOL AMINOTAC®).....	77
FIGURE 28 PROFIL ACIDES AMINES LONG OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE D' ECHANGE D'IONS (JEOL AMINOTAC®).....	77
FIGURE 29 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UN MELANGE LEUCINE, VALINE, ISOLEUCINE ET ALLOISOLEUCINE.	79
FIGURE 30 DROITE DE CALIBRATION : VALINE	81
FIGURE 31 LINEARITE DU DOSAGE DE LA VALINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS.....	81
FIGURE 32 DROITE DE CALIBRATION : ISOLEUCINE	82
FIGURE 33 LINEARITE DU DOSAGE DE L'ISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS.....	82
FIGURE 34 DROITE DE CALIBRATION : LEUCINE	83
FIGURE 35 LINEARITE DU DOSAGE DE LA LEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS.....	83
FIGURE 36 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE LA VALINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®).....	88

FIGURE 37 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE LA LEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®)..... 89

FIGURE 38 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE L'ISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®)..... 89

FIGURE 39 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE L'ALLOISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®)..... 90

Liste des tableaux

TABLEAU I RECAPITULATIF DES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DE LEUCINOSE SELON STRAUSS ET MORTON [31]	36
TABLEAU II TRANSITION D'ACQUISITION DES ACIDES AMINES ET DES ETALONS DEUTERES CORRESPONDANT	54
TABLEAU III PROTOCOLE DE PREPARATION DES ETALONS	60
TABLEAU IV PROTOCOLE DE PREPARATION DES CIQ	61
TABLEAU V VALIDATION D'UNE METHODE QUANTITATIVE DE PORTEE B SELON LE GUIDE SH-GTA-04 [51].....	63
TABLEAU VI GRADIENT DE CONCENTRATION 1 ^{ER} ESSAI	69
TABLEAU VII GRADIENT DE CONCENTRATION 2EME ESSAI	70
TABLEAU VIII 3 ^{EME} GRADIENT DE CONCENTRATION	72
TABLEAU IX 4 ^{EME} GRADIENT DE CONCENTRATION	73
TABLEAU X 5 ^{EME} GRADIENT DE CONCENTRATION	75
TABLEAU XI REPETABILITE DU DOSAGE DES ACIDES AMINES VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE PAR LC-MS/MS.....	85
TABLEAU XII FIDELITE INTERMEDIAIRE DU DOSAGE DES ACIDES AMINES VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE PAR LC-MS/MS.....	85

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

ALA : Alanine

ALAT : Alanine Amino-Transférase

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)

ASAT : Aspartate Amino-Transférase

ATP : Adénosine Tri phosphate

BCAA : Branched-Chain Amino-Acids, acide aminé à chaîne ramifiée

BCAT: Branched Chain Amino acid Transaminase

BCKDH : Branched-Chain alpha Keto acid Dehydrogenase complex, déshydrogénase des alpha-céto acide à chaîne ramifiée

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CEI : Chromatographie Echange d'ions

CoA: Coenzyme A

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CV%: Coefficient de Variation

DNPH : DiNitroPhénylhydrazine

EEQ : Contrôle externe de qualité

ESI : ElectroSpray Ionisation)

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

GLY: Glycine

HCl : Acide Chlorhydrique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography, chromatographie liquide haute performance

ILEU : Isoleucine

IVA : Isovaleric Aciduria, acidurie isovalérique

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LC-MS/MS : Spectrométrie de Masse en tandem couplée à une Chromatographie Liquide

LEU : Leucine

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MHM : Maladie Héritaire du Métabolisme

MMA : Methylmalonic aciduria, acidurie méthylmalonique

MRM : Multiple Reaction Monitoring

Leucinose : Marple Syrup Urine Disease (MSUD), maladie à odeur de sirop d'érable

PA : Propionyl Aciduria, acidurie propionique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFPA : Acide Perfluoroperacétique pentanoïque

PHE : Phénylalanine

SER : Sérine

TYR : Tyrosine

VAL : Valine

Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) ou erreurs innées du métabolisme sont des maladies rares, mais nombreuses. Environ 500 maladies sont identifiées. Ce nombre ne cesse d'augmenter avec le développement des techniques d'identification biochimiques, enzymatiques et moléculaires. Ces affections résultent de mutations de gènes codant pour des protéines le plus souvent douées d'activité enzymatique, ou bien pour des transporteurs ou des protéines de structure. Du point de vue biochimique, ces maladies sont classées en deux grands groupes :

- 1- Les maladies héréditaires du métabolisme intermédiaire (anomalies du métabolisme des acides aminés ou de la bêta-oxydation des acides gras etc...).
- 2- Les maladies du métabolisme des molécules complexes (maladies du lysosome, maladies du péroxysome etc...).

La Leucinose, également appelée maladie à odeur de Sirop d'érable fait partie du groupe des maladies héréditaires du métabolisme intermédiaire. Elle a été décrite pour la première fois en 1954, par le docteur Menkes [1]. Il s'agit d'une aminoacidopathie à transmission autosomique récessive qui résulte de mutations sur les gènes codant pour le complexe enzymatique de la déshydrogénase des α -cétoacides à chaîne ramifiée (BCKDH : branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase). Ce complexe enzymatique catalyse la décarboxylation oxydative des acides aminés à chaîne ramifiée : valine, leucine et isoleucine. Le déficit enzymatique de ce complexe entraîne une accumulation de ces trois acides aminés ramifiés et des α -cétoacides correspondants dans le sang, les urines et les tissus. Les manifestations cliniques de la leucinose apparaissent dans les premiers jours ou les premières années de vie, avec au premier plan une symptomatologie neurologique. La prise en charge thérapeutique du patient est principalement diététique avec la mise en place de mesures strictes limitant les apports en protéines animales et végétales [apport contrôlé en acides aminés ramifiés (leucine, valine et isoleucine)].

Le suivi biologique se fait principalement par le dosage plasmatique des acides aminés à chaîne ramifiée, permettant ainsi une adaptation du régime [2]. La répétition des consultations, la surveillance biologique régulière et la prévention des décompensations ont un retentissement sur la vie quotidienne des enfants. Actuellement, le dosage plasmatique des acides aminés à chaîne ramifiée se fait par chromatographie d'échange d'ions sur un analyseur d'acides aminés. Le déplacement de l'enfant s'impose au centre de prélèvement de l'hôpital pour une prise de sang au pli du coude. La technique actuellement utilisée au laboratoire n'offre pas la possibilité de quantifier les acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang.

Le secteur des maladies héréditaires du métabolisme du laboratoire de Biochimie (hôpital Pellegrin) dispose d'un nouvel outil diagnostique qui est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cet outil permet l'analyse des acides aminés et des acylcarnitines sur divers liquides biologiques comme le plasma, l'urine et sur tache de sang séché sur papier buvard. Cette plateforme technologique est utilisée pour le diagnostic et le suivi d'un nombre important de maladies héréditaires du métabolisme dont les anomalies de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras et les aminoacidopathies.

Notre objectif est de mettre au point l'analyse quantitative des acides aminés ramifiés (leucine, valine et isoleucine) sur sang déposé sur papier buvard par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le prélèvement capillaire est moins invasif, moins traumatique pour l'enfant et plus rapide qu'une prise de sang conventionnelle. Il est réalisé à domicile par les parents puis expédié au laboratoire par courrier postal. La mise en place de cette nouvelle technique d'analyse au laboratoire, va obligatoirement améliorer la qualité de vie de ces enfants.

Après une synthèse bibliographique sur les acides aminés ramifiés, sur les MHM en général et plus particulièrement la leucinose ainsi que sur la LC-MS/MS, nous aborderons la partie expérimentale qui aura deux objectifs :

- 1- La mise au point du dosage des acides aminés à chaîne ramifiée par LC-MS/MS sur sang déposé sur papier buvard
- 2- La validation de la méthode analytique selon la norme ISO 15189.

Partie 1 Synthèse bibliographique

Chapitre 1 Maladies héréditaires du métabolisme

Les maladies héréditaires du métabolisme sont des maladies génétiques rares. Elles se transmettent généralement selon le mode autosomique récessif. Elles sont dûes à des mutations de gènes codant pour des protéines (enzymes, transporteurs ou protéines de structure) impliquées dans des voies métaboliques diverses. Les maladies héréditaires du métabolisme les plus fréquentes sont secondaires à une accumulation toxique de métabolites, ou correspondent à un dysfonctionnement du métabolisme des molécules complexes ou encore à un déficit de type énergétique. Ces affections concernent chacune moins de 1 naissance sur 10 000 [3]. En revanche leur incidence cumulée est plus élevée et estimée à 1 naissance sur 5000 dans l'Union européenne, avec parfois des variations en fonction des populations [4].

Ces pathologies se révèlent le plus souvent à l'âge pédiatrique. D'autres formes moins graves, apparaissent plus tardivement à l'adolescence ou à l'âge adulte.

Certaines de ces affections sont létales. Cependant depuis plusieurs années, le nombre de maladies traitables ne cesse d'augmenter [5]. L'efficacité de la prise en charge dépend de la rapidité du diagnostic. Une collaboration étroite entre les cliniciens et les biochimistes spécialisés est indispensable pour optimiser le diagnostic et la prise en charge des patients [3]. De plus, la connaissance de formes moins sévères d'apparition plus tardive à l'adolescence ou à l'âge adulte s'est considérablement accrue [6-16].

1.1 Classification des MHM

La classification physiopathologique des MHM comporte trois grands groupes : les maladies par intoxication, les maladies par carence énergétique et les maladies par déficit de synthèse ou de catabolisme des molécules complexes. Les deux premiers groupes comportent la plupart des maladies du métabolisme intermédiaire [5]. Ces dernières constituent une urgence métabolique.

1.1.1 Maladies métaboliques par intoxication endogène

Dans ce groupe, l'accumulation progressive d'un ou de plusieurs composés (acides aminés, acides organiques, ammoniac, métaux...) entraîne une intoxication responsable d'une symptomatologie clinique aiguë ou chronique [5]. Les principales affections de ce groupe sont les :

- 1- aminoacidopathies avec notamment la phénylcétonurie ; qui fait l'objet d'un dépistage néonatal systématique ; la leucinose, la tyrosinémie héréditaire, les homocystinuries, l'hyperglycémie sans cétones etc. Ces affections sont diagnostiquées par chromatographie des acides aminés plasmatiques et urinaires [5].
- 2- Les aciduries organiques : l'acidurie méthylmalonique, propionique et isovalérique, le déficit multiple en carboxylase, l'acidurie glutarique de type 1 etc... Leur diagnostic est basé sur l'analyse des acides organiques urinaires par chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à une spectrométrie de masse, et sur l'étude du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse tandem [17].
- 3- Les déficits du cycle de l'urée sont responsables d'une hyperammoniémie (Exemple du déficit en ornithine carbamyl transférase).

- La prise en charge des aminoacidopathies, des aciduries organiques et de l'hyperammoniémie, est essentiellement diététique et repose sur une restriction protidique associée à des substituts nutritifs à base d'acides aminés, en excluant le(s) acide(s) aminé(s) toxique(s), supplémentés par des minéraux et des vitamines etc... [5].
- 4- La galactosémie congénitale par déficit d'une enzyme du métabolisme du galactose est caractérisée par l'accumulation de galactose, de galactitol et de galactose-1-Phosphate. Le traitement repose sur la suppression des apports en galactose [5].

1.1.2 Les maladies du métabolisme énergétique

Dans ce groupe d'affections, les symptômes sont dûs à un défaut de production ou d'utilisation de l'énergie [5]. Les manifestations cliniques sont graves et souvent variables ce qui rend leur diagnostic difficile. Ce groupe comporte :

- 1- les glycogénoses hépatiques ou musculaires pouvant se manifester à l'âge pédiatrique ou à l'âge adulte.
- 2- Les déficits héréditaires de l'oxydation mitochondriale des acides gras. La symptomatologie est très variable allant de défaillances multi-viscérales néonatales sévères à des maladies asymptomatiques. L'hypoglycémie sans cétose est un symptôme cardinal révélateur de ces pathologies. Leur diagnostic est basé sur l'analyse des acides organiques urinaires par chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse et par l'analyse du profil des acylcarnitines par spectrométrie de masse tandem [5].
- 3- Les déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale se révèlent à tout âge et touchent n'importe quel organe avec une symptomatologie très variable [18]. Le diagnostic de ces pathologies est complexe et repose sur la mise en évidence d'une hyperlactacidémie, sur l'étude de la chaîne respiratoire et sur l'aspect histologique et histo-enzymatique de la biopsie musculaire [5].
- 4- Les déficits des enzymes du carrefour du pyruvate, les anomalies du cycle de Krebs, les déficits du métabolisme des corps cétoniques et les anomalies

de la biosynthèse de la créatine sont également responsables de déficit énergétique [19].

1.1.3 Les maladies du métabolisme des molécules complexes

Ce groupe correspond à des déficits de synthèse ou de catabolisme des molécules complexes. Ce sont des pathologies d'évolution progressive. On retrouve principalement :

- 1- les maladies du lysosome caractérisées par l'accumulation progressive de substrats (sphingolipides, oligosaccharides, mucopolysaccharides) dont le catabolisme est perturbé par le déficit en hydrolases lysosomales [20]. La plupart des maladies du lysosome débutent dans la première enfance avec une évolution rapide vers le décès. Cependant dans certaines formes moins sévères, l'apparition de la maladie est plus tardive avec une atteinte neurologique ou systémique [5].
- 2- Les maladies peroxysomales sont liées à des anomalies de la synthèse des éthers lipides, des plasmalogènes, du cholestérol et des acides biliaires mais aussi secondaires à des anomalies de la dégradation des acides gras à très longues chaînes et des acides gras ramifiés (acide phytanique). La plupart de ces affections débutent précocement et sont souvent fatales. [5].
- 3- De nombreuses enzymes contrôlent la glycosylation des protéines. Les déficits de la glycosylation des protéines sont regroupés sous le nom de CDG syndrome et se manifestent le plus souvent dans la première année de vie ou bien plus tardivement chez l'adulte avec des atteintes neurologiques ou hépatiques [21].

Chapitre 2 Les acides aminés

2.1 Structure des acides aminés

Les acides aminés sont des molécules constituées d'une fonction amine (-NH₂) et d'une fonction carboxylique (-COOH), portées par un carbone α, et d'une chaîne latérale [22]. Le carbone α est asymétrique sauf pour la glycine où il possède deux substituants hydrogène. La distinction entre les différents acides aminés se fait par la chaîne latérale plus ou moins complexe qui leur confère des propriétés physico-chimiques différentes [23].

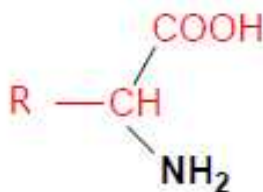


FIGURE 1 STRUCTURE GENERALE D'UN ACIDE AMINE [24]

La chaîne latérale (R) peut être simple (Alanine), ramifiée (Leucine, isoleucine, valine), hydroxylée (Sérine, Thréonine) soufrée (Cystéine, Méthionine), dicarboxylique (asparagine, aspartate, glutamate), avec un groupement amine supplémentaire (glutamine, lysine, arginine), aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) ou avec un groupement imine (histidine et proline). La glycine est l'acide aminé le plus simple avec un atome d'hydrogène pour substituant latéral [23].

2.2 Acides aminés essentiels et non essentiels

On distingue trois groupes d'acides aminés :

- i) Les acides aminés essentiels ou indispensables ne peuvent être synthétisés de novo par l'organisme par manque de précurseur ou d'enzyme de synthèse. L'alimentation est la seule source d'apport. Ils sont au nombre de huit : l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine.
- ii) Les acides aminés non-essentiels sont des acides aminés synthétisés dans l'organisme et dont l'apport ne dépend pas uniquement de l'alimentation. Il s'agit de : l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'aspartate, la cystéine, la glutamine, le glutamate, la glycine, l'histidine, la proline, la sérine, et la tyrosine.
- iii) Deux acides aminés, l'histidine et l'arginine, sont dits semi-essentiels car seuls les nourrissons ont besoin d'un apport exogène (on les trouve dans le lait maternel) [25].

Les acides aminés proviennent donc de deux sources : une source endogène avec la synthèse de novo ou le turnover des protéines et une source exogène alimentaire [23]. En moyenne 75 g des apports quotidiens en acides aminés proviennent de l'alimentation et 225 g sont issus de la dégradation des protéines endogènes [25].

2.2.1 Origine endogène

Les protéines sont renouvelées en permanence par des mécanismes consommateurs d'énergie associant synthèse et catabolisme (turnover). Le renouvellement des protéines musculaires et hépatiques représente respectivement environ 20% et 10% du renouvellement protéique total. La majorité des protéines ont une durée de vie courte, notamment celles intervenant dans la régulation du métabolisme. Ces protéines sont rapidement dégradées pour activer ou inhiber une voie de signalisation. Les cellules éliminent des protéines nouvellement synthétisées

présentant un défaut et qu'il est nécessaire de dégrader rapidement afin d'éviter toute accumulation et agrégation [26]. La dégradation de ces protéines passe par deux systèmes différents en fonctions des tissus et des conditions cataboliques :

- 1- Le système lysosomal qui est très actif dans le foie et le rein et qui fonctionne selon un mécanisme autophage, global, non sélectif et régulé par l'insuline, le glucagon et les acides aminés [25].
- 2- Le système ubiquitine-protéasome qui est un processus protéolytique ubiquitaire avec une activité ciblée sur les protéines altérées ou qui ne sont plus utiles [25]. L'ubiquitine, est une petite protéine, qui se fixe et marque de façon covalente les protéines destinées à la destruction [26]. Une fois marquées, les protéines seront dégradées par un complexe ATP-dépendant, appelé protéasome. Ce dernier dispose d'un site spécifique qui reconnaît l'ubiquitine et la fixe spécifiquement afin de ne dégrader que les protéines ubiquitinylées. Ce complexe enzymatique aboutit à la libération de peptides constitués de sept à neuf résidus qui seront ensuite dégradés par d'autres protéases pour libérer des acides aminés individuels. L'ubiquitine est quant à elle recyclée afin de marquer une autre protéine [26].

2.2.2 Origine exogène

Les protéines alimentaires constituent une source importante d'acides aminés. La digestion des protéines commence dans l'estomac où l'acidité du milieu permet de dénaturer les protéines afin de faciliter la protéolyse. La pepsine est l'enzyme protéolytique majeure de l'estomac [26]. La dégradation se poursuit dans le duodénum par l'intermédiaire d'endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, etc...) et d'exopeptidases (carboxypeptidases, aminopeptidases), pour aboutir à la libération d'acides aminés libres et de di-peptides ou tri-peptides [25]. Ces molécules seront alors absorbées par les entérocytes, où une grande partie sera transformée, puis relarguée dans le sang pour être absorbée par d'autres tissus [26].

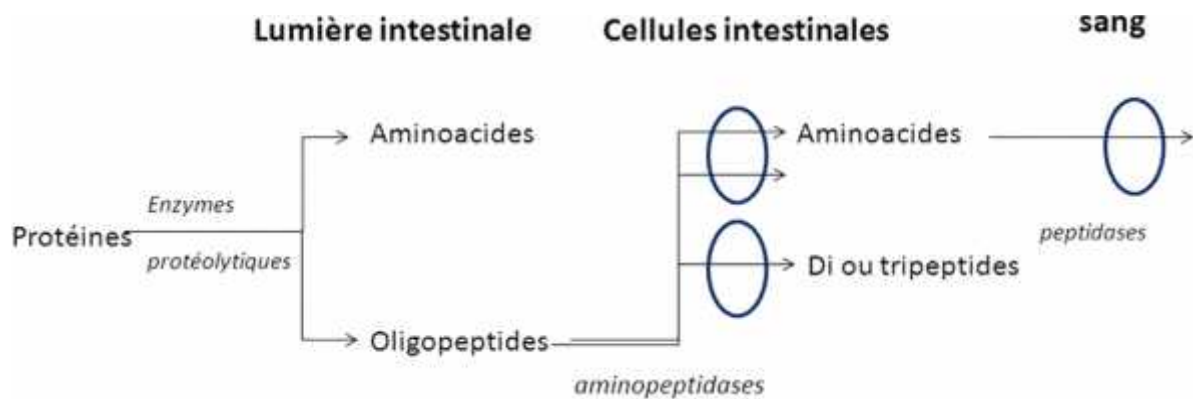


FIGURE 2 DIGESTION ET ABSORPTION DES PROTEINES [26]

2.3 Rôles des acides aminés

2.3.1 Rôle biosynthétique

Le principal rôle des acides aminés est la synthèse protéique. Vingt acides aminés entrent dans la composition des protéines. Ils sont appelés acides aminés protéinogènes. La séquence de ces derniers est mémorisée dans l'ADN. Les protéines sont constituées d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques [23]. L'enchaînement des acides aminés forme la structure primaire des protéines. Chaque acide aminé confère des propriétés chimiques à la protéine et leur ordre d'assemblage lui donne une fonction précise. [22]. Les fonctions des protéines sont nombreuses : enzymatiques (lipase, polymérase), structurales (collagène), hormonales, transport, stockage, immunologiques (anticorps) etc...

Certains acides aminés sont précurseurs de petites molécules. Le tryptophane est le précurseur de la sérotonine (neurotransmetteur). La serine intervient dans la biosynthèse de la sphingosine, un intermédiaire de synthèse des sphingolipides. L'histamine, un puissant vasodilatateur est produit par décarboxylation de l'histidine. L'acide aspartique joue un rôle dans la biosynthèse des bases

pyrimidiques et puriques des nucléotides. La tyrosine est à l'origine de la thyroxine, hormone thyroïdienne, ou de neurotransmetteurs comme la dopamine. La glycine est utilisée dans la biosynthèse des porphyrines [23].

2.3.2 Rôle énergétique

A la différence des sucres et des acides gras, les acides aminés en excès ne sont pas stockés. La dégradation des acides aminés est une source d'énergie [26]. La fonction amine est séparée du squelette carboné par une réaction de transamination commune à presque tous les acides aminés. Cette réaction est catalysée par une transaminase spécifique de chaque acide aminé. L'acide α -cétonique correspondant à l'acide aminé dégradé entre alors dans un processus oxydatif énergétique qui le transformera en dioxyde de carbone et en eau ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) [25]. La production d'énergie se fera directement par l'entrée du squelette carboné dans le cycle de Krebs ou indirectement après conversion du squelette carboné en d'autres molécules énergétiques comme le glucose, les corps cétoniques ou les acides gras [23-25].

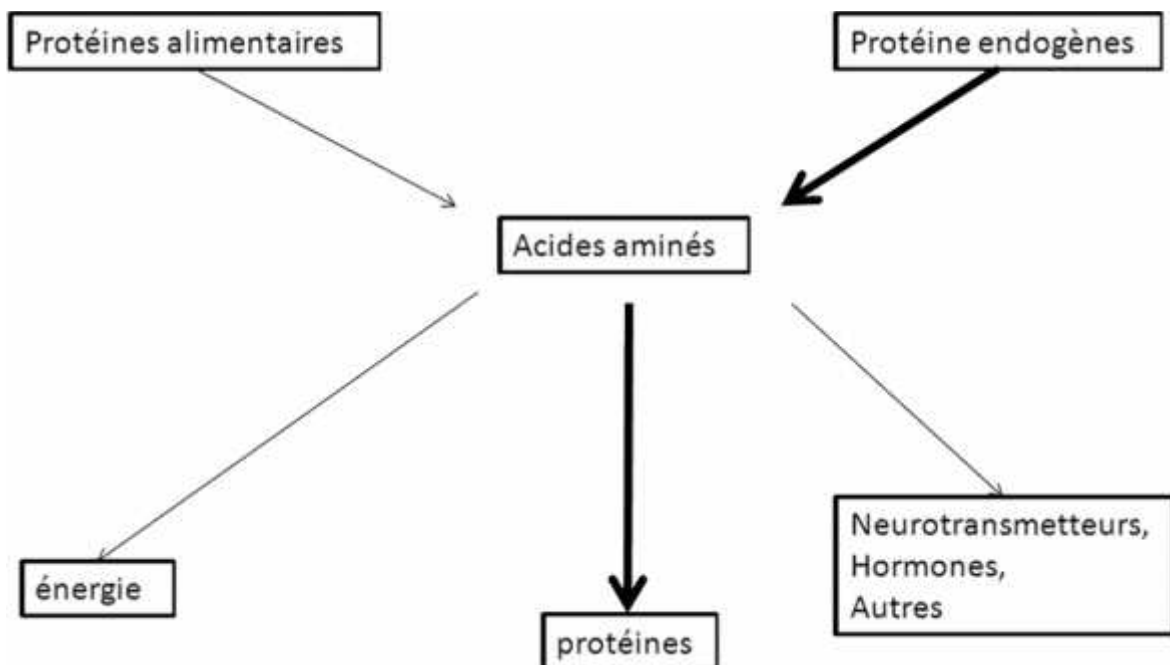


FIGURE 3 LE METABOLISME GENERAL DES ACIDES AMINES [25]

2.4 Echanges inter-organes des acides aminés

En situation de besoin énergétique, (par exemple le jeûne), le muscle est la principale source d'acides aminés. Il est le siège de production de la glutamine et de l'alanine. En effet, le pyruvate est transaminé en alanine qui repart vers le foie pour produire un autre substrat énergétique : le glucose. En période de jeûne, l'intestin capte principalement la glutamine, d'origine musculaire pour former la citrulline : première étape pour la synthèse de l'arginine. Le rein transforme l'azote de la glutamine musculaire en ion ammonium et les carbones en glucose (via l'alanine). Il est également le siège de production de l'arginine à partir de la citrulline produite au niveau intestinal. Le cerveau utilise peu les acides aminés comme source d'énergie à l'exception des acides aminés ramifiés. Il dépend également de la phénylalanine et du tryptophane pour la synthèse des neurotransmetteurs. La dégradation des acides aminés est principalement hépatique. A l'état nourri, l'intestin est la principale source azotée. [25].

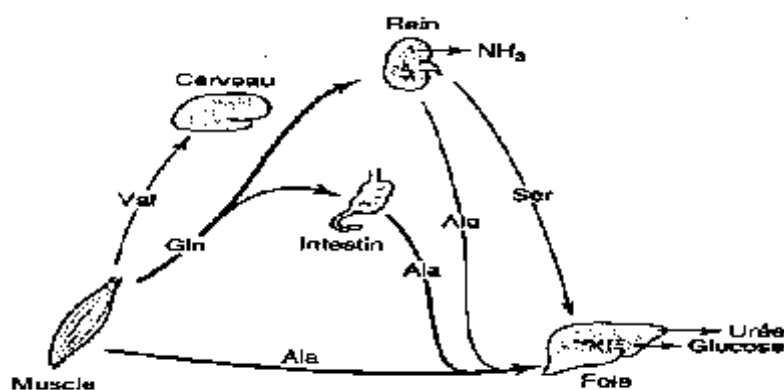


FIGURE 4 ECHANGES INTER-ORGANES DES ACIDES AMINES EN PERIODE DE JEUNE

2.5 Les acides aminés ramifiés

2.5.1 Caractéristiques des acides aminés ramifiés

La leucine, l'isoleucine et la valine sont des acides aminés à chaîne ramifiée. Ce sont des aminés essentiels. Ils sont apportés uniquement par l'alimentation. Les chaînes latérales de ces acides aminés ont un encombrement stérique important et sont hydrophobes.

2.5.1.1 La leucine

La leucine est l'isomère de l'isoleucine. C'est un acide aminé peu polaire, possédant deux groupements fonctionnels, un groupement amine (NH₂) et un groupement carboxyle (COOH), et une chaîne ramifiée de type CH₂-CH(CH₃)₂.

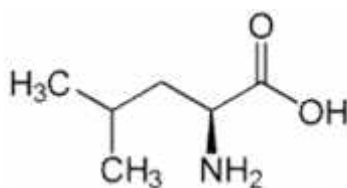


FIGURE 5 STRUCTURE DE LA L-LEUCINE

2.5.1.2 L'isoleucine

L'isoleucine est l'isomère de la leucine. C'est un acide aminé peu polaire, avec un groupement amine (NH₂), un groupement carboxyle (COOH) et une chaîne latérale de type CH(CH₃)-CH₂(CH₃). L'isoleucine possède un deuxième carbone asymétrique (le carbone β).

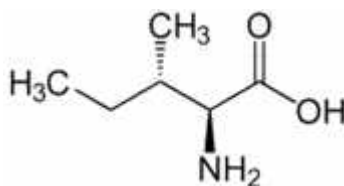


FIGURE 6 STRUCTURE DE LA L-ISOLEUCINE

2.5.1.3 La valine

La valine est un acide aminé peu polaire possédant un groupement isopropyl [CH(CH₃)₂] et deux groupements fonctionnels : amine (NH₂) et carboxyle (COOH).

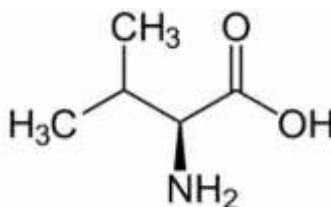


FIGURE 7 STRUCTURE DE LA L-VALINE

2.5.1.4 L'alloisoleucine

L'alloisoleucine est le diastéréoisomère de l'isoleucine. C'est un acide aminé qui n'est pas présent chez le sujet normal ou dans l'alimentation. Sa présence dans le plasma est pathognomonique de la leucinose.

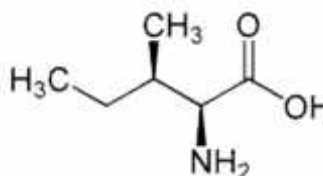


FIGURE 8 STRUCTURE DE LA L-ALLOISOLEUCINE

2.5.2 Le catabolisme des acides aminés ramifiés

Le catabolisme oxydatif des acides aminés ramifiés se fait en deux étapes. La première réaction se déroule au niveau musculaire et correspond à une transamination réversible des trois acides aminés à chaîne ramifiée par la transaminase des acides aminés ramifiés (BCAT : Branched Chain Amino acid Transaminase). La fonction amine est transférée sur un α -cétoacide. L'acide aminé ramifié est transformé en α -cétoacide à chaîne ramifiée correspondant. La seconde réaction est une décarboxylation oxydative irréversible des α -cétoacides à chaîne ramifiée par le complexe déshydrogénase mitochondrial hépatique des α -cétoacides ramifiés (BCKDH).

Au-delà de cette étape, les voies de catabolisme sont spécifiques à chaque acide aminé ramifié. Le catabolisme de la leucine conduit à la production d'acétoacétate (corps cétonique) et d'acétyl-CoA qui va intégrer le cycle de Krebs. La dégradation de l'isoleucine aboutit à la production d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA. Le catabolisme de la valine conduit également à la synthèse de succinyl-CoA qui intègre le cycle de Krebs pour produire de l'énergie [19].

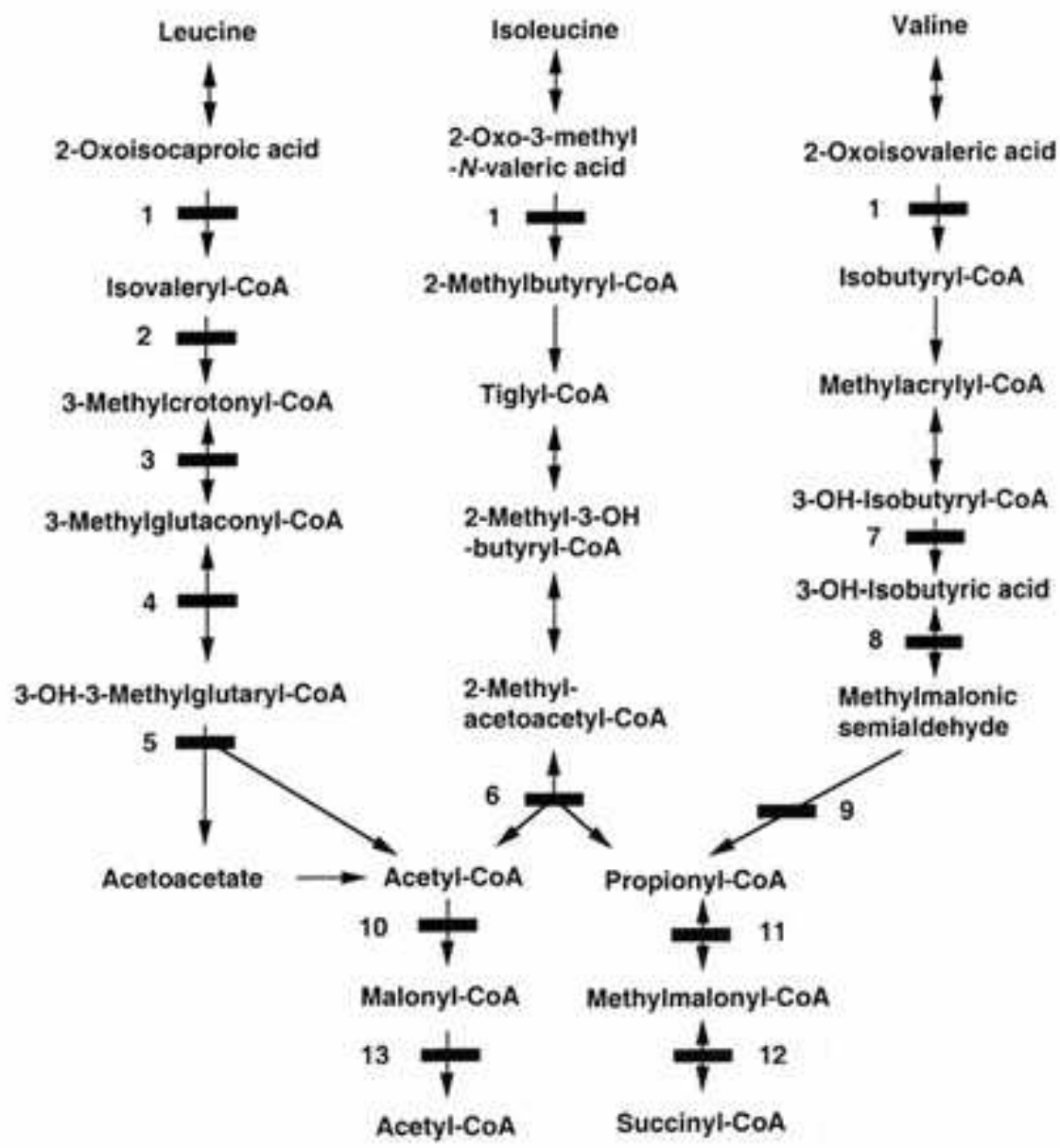


FIGURE 9 SCHEMA DU CATABOLISME DES ACIDES AMINES RAMIFIES [19]

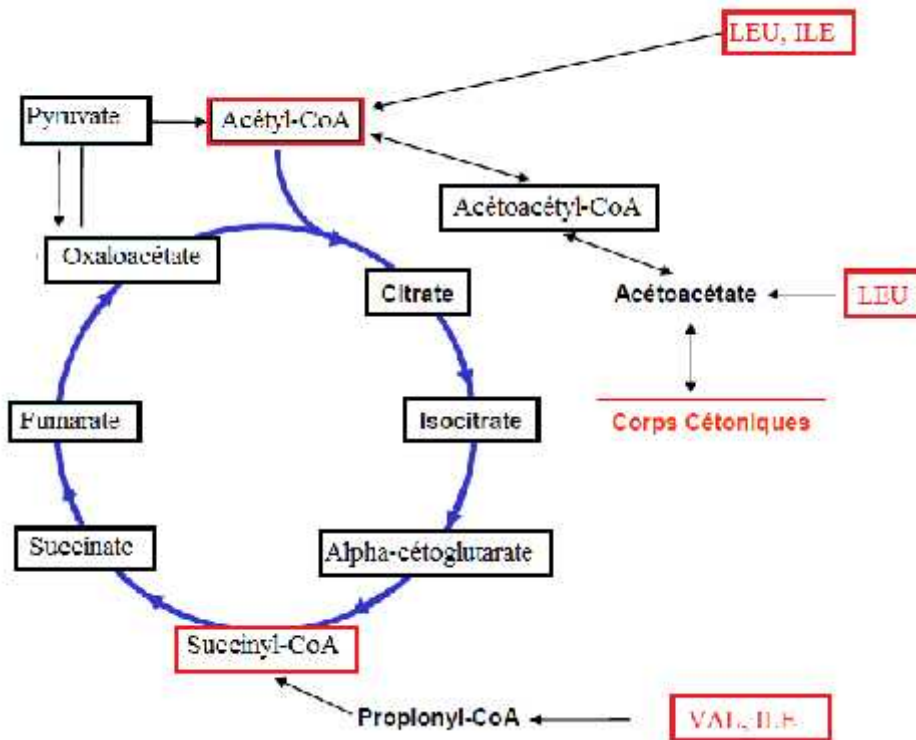


FIGURE 10 INTEGRATION DES METABOLITES ISSUS DE LA VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE DANS LE CYCLE DE KREBS [24]

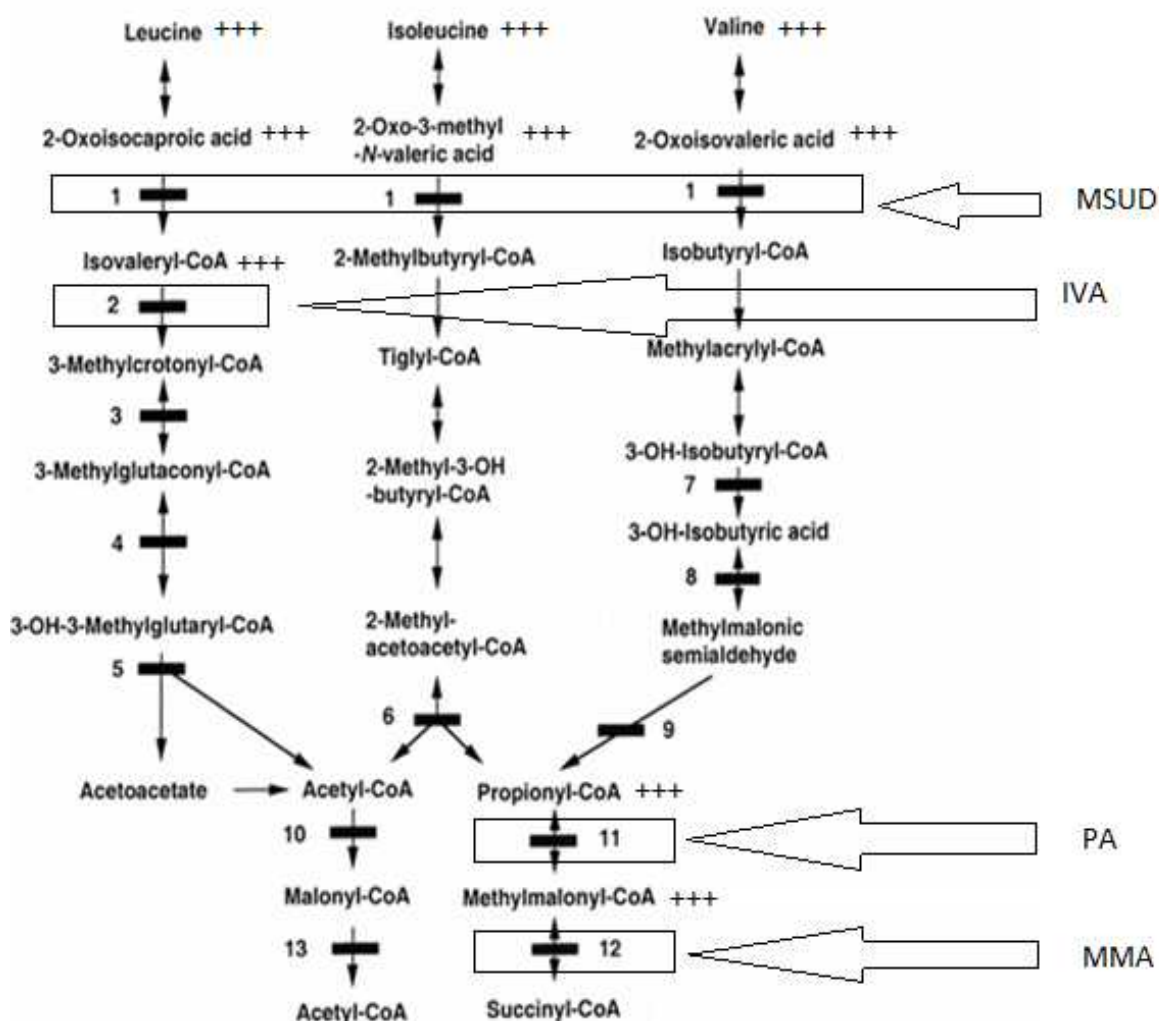
Chapitre 3 Les aminoacidopathies du métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée

3.1 Généralités

Les aminoacidopathies sont des enzymopathies touchant le catabolisme de l'azote aminé ou une étape du catabolisme du squelette carboné. Lorsque le déficit enzymatique se situe au début de la voie de dégradation de l'acide aminé (en position proximale), c'est une intoxication par accumulation de l'acide aminé (exemple de la leucinoase). Lorsque le déficit enzymatique se situe en position distale sur la voie de dégradation, c'est un acide organique qui s'accumule (Exemple des aciduries organiques : acidurie isovalérique, acidurie méthylmalonique et acidurie propionique) [27].

3.2 Désordres métaboliques

Ces pathologies sont associées à un désordre enzymatique au niveau de la voie de catabolisme des acides aminés ramifiés [27].



1. *Branched chain céto-acide deshydrogenase*, 2. *isovaleryl coenzyme A (CoA) deshydrogenase*, 3. 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase, 4. 3-méthylglutaconyl-CoA hydratase, 5. 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase, 6. 2-méthylacétoacétyl-CoA thiolase, 7. 3-hydroxyisobutyryl-CoA deacylase, 8. 3-hydroxyisobutyric deshydrogenase, 9. Methylmalonylsemialdehyde deshydrogenase, 10. Acetyl-CoA carboxylase, 11. *Propionyl-CoA carboxylase*, 12. *Méthyl-CoA mutase*, 13. Malonyl-CoA decaoxylase, **MSUD** (*Leucinose*), **IVA** (*acidémie isovalérique*), **PA** (*acidémie propionique*) **MMA** (*acidémie méthylmalonique*)

FIGURE 11 LES DEFICITS ENZYMATIQUES DE LA VOIE DE DEGRADATION DES ACIDES AMINES A CHAINE RAMIFIEE [27]

3.2.1 Acidurie isovalérique

L'acidurie isovalérique est due à un déficit en isovaléryl-CoA-déshydrogénase. Cette enzyme est située sur la voie de dégradation de la leucine. La transmission est autosomique récessive. La prévalence est estimée à 1 sur 100 000 naissances. Après un intervalle libre de quelques jours, Les nouveau-nés présentent des vomissements, une déshydratation, un coma et des mouvements anormaux. Les examens biologiques montrent une acidose métabolique avec cétose, hyperammoniémie, leuconeutropénie, thrombopénie et hypocalcémie. Ce défaut enzymatique entraîne une accumulation d'acide isovalérique ainsi que ses dérivés tels que l'acide 3-hydroxy isovalérique et la N-isovalérylglycine [27]. Le traitement est diététique avec un apport contrôlé des protéines. L'administration par voie orale de glycine et de carnitine permet de limiter l'accumulation d'isovaléryl CoA.

3.2.2 Acidurie propionique

L'acidurie propionique est secondaire au déficit en propionyl-CoA-carboxylase. Elle débute en général durant la période néonatale par un coma acidocétosique avec hyperammoniémie, leuco thrombopénie et convulsions. Des formes tardives sont décrites avec un tableau clinique digestif, une hypotonie et un déficit intellectuel. L'acidémie propionique est une affection transmise sur le mode autosomique récessif. Quelques formes sont sensibles à la biotine, cofacteur de la propionyl-CoA-carboxylase. Ce défaut enzymatique entraîne une accumulation d'acide propionique et de ses dérivés caractéristiques (méthylcitrates et propionylglycine). Le traitement est diététique avec un régime hypoprotidique très strict. L'administration de carnitine permet de réduire l'accumulation du propionyl-CoA. Un traitement par des antibiotiques intestinaux est nécessaire pour éliminer la flore propiogène [27].

3.2.3 Acidurie méthylmalonique

L'acidurie méthylmalonique est une affection de transmission autosomique récessive secondaire au déficit en méthylmalonyl-CoA-mutase. Cette enzyme est située sur les voies de catabolisme de quatre acides aminés, la valine, l'isoleucine, la méthionine et la thréonine. La maladie débute le plus souvent dans la période néonatale par un coma acidocétosique associé à une déshydratation, une hyperammoniémie et une leucothrombopénie. Une forme subaigüe, survient dans la petite enfance par une hypotonie, des vomissements, des retards de croissance staturo-pondérale et psychomoteur. L'affection peut également se manifester tardivement par des comas acidocétosiques récurrents [27].

Chapitre 4 La leucinoase ou maladie à odeur de sirop d'érable

La leucinoase ou maladie du sirop d'érable a été décrite pour la première fois en 1954 par Menkes [28]. Elle est due au déficit en déshydrogénase des acides aminés ramifiés (BCKDH). Il s'agit d'un complexe enzymatique constitué de quatre sous-unités enzymatiques principales. Une α -décarboxylase (E1 α) et une β -décarboxylase (E1 β) qui requièrent un coenzyme, la thiamine pyrophosphate, une dihydrolipoyl acyltransférase (E2) et une dihydrolipoamide déshydrogénase (E3). Les déficits en E1 ou E2 sont à l'origine de la leucinoase. Le déficit de la sous unité E3 est responsable d'une affection marquée par une acidose lactique congénitale [19].

La leucinoase se transmet selon un mode autosomique récessif. Le blocage enzymatique a pour conséquence l'accumulation toxique des acides aminés ramifiés. C'est une maladie rare. Son incidence dans la population générale est estimée à 1/185000 naissances [29]. En Europe, l'incidence de la maladie dans la population caucasienne est encore plus faible (1 cas sur 190 000 naissances) [30]. Dans certaines

populations (Mennonite), l'incidence de la maladie peut être très élevée avec 1 cas pour 380 naissances [31]. Le dépistage néonatal systématique de la leucine n'est pas réalisé en France. Le diagnostic repose sur un tableau clinique évocateur et sur les résultats de la chromatographie des acides aminés plasmatiques qui montrent une accumulation des acides aminés ramifiés.

4.1 Diagnostic clinique

En fonction de l'activité résiduelle du complexe enzymatique BCKDH, différentes formes cliniques ont été décrites.

Une forme classique d'apparition néonatale sévère marquée par un épisode de décompensation aiguë et une détresse neurologique. La forme classique à début néonatal (90% des cas) correspond à un déficit enzymatique presque total avec une activité enzymatique résiduelle comprise entre 0 à 2% (*tableau I*). Chez les nouveau-nés non traités, une cétonurie accompagnée d'une irritabilité et d'une mauvaise alimentation apparaissent dans les 48 heures suivant la naissance. Les signes d'intoxication apparaissent après 3 à 5 jours de vie par des troubles de la conscience, un refus de boire et des signes neurologiques d'intoxication (hypertonie avec des mouvements anormaux de type boxage ou pédalage). Le tableau clinique est associé à une odeur caractéristique de sirop d'érable qui est évidente dans le cérumen dès les premières heures suivant la naissance ainsi que dans les urines dès le 5^{ème} ou le 7^{ème} jour de vie [31]. La chromatographie des acides aminés plasmatiques pose le diagnostic. Elle montre l'accumulation des acides aminés à chaîne ramifiée. La concentration de leucine dépasse généralement les 2 000 µmol/L. Contrairement aux aciduries organiques, il n'y a pas d'acidose métabolique. L'évolution sans traitement est caractérisée par une aggravation marquée par un coma profond secondaire à un œdème cérébral. Ce dernier est expliqué par l'accumulation intracérébrale des acides aminés ramifiés [29].

La forme intermédiaire à révélation plus tardive se présente comme une encéphalopathie avec un retard mental, un retard de croissance et une hypotonie majeure. Cette forme est associée à une activité enzymatique résiduelle comprise entre 3% et 30% (*tableau I*). La majorité des patients est diagnostiquée entre l'âge de 5 ans et 7 ans. Ils sont vulnérables aux mêmes séquelles neurologiques aiguës ou chroniques que les patients présentant la forme classique de la leucinose. Un épisode de décompensation aigu peut également conduire à une leucinose sévère avec un œdème cérébral voire au décès du patient.

La prise en charge de la forme intermédiaire de la maladie ne diffère pas de celle de la forme classique et la distinction entre les deux formes n'est pas absolue [31].

La forme intermittente survient à tout âge. Elle est associée à une activité enzymatique résiduelle allant jusqu'à 20% (*tableau I*). Les patients présentent une croissance et un développement intellectuel normal durant l'enfance et l'adolescence. Cependant ils montrent des épisodes récurrents d'ataxie, de léthargie et de semi-coma. Un épisode de décompensation aigu peut également conduire à une leucinose sévère avec un œdème cérébral voire au décès du patient.

La forme thiamine-sensible est exceptionnelle, son existence est controversée. La présentation clinique est similaire à la forme intermédiaire. L'activité enzymatique est comprise entre 2 et 40%. (*tableau I*). Elle est caractérisée par une normalisation des taux de leucine en quelques jours après apport de thiamine (vitamine B1). [19].

Forme de Leucinose	Age d'apparition	Signes cliniques	Signes biochimique	Activité résiduelle de la BCKDH %
Classique	Néonatale	<ul style="list-style-type: none"> •Odeur de sirop d'érable du cérumen •Difficulté d'alimentation •Opisthotonos •Dystonie focale •Mouvement de pédalage ou de boxe •Obnubilation coma •Détrese respiratoire centrale 	<ul style="list-style-type: none"> •Concentrations plasmatiques élevées en BCAA •Concentration plasmatique élevée en alloisoleucine •Concentrations urinaires élevées en cétoacides à chaîne ramifiée •Test à la DNPH positif •Cétonurie 	0%-2%
Intermédiaire	Variable	<ul style="list-style-type: none"> •Odeur de sirop d'érable du cérumen •Difficulté de nutrition •Faible croissance •Irritabilité •Retard de développement •Encéphalopathie durant les infections 	Idem phénotype classique de la Leucinose avec toutefois des concentrations moins élevées	3%-30%
Intermittente	Variable	<ul style="list-style-type: none"> •Croissance et développement normale au départ •Épisode de décompensation pouvant être sévère 	<ul style="list-style-type: none"> •Concentrations plasmatiques normales en BCAA durant la période en bonne santé •Idem au phénotype classique durant les infections 	5%-20%
Thiamine sensible	Variable	Similaire à la forme intermédiaire	La tolérance à la leucine et le profil biochimique sont améliorés par l'administration de thiamine	2%-40%

TABLEAU I RECAPITULATIF DES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DE LEUCINOSE SELON STRAUSS ET MORTON [31]

4.2 Diagnostic biochimique

Un bilan métabolique de base (glycémie, ammoniémie, lactates sanguins, cétonurie...) est réalisé. La cétonurie peut être détectée par de simples tests sur bandelettes urinaires. Le test à la dinitrophenylhydrazine est un examen urinaire qui montre la présence d' α -cétoacides à chaîne ramifiée. Ce test est simple et peut être réalisé par le clinicien au lit du patient. Son utilisation est peu courante, en raison de la rapidité de péremption des réactifs. Le diagnostic biochimique de la leucinoze repose principalement sur la chromatographie des acides aminés plasmatiques associée à la chromatographie des acides organiques urinaires [31].

L'analyse quantitative des acides aminés plasmatiques confirme le diagnostic de leucinoze. Elle montre l'accumulation des acides aminés ramifiés (leucine [leu], valine[val] et isoleucine[ileu]) et l'apparition d'alloisoleucine([alloileu]), un diastéréoisomère de l'isoleucine dont la présence est spécifique de la pathologie [31].

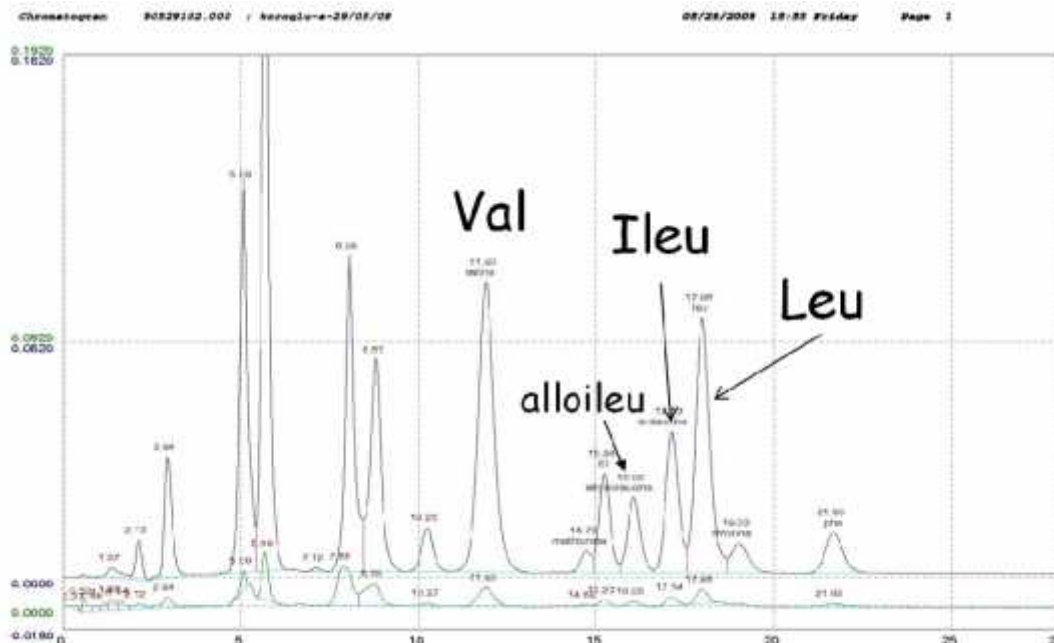


FIGURE 12 CHROMATOGRAMME D'UN PATIENT ATTEINT DE LEUCINOZE

L'analyse des acides organiques urinaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse met en évidence des α -cétoacides à chaîne ramifiée et des α -hydroxyacides à chaîne ramifiée et confirme le diagnostic de leucinose. Après l'analyse des métabolites, une approche moléculaire permet la confirmation de la maladie.

Les analyses moléculaires sont indispensables au diagnostic prénatal et le conseil génétique. Une mutation bi-allélique sur l'un des quatre gènes codant les quatre sous-unités du complexe enzymatique BCKDH entraînera un déficit de l'activité du complexe, avec une accumulation des acides aminés ramifiés et de leur α -cétoacides correspondants [31]. Quatre phénotypes différents sont décrits en fonction des gènes mutés. Le **phénotype IA** est caractérisé par une mutation sur le gène de la sous-unité E1 α responsable de la forme classique de la leucinose. Le **phénotype IB** est marqué par une mutation sur le gène de la sous-unité E1 β et retrouvé également uniquement dans les formes classiques de la leucinose. Le **phénotype II** correspond à une mutation sur le gène de la sous-unité E2. Il est associé aux formes intermédiaires, ou thiamine sensible. Le **phénotype III** est associé à une mutation sur le gène de la sous-unité E3. Il est caractérisé par un phénotype clinique différent de celui de la leucinose [31].

4.3 Prise en charge de la Leucinose

L'objectif du traitement est de limiter l'accumulation et l'intoxication par les métabolites toxiques en amont du déficit enzymatique. Il est important de limiter la production de ces dérivés toxiques provenant de l'alimentation et de la protéolyse. La leucinose est une urgence métabolique. Le traitement du nourrisson dans la forme néonatale consiste à :

- i) Corriger les troubles hémodynamiques et ioniques.
- ii) Eviter le catabolisme des protéines, source endogène d'acides aminés par l'apport d'une alimentation artificielle hypercalorique, glucido-lipidique contenant des oligoéléments, des vitamines et des minéraux. Le régime

sans protéines est transitoire et ne doit pas dépasser les 48 heures. Il est important de réintroduire progressivement les protéines.

Des taux de leucine dépassant 1 000 $\mu\text{mol/L}$ peuvent persister malgré le traitement médical et diététique. L'épuration exogène peut corriger rapidement la concentration des acides aminés ramifiés et des α -cétoacides à chaîne ramifiée durant la phase de décompensation.

Le régime pauvre en protéines naturelles permettant de limiter les apports en acides aminés ramifiés conduit obligatoirement à une carence en acides aminés dont les acides aminés essentiels mais aussi en vitamines, minéraux et oligoéléments. Pour prévenir ces carences, il est important de supplémenter par un mélange d'acides aminés, mais aussi par des vitamines, minéraux et oligoéléments. Une supplémentation en valine et isoleucine (gélules) est également indispensable pour une synthèse protéique maximale.

Toute situation favorisant le catabolisme protidique telle que la fièvre, le jeûne, la chirurgie, le stress, la vaccination conduit à une décompensation métabolique du patient. Un régime d'urgence hypercalorique et sans leucine sera initié dans un premier temps au domicile pour des taux de leucine inférieurs à 760 $\mu\text{mol/L}$ si l'état digestif et neurologique le permet. La mise en place d'une alimentation entérale continue à l'hôpital sera nécessaire en cas d'anorexie et ou lorsque le taux de leucine sera supérieur à 760 $\mu\text{mol/L}$. Ce régime favorise l'anabolisme continu. Il consiste en un apport énergétique sous forme de glucides et de lipides, adapté à l'âge du patient, associé à un apport d'acides aminés sauf les ramifiés. Une supplémentation en valine et isoleucine (gélules) est également indispensable pour une synthèse protéique maximale. Une réévaluation du régime se fera en fonction des résultats des concentrations en acides aminés ramifiés plasmatiques [31].

4.4 Surveillance

La surveillance repose sur une évaluation clinique (courbe staturo-pondérale, développement psychomoteur, absence de signes d'intoxication) et sur les résultats biologiques (taux plasmatiques des acides aminés ramifiés, bilan nutritionnels etc.). Les paramètres clinico-biologiques doivent être dans les limites acceptables. La fréquence de la surveillance biologique est fonction de l'âge du patient. Le dosage des acides aminés plasmatiques est réalisé une fois par semaine chez les nouveau-nés et les jeunes enfants et pourra ensuite être progressivement espacé jusqu'à une fois par mois chez l'adulte. La leucinémie idéale doit être comprise entre 150 et 300 $\mu\text{mol/L}$. La concentration en isoleucine doit être sensiblement égale à celle de la leucine, en revanche la concentration en valine doit être au moins égale au double de la concentration en leucine [33-37].

4.5 Pronostic

A l'heure actuelle, les patients atteints de leucinose ont un bon pronostic. La moyenne des performances intellectuelles est cependant inférieure à celle des sujets sains. Une évolution favorable dépend de la rapidité de la prise en charge lors de la décompensation inaugurale et du contrôle métabolique à long terme. Le dépistage néonatal systématique de la leucinose par spectrométrie de masse tandem apporterait obligatoirement un bénéfice aux patients et aux familles [19].

Chapitre 5 Organisation du diagnostic des maladies

héréditaires du métabolisme :

Tout d'abord, l'exploration et le suivi des MHM reposent sur un bilan métabolique de première intention avec des examens classiques d'orientation tels que la glycémie, les corps cétoniques, l'ammoniémie et les lactates sanguins. Ces examens sont réalisés sur le plateau technique à réponse rapide du laboratoire de Biochimie (Hôpital Pellegrin). Dans un second temps des examens spécialisés seront faits sur le plateau technique de mesures physiques, en Biochimie spécialisée (Hôpital Pellegrin). D'autres examens non réalisés sur site sont envoyés à l'extérieur vers d'autres laboratoires du réseau maladies héréditaires du métabolisme.

L'analyse des métabolites constitue la principale activité du laboratoire de Biochimie (hôpital Pellegrin). Le laboratoire dispose de méthodes d'analyse complexes telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour l'analyse des acides aminés plasmatiques et urinaires, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des acides organiques urinaires et d'un nouvel outil diagnostique qui est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permettant l'analyse des acylcarnitines et des acides aminés sur divers liquides biologiques comme le plasma et le sang déposé sur papier buvard. Cette plateforme technologique est utilisée pour le diagnostic et le suivi d'un nombre important de maladies héréditaires du métabolisme.

Après exploration du métabolome, des mesures d'activités enzymatiques sont réalisées dans certains cas pour confirmer le déficit. Ces mesures peuvent s'effectuer sur du sérum, des biopsies tissulaires ou sur des fibroblastes. Certains dosages sont réalisés sur site tels que l'activité biotinidase et l'activité galactose-1-phosphate uridylyltransférase. D'autres activités enzymatiques sont envoyées vers des laboratoires du réseau maladies métaboliques.

L'analyse mutationnelle des gènes est réalisée après extraction d'ADN à partir des leucocytes, fibroblastes et autres tissus.

Les analyses moléculaires confirment le diagnostic. Elles sont importantes pour les études de transmission familiale, le diagnostic prénatal et le conseil génétique [19,37].

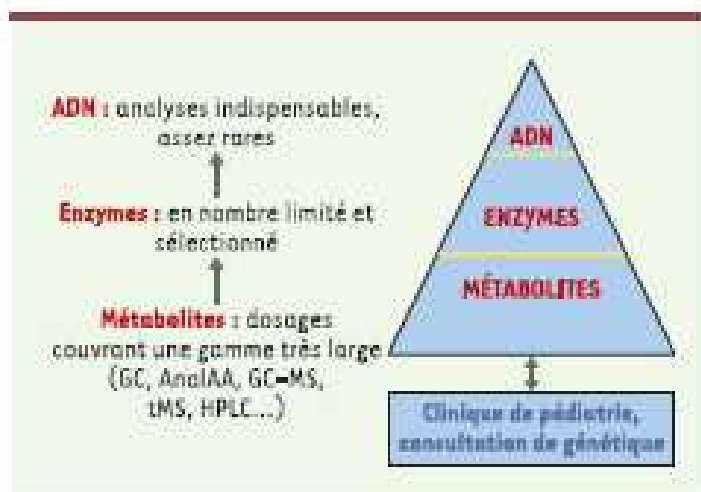


FIGURE 13 PYRAMIDE D'ORGANISATION DU DIAGNOSTIC DES MHM SELON RICQUIER [37]

Chapitre 6 La chromatographie d'échange d'ions

6.1 Principe général de la chromatographie liquide

La chromatographie est une méthode de séparation de composés en fonction de leur affinité à l'égard de deux phases, une phase stationnaire et une phase mobile. Selon la méthode chromatographique, la séparation des composés entraînés par la phase mobile résulte de leur adsorption et de leur désorption sur la phase stationnaire ou de leur différence de solubilité dans chaque phase [38]. Il existe quatre méthodes chromatographiques :

- i) La chromatographie d'adsorption : la séparation des molécules est basée sur le principe d'adsorption et désorption sur la phase stationnaire.

- ii) La chromatographie de partage est basée sur la différence de solubilité des composés à séparer entre la phase mobile et la phase stationnaire.
- iii) La chromatographie d'exclusion avec une phase stationnaire constituée de pores dont la dimension sera choisie en fonction de la taille des molécules à séparer.
- iv) La chromatographie d'échanges d'ions [38]

6.2 La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide. À sa surface se trouvent des groupements ionisés (échangeur d'ions), chargés positivement ou négativement [39]. Des ions mobiles de charge opposée assurent l'électro neutralité. La phase stationnaire permet de fixer de façon sélective les anions ou les cations présents en solution. Cette méthode est utilisée uniquement dans la séparation de molécules ionisables: ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisées ou encore lipides ionisés [40].

On retrouve deux types de supports : des produits minéraux tels que la silice et des produits synthétiques tels que des polymères et des dérivés de cellulose qui sont les plus utilisés [39]. Les résines échangeuses de cations fixent des groupements anioniques tandis que les résines échangeuses d'anions fixent des groupements cationiques.

La phase mobile, également appelée «éluant» est généralement une phase aqueuse. Dans le but d'optimiser une élution ou de faciliter la solubilité de certains solutés, il est nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (exemple : méthanol-eau). L'éluant circule en permanence dans la phase stationnaire et entraîne l'échantillon composé de molécules ionisables. Les ions vont se fixer de façon sélective à la phase stationnaire puis se décrocher progressivement en fonction de leur charge, de leur taille et de leur degré d'hydratation [40].

6.3 Application au dosage des acides aminés

plasmatiques.

Les acides aminés sont des molécules ionisables. Parmi les 20 acides aminés répertoriés, 15 sont neutres et les cinq autres sont acides ou basiques [41]. Le laboratoire de Biochimie de l'hôpital Pellegrin dispose d'un automate Jeol Aminotac[®] JLC500/V dédié à l'analyse des acides aminés par chromatographie échangeuse de cations dont le temps d'analyse est de 80 minutes. La phase stationnaire est une résine sulfonique négative équilibrée par des ions Na⁺ qui va donc fixer les cations. La phase mobile est constituée de citrate de Lithium [42]. L'échantillon de plasma ou d'urine subit une déprotéinisation acide. Les acides aminés libres sont ainsi chargés positivement (cations). Après injection de l'échantillon sur une colonne échangeuse de cations, les acides aminés libres sont séparés et élués par passages successifs de tampons de pH croissants. A la sortie de la colonne, les acides aminés réagissent avec la ninhydrine à chaud pour former des composés colorés détectés par spectrophotométrie à 2 longueurs d'onde différentes (570 nm et 440 nm). L'ordre d'éluion des acides aminés est fonction de la charge, de la taille et de la structure de la chaîne latérale. Les acides aminés acides sont très peu retenus. Ils sont suivis par les neutres et enfin par les acides aminés basiques [32,42].

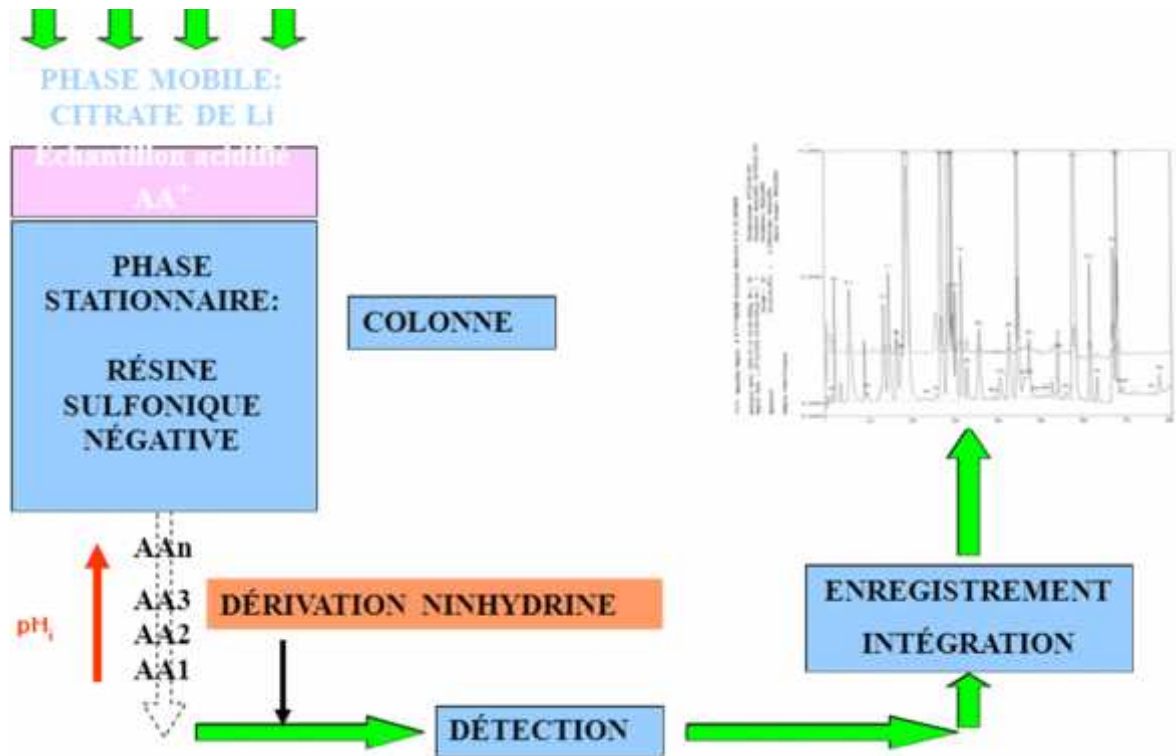


FIGURE 14 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ECHANGE D'ION POUR LE DOSAGE DES ACIDES AMINES [42]

Chapitre 7 La spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide

7.1 La spectrométrie de masse

7.1.1 Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode analytique de plus en plus utilisée en raison de sa grande sensibilité, de sa spécificité et de ses nombreuses possibilités d'applications. C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et de quantifier différents types de mélanges complexes de métabolites biologiques. L'identification de ces métabolites repose sur la mesure de la masse des molécules et de leurs fragments ionisés qui sont séparés et quantifiés sur la base de leur

ratio masse moléculaire/charge (m/z) [43]. La spectrométrie de masse est utilisée dans tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie organique, biologie, médecine etc...

Un spectromètre de masse en tandem est constitué de trois structures principales :

- 1) Une source d'ionisation (Exemple : ESI, électro-spray ionisation) permettant la vaporisation de la phase mobile et l'ionisation des métabolites d'intérêts.
- 2) Un analyseur contenant deux filtres de masse de type quadripolaire séparés par une chambre de collision où les métabolites d'intérêt sont fragmentés.
- 3) Un détecteur de courant ionique couplé à un système de traitement informatique des données acquises [44].

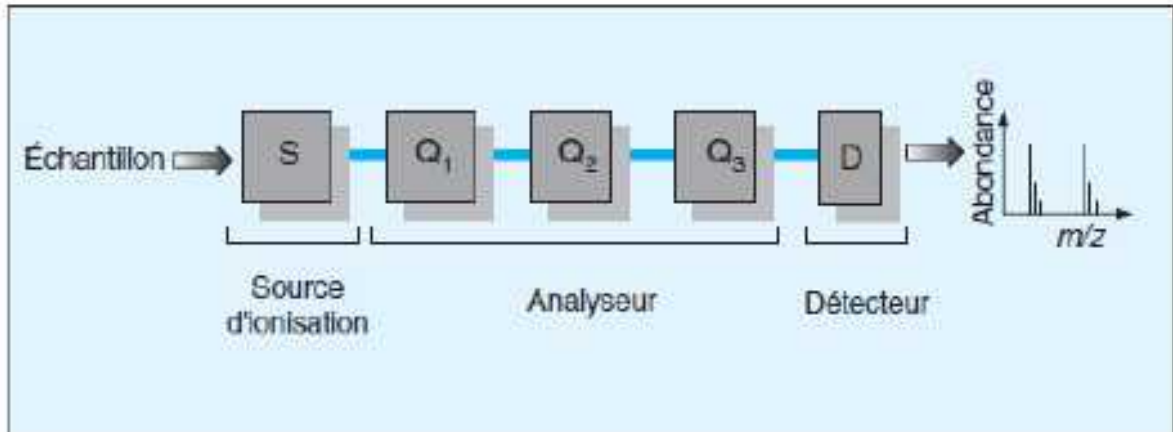


FIGURE 15 SCHEMA D'UN SPECTROMETRE DE MASSE TANDEM [43]

7.1.2 La source d'ionisation

La source permet d'ioniser les substances à analyser. Les principales sources utilisées en biologie sont : l'ESI (electrospray ionisation), la plus utilisée, l'APCI (atmospheric pressure chemical ionisation), et le MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation). Notre appareil est équipé d'une source ESI. Elle permet d'ioniser des petites molécules en milieu liquide. L'échantillon liquide à analyser traverse, à faible débit (1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$), un capillaire soumis à un fort courant électrique. A sa sortie, un cône de « taylor » permet la formation de fines gouttelettes hautement chargées. Ces gouttelettes vont diminuer de taille par perte des molécules du solvant. L'évaporation du solvant se fait par une augmentation de la température de la source. Ces gouttelettes subissent alors une succession de fissions qui aboutit à la désorption des ions qui se retrouvent en phase gazeuse et sont dirigés vers l'analyseur par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques.

Les molécules peuvent être ionisées positivement ou négativement. Le choix dépend de la tendance de la molécule à donner un ion négatif ou positif [43]

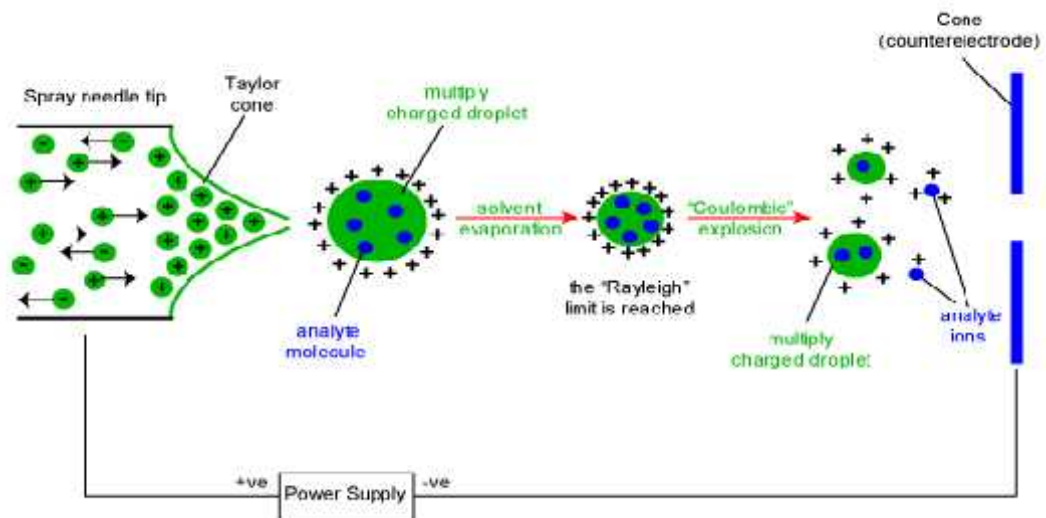


FIGURE 16 PRINCIPE DE L'ELECTROSPRAY (ESI) [45]

7.1.3 Les analyseurs

L'analyseur détecte, sépare et détermine la masse des ions formés au niveau de la source. L'analyseur le plus utilisé en biologie est de type quadripolaire. Un quadripôle est composé de quatre électrodes de section hyperbolique qui sont soumises à un champ électrique constant et à un champ électrique alternatif. La trajectoire de l'ion sera dépendante de sa masse et de sa charge permettant ainsi de séparer les différents ions d'un mélange complexe. En fonction du champ électrique appliqué, seuls les ions ayant un rapport m/z spécifique vont avoir une trajectoire stable et traverseront ainsi le quadripôle pour atteindre le détecteur.

L'analyse par MS/MS peut se faire selon plusieurs modes en fonction des objectifs analytiques à atteindre. Le mode balayage des ions (product ion scan), permet de suivre la production d'ion dans la source. Le mode balayage des ions fils permet d'étudier la fragmentation d'un ion précurseur inconnu dans un mélange complexe. Un mode statique (multiple reactions monitoring ou MRM) découle du mode précédemment cité.

Le multiple reaction monitoring ou MRM permet de trier une ou plusieurs molécules ayant un ion précurseur et un ion fragment spécifique. La sélection se fait en réglant les deux analyseurs de sorte qu'ils ne stabilisent que les trajectoires d'ions avec des valeurs masse/charge (m/z) prédéfinies (transition d'acquisition). Cette sélection à deux niveaux permet d'augmenter la limite de détection jusqu'à 100 fois comparée à une analyse complète de spectrométrie de masse en tandem [46]. Le premier quadripôle (Q1) est soumis à un champ électrique spécifique qui permettra d'isoler l'ion parent de la molécule d'intérêt. Un second quadripôle (Q2) servira de chambre de collision dans laquelle l'ion parent sera fragmenté en ions fils et en fragments neutres caractéristiques de la molécule. Enfin un troisième quadripôle (Q3) analyse les ions fils [43-45, 47, 48].

7.1.4 Le détecteur

C'est un multiplicateur d'électron qui produit un courant électrique amplifié puis le converti en spectre de masse par un logiciel informatique.

Dans le domaine de la biologie, le spectromètre de masse en tandem est souvent couplé à un équipement de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Cet équipement a pour but de séparer les molécules d'intérêt avant de les quantifier par spectrométrie de masse en tandem [44].

7.2 Chromatographie liquide haute performance **(HPLC)**

L'HPLC est une méthode de séparation des molécules au sein d'un mélange complexe. Elle repose sur un phénomène de rétention dépendant d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Le système est composé :

1) d'un réservoir de phase mobile (solvant) également appelé « éluant » qui va entraîner l'échantillon à analyser dans le système. Plusieurs éluants peuvent être utilisés pour réaliser des gradients d'éluant.

2) d'une pompe permettant de travailler en mode isocratique avec 100% de la même phase mobile injecté tout au long de l'analyse ou en mode gradient avec des variations de concentrations des éluants. Le débit de cette pompe est de l'ordre de quelques μL à plusieurs mL/min .

3) d'une vanne d'injection qui permet d'injecter toujours le même volume d'échantillon. Son volume varie en fonction de la colonne et de la concentration supposée des composés à analyser.

4) d'une colonne inerte en inox ou en verre contenant la phase stationnaire [49].

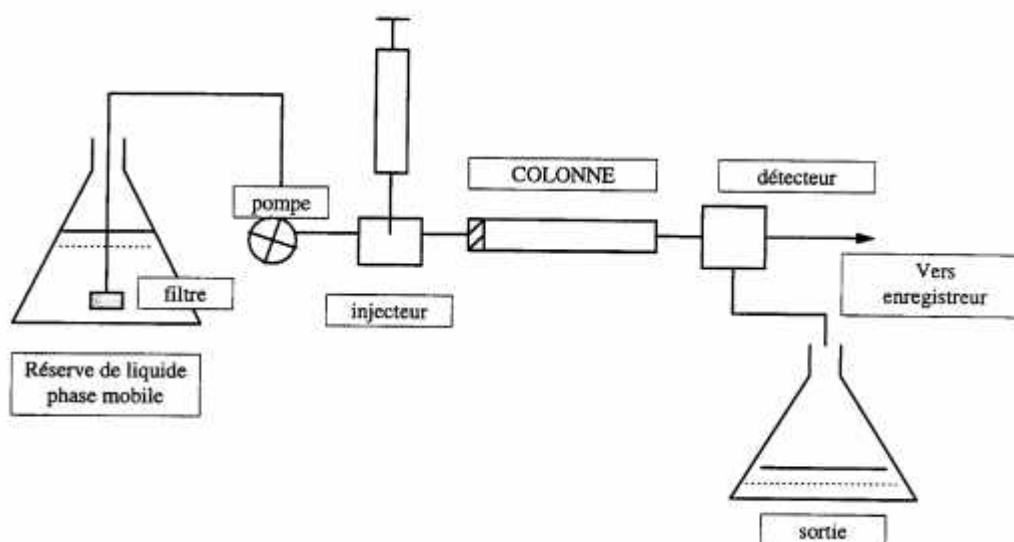


FIGURE 17 PRINCIPE DE L'HPLC [49]

7.3 Spectrométrie de masse : application dans le domaine des maladies héréditaires du métabolisme

Deux applications de la spectrométrie de masse en tandem ont permis d'améliorer le diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme : le profil des acylcarnitines (AC) et le dosage des acides aminés (AA). L'analyse des acylcarnitines est indispensable pour le

diagnostic des déficits de l'oxydation mitochondriale des acides gras et de certaines aciduries organiques. L'analyse des acides aminés permet le diagnostic des aminoacidopathies comme la leucinose et les déficits du cycle de l'urée. La MS/MS offre la possibilité de réaliser simultanément le profil acylcarnitine et le profil acides aminés à partir d'une tache de sang déposé sur papier buvard. Le développement de la technique de MS/MS et son application pour l'analyse des acides aminés (AA) et des acylcarnitines (AC) est en train de révolutionner le dépistage néonatal systématique des MHM.

En effet, la mise au point d'un protocole analytique permettant en deux minutes de quantifier à partir d'une tache de sang différents métabolites a rendu possible le diagnostic de plus d'une trentaine de MHM.

Partie 2 Données expérimentales

Chapitre 1 Objectifs de l'étude

La quantification des acides aminés ramifiés plasmatiques est un élément clé dans le diagnostic et le suivi des patients atteints de leucinoase en phase de décompensation ou en équilibre métabolique. Actuellement, au laboratoire de Biochimie de l'hôpital Pellegrin, le dosage des acides aminés ramifiés plasmatiques se fait sur un automate Jeol Aminotac[®] JLC500/V dédié à l'analyse des acides aminés par chromatographie échangeuse de cations. L'analyse sur plasma nécessite le déplacement du patient au centre de prélèvement de l'hôpital pédiatrique et la réalisation d'une prise de sang au pli du coude.

L'objectif de ce travail est de mettre au point l'analyse quantitative des acides aminés ramifiés sur sang déposé sur papier buvard par chromatographie de paire d'ions en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et de valider la méthode analytique selon la norme ISO 15189.

Le prélèvement capillaire est moins invasif et traumatique pour l'enfant et plus rapide qu'une prise de sang conventionnelle. La possibilité de l'expédier par voie postale est un avantage considérable. En effet, en dehors des phases de décompensation le prélèvement est réalisé à domicile par les parents puis expédié au laboratoire par courrier postal. La mise en place de cette nouvelle technique d'analyse au laboratoire va obligatoirement améliorer la qualité de vie de ces enfants.

Chapitre 2 Matériel et Méthode

2.1 Matériel

2.1.1 Spectromètre de masse tandem couplé à l'HPLC

L'ensemble de l'expérimentation a été réalisée sur un système LC-MS/MS : Alliance 2795 HPLC- Waters Micromass Quatro micro (*Waters S.A.S, Saint-Quentin en YvelinesFrance*).

Paramètres du spectromètre de masse en tandem :

L'ionisation est en mode ESI positif (electrospray positive). Le gaz de la source et le gaz de collision sont respectivement l'azote et l'argon. Les potentiels au niveau du capillaire, du cône et de l'extracteur sont respectivement de 3.50 kV, de 20 V et 2 V. La température de la source est de 100 °C. La température de désolvatation est de 300 °C. Le balayage des masses est compris entre 150 à 600 Da. L'acquisition des données se fait selon le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Le système d'exploitation des résultats se fait à l'aide du logiciel MassLynx/Quanlynx4.1. Les transitions d'acquisition des ions à analyser et des ions deutérés (standards internes) sont notés ci-dessous (*Tableau II*).

Transitions d'ions (m/z)		
	Analyseur Q1	Analyseur Q3
Valine	118.20	72.00
Valine D8 (deutééré)	126.20	80.10
Leucine/isoleucine	132.20	86.10
Leucine D3 (deutééré)	135.20	89.10

TABLEAU II TRANSITION D'ACQUISITION DES ACIDES AMINES ET DES ETALONS DEUTERES CORRESPONDANT.

Chromatographie liquide haute performance :

Nous avons utilisé un appareil Alliance 2795 HPLC Waters (*Waters S.A.S, Saint-Quentin en Yvelines, France*) muni d'un système d'injection automatique et d'un système de pompes.

2.2 Matériel et consommables.

Les solvants de chromatographie méthanol, acétonitrile sont de qualité HPLC (*VWR, Fontenay-sous-bois, France*). Les acides aminés L-leucine, L-valine, L-isoleucine et L-alloisoleucine utilisés pour l'étalonnage sont achetés auprès des laboratoires Sigma Aldrich (*Saint Quentin, France*). Les réactifs, acide formique, acide perfluoropentanoïque (PFPA) et acide chlorhydrique sont directement utilisables et sont obtenus auprès des laboratoires (*VWR, Fontenay-sous-bois, France*). Les acides aminés deutérés Leucine-D3 et Valine-D8, sont obtenus à partir de l'étalon interne de la trousse réactif 5700 Masschrom® (*Chromsystems instruments and Chemicals GmbH, Munich, Allemagne*) [50]. Une fois reconstitué, l'étalon interne est stable pendant 3 semaines à +4°C.

Les consommables utilisés sont : tubes à hémolyse en verre, tubes falcon 50 mL, plaque 96 puits, poinçonneuse de disques de 3 mm de diamètre, évaporateur à sec sous azote, vortex et agitateur de plaque.

2.3 Méthode

2.3.1 Echantillons

Lors de la phase d'essai, nous avons utilisé des échantillons de sang total provenant de patients pour lesquels une demande d'analyse d'acides aminés a été prescrite. Moins de 1 mL de sang a été déposé sur le papier buvard (*PerkinElmer 226 sample collection device for the collection of human blood spots, Turku, Finland*).

Nous avons également utilisé des prélèvements de sang capillaire obtenu par ponction au travers de la peau. La goutte de sang est déposée au centre du cercle pré-imprimé sur le papier buvard. La quantité de sang doit être suffisante pour permettre une pénétration uniforme et à saturation dans le cercle. Il est important d'éviter l'application du papier buvard directement sur le point de ponction. La tache de sang est faite avec un seul dépôt de sang. Les prélèvements réalisés dans les services de pédiatrie ou bien au centre de prélèvement de l'hôpital Pédiatrique sont réceptionnés au niveau de l'Accueil de Biologie Centralisé (ABC). Ce dernier est impliqué dans le processus de réalisation des examens biologiques. Il assure des tâches de la phase pré analytique comme la réception, l'enregistrement, le transfert des échantillons vers les différents plateaux techniques et l'envoi vers d'autres sites si besoin. Après analyse, les buvards sont stockés à +4°C en présence de dessicant.



FIGURE 18 EXEMPLE D'UN DEPOT DE SANG SUR PAPIER BUVARD TYPE GUTHRIE

2.4 Conditions chromatographiques

Dans le but d'obtenir une bonne séparation chromatographique, plusieurs conditions chromatographiques sont testées. De nombreux paramètres sont évalués tels que les caractéristiques de la colonne, la nature et la composition des phases mobiles ainsi que différents gradients d'éluion.

2.4.1 Conditions chromatographiques : Phase (1)

La séparation des acides aminés est effectuée à l'aide d'une colonne Atlantis dC 18 (Waters S.A.S, Saint-Quentin en Yvelines, France). La colonne Atlantis dC18 a une longueur de 10 cm, un diamètre interne de 2.1 mm et une granulométrie de 5 µm.

Deux phases mobiles sont utilisées avec un gradient d'élution. La phase aqueuse A est composée d'eau milliQ, d'acide formique 0.1% et d'acide perfluoropentanoïque 0.01% (PFPA). La Phase organique B est composée d'acétonitrile, d'acide formique 0.1%, PFPA 0.01%.

L'Acide perfluoropentanoïque (PFPA) est utilisé comme agent d'appariement d'ions.

L'élution s'effectue avec un débit de 0.3 mL/min. Le volume échantillon injecté est de 10 µL. La durée de l'analyse est de 15 minutes. Deux gradients d'élution sont testés (*tableau VI et VII*). Une solution dite « d'essai » composée d'un mélange de valine (10 000 µmol/L), isoleucine (10 000 µmol/L) et leucine (20 000 µmol/L) dans du HCl 0.1N est utilisée lors de cette première phase expérimentale.

2.4.2 Conditions chromatographiques : Phase (2)

Deux phases mobiles sont utilisées avec un gradient de concentration. La phase aqueuse A est composée d'eau milliQ, d'acide formique 0.04 %, PFPA 0.02 %. La Phase organique B est composée d'acétonitrile, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %. Le volume échantillon injecté est de 5 µL. Un gradient d'élution est appliqué (*Tableau VII*). Une solution dite « d'essai » composée d'un mélange de valine (100 µmol/L), isoleucine (100 µmol/L) et leucine (200 µmol/L) dans de la phase A est injectée.

2.4.3 Conditions chromatographiques : Phase (3)

Deux phases mobiles sont utilisées avec un gradient de concentration. La phase aqueuse A est composée d'eau milliQ, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %. Dans la phase organique B l'acétonitrile est remplacé par du méthanol auquel est ajouté de l'acide formique à 0.04 %, et du PFPA à 0.02 %. Un gradient d'élution est appliqué (*Tableau IX*). Une solution dite « d'essai » composée d'un mélange de valine (100 µmol/L), isoleucine (100 µmol/L) et leucine (200 µmol/L) dans de la phase A est injectée.

2.4.4 Conditions chromatographiques : Phase (4)

La séparation des acides aminés est effectuée à l'aide d'une nouvelle colonne Sunfire C18, (Waters S.A.S Saint-Quentin en Yvelines, France). Cette colonne est longue de 5 cm, son diamètre interne est de 2.1 mm et sa granulométrie est de 2.5 µm.

Deux phases mobiles sont utilisées avec un gradient de concentration. La phase aqueuse A est composée d'eau milliQ, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %. La phase organique B est composée d'acétonitrile, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %.

Le volume échantillon injecté est de 5 µL. Un gradient d'élution est appliqué (*Tableau X*). Une solution dite « d'essai » composée d'un mélange de valine (100 µmol/L), isoleucine (100 µmol/L) et leucine (200 µmol/L) dans de la phase A est injectée.

2.4.5 Conditions chromatographiques : Phase (5)

La séparation des acides aminés est effectuée à l'aide d'une nouvelle colonne Sunfire C18. Deux phases mobiles sont utilisées avec un gradient de concentration. La phase aqueuse A est composée d'eau milliQ, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %. La phase organique B est composée d'acétonitrile, d'acide formique 0.04 %, de PFPA 0.02 %. Le volume échantillon injecté est de 5 µL. Un gradient d'élution est appliqué (*Tableau X*). La solution dite « d'essai » est composée d'un mélange de valine (100 µmol/L), isoleucine

(100 µmol/L), leucine (200 µmol/L) et d'alloisoleucine (200 µmol/L) dans de la phase A est injectée.

2.5 Résolution

Le facteur de résolution est un paramètre important en chromatographie. Il permet d'évaluer la bonne séparation de deux solutés. La résolution entre deux pics est définie par la relation suivante :

$$\text{Facteur de résolution} = R = 2 \times \frac{[Tr(2) - Tr(1)]}{[\omega(2) + \omega(1)]}$$

Avec Tr(2) : temps de rétention du pic 2

$\omega(2)$ largeur à la base du pic 2

Tr(1) : temps de rétention du pic 1

$\omega(1)$ largeur à la base du pic 1

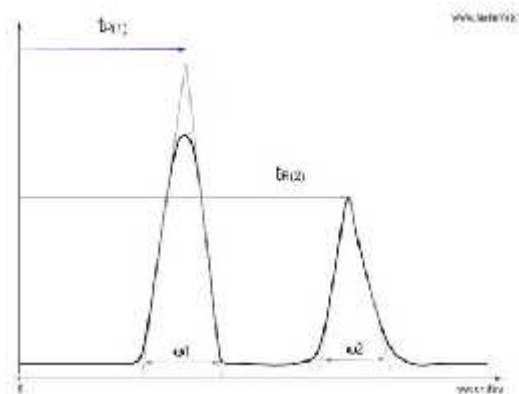


FIGURE 19 RESOLUTION DES PICS EN CHROMATOGRAPHIE

On dit que deux pics sont résolus lorsque le facteur de résolution est supérieur à 2.

2.6 Etalonnage

Nous avons préparé une solution stock d'étalons composée d'un mélange des quatre acides aminés. Les concentrations en leucine, isoleucine, valine et alloisoleucine sont respectivement à 10 000 µmol/L, 5 000 µmol/L, 5 000 µmol/L et 5 000 µmol/L. Une gamme d'étalonnage en 7 points est réalisée par surcharge d'une purée globulaire par la

solution stock. La purée globulaire est obtenue après centrifugation à 3 500 tr/min pendant 15 min d'un pool de sang total. Le plasma est éliminé et la purée globulaire est lavée 7 fois avec de l'eau physiologique. Les solutions étalons A, B, C, D, E, F et G sont déposées sur un papier buvard (35 µL de purée globulaire par cercle). Le papier buvard « étalon » est stocké dans une poche hermétique en présence d'un dessicant à +°4C.



FIGURE 20 CONSERVATION DES PAPIERS BUVARD « ETALONS »

La gamme de calibration est composée de 7 points

Facteur de dilution		1/400	1/200	1/80	1/40	1/20	1/10
Solution stock (µL)	0	5	10	25	50	100	200
Phase A (µL)	200	195	190	175	150	100	0
Sang total (µL)	1900	1900	1900	1900	1900	1900	1900
Concentration (µmol/L)	T1 : leu T2 : val T3 : ileu T4 : Allo	T1+25L T2+12.5V T3+12.5I T4+12.5A	T1+50L T2+25V T3+25I T4+25A	T1+100L T2+50V T3+50I T4+50A	T1+250L T2+125V T3+125I T4+125A	T1+500L T2+250V T3+250I T4+250A	T1+1000L T2+500V T3+500I T4+500A
Solution finale	A	B	C	D	E	F	G

Soit T1, T2, T3 et T4 les concentrations basales, respectivement de la leucine [leu, L], de la valine [val, V] de l'isoleucine [ileu, I] et de l'alloisoleucine [allo, A], présentes dans la purée de sang

TABLEAU III PROTOCOLE DE PREPARATION DES ETALONS

2.7 Contrôle de qualité interne.

Nous avons préparé également trois échantillons de contrôle de qualité (niveau bas, moyen et haut) pour les quatre acides aminés leucine, isoleucine, valine et alloisoleucine. Les contrôles sont préparés par surcharge de la même purée globale utilisée précédemment (*Tableau IV*).

	CIQ bas : CIQ1	CIQ moyen : CIQ2	CIQ haut : CIQ3
Solution étalon (μL)	15	30	150
Solution de phase A (μL)	185	170	50
Purée de sang total (μL)	1800	1800	1800
Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	T1+75L T2+37.5V T3+37.5I T4+37.5A	T1+150L T2+75V T3+75I T4+75A	T1+750L T2+325V T3+325I T4+325A

Soit T1, T2, T3 et T4 les concentrations basales, respectivement de la leucine [leu, L], de la valine [val, V] de l'isoleucine [ileu, I] et de l'alloisoleucine [allo, A], présentes dans la purée de sang

TABLEAU IV PROTOCOLE DE PREPARATION DES CIQ

2.8 Préparation des échantillons (patients, étalons et contrôles de qualité).

L'extraction se fait à partir de taches de sang séché (échantillon de patient, étalon ou contrôle de qualité) sur papier buvard. Un disque de 3 mm de diamètre est obtenu en poinçonnant la tache de sang. Le disque est déposé au fond d'un puits d'une plaque à 96

puits. 150 μL d'étalon interne dilué au demi dans de la phase B organique sont ajoutés dans le puits. (Trousse de réactifs MassChrom® pour la détermination par LC/MS-MS des acides aminés et des acylacnitrines sur sang séché pour le dépistage des nouveaux nés sans dérivation, *Chromsystems instruments and Chemicals GmbH, Munich, Allemagne* [50]). La plaque est fermée avec un film souple et ensuite mise sous agitation pendant 20 min à 600 tours. Les échantillons sont transférés dans un tube à hémolyse ensuite placés dans un évaporateur sous azote. Une fois l'évaporation du solvant terminée, le dépôt est repris par 100 μL de phase A (phase aqueuse) dans un godet avant l'injection dans le système LC-MS/MS.

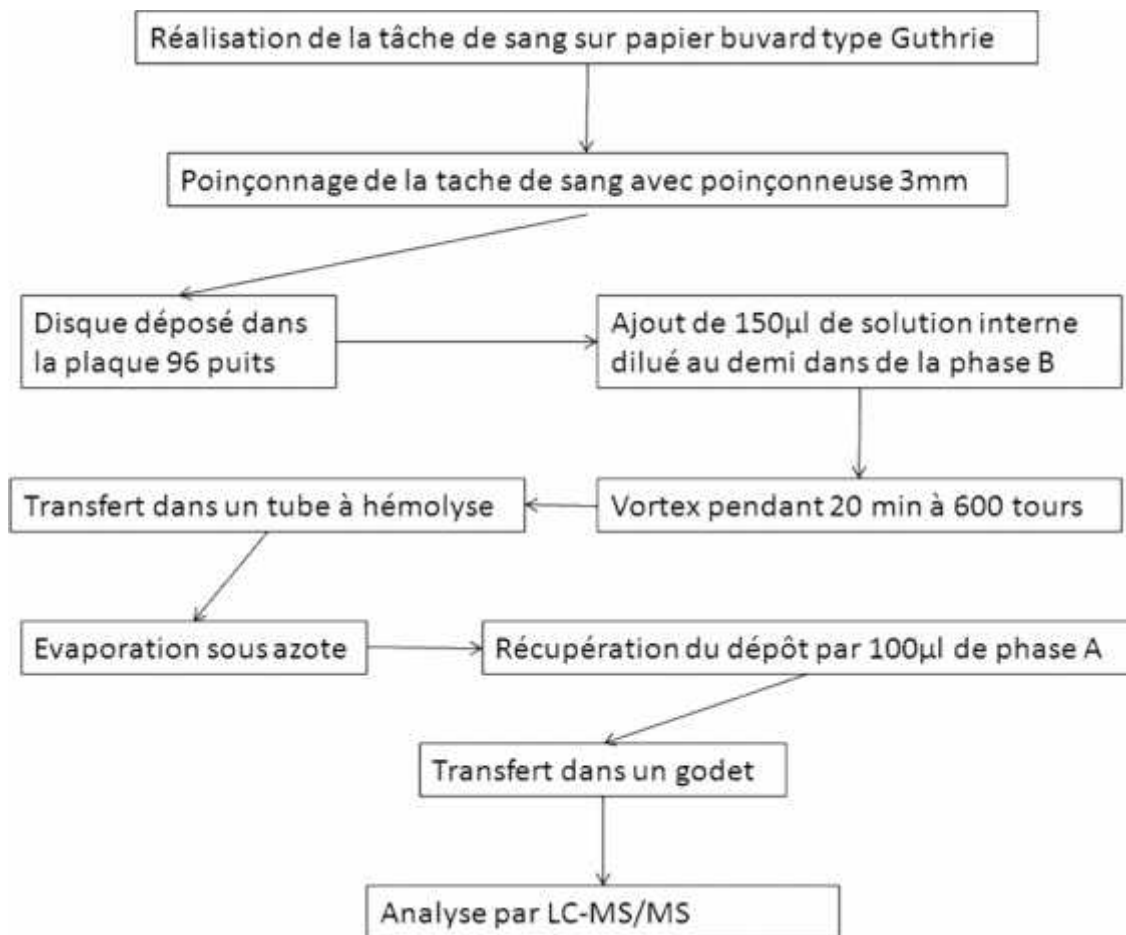


FIGURE 21 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

2.9 Validation de la méthode selon la norme ISO

15189 (COFRAC) : paramètres étudiés

Le dosage des acides aminés ramifiés est une méthode quantitative. Il s'agit d'une méthode dite « maison » nécessitant une validation en portée B (Tableau V). Lors de cette première étape de validation, j'ai évalué : 1) la fidélité de la méthode par les études de répétabilité et de reproductibilité. 2) la contamination inter-échantillons. 3) les limites de linéarité de la méthode et enfin 4) la comparaison avec la méthode de dosage utilisée en routine dans le laboratoire.

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<i>Spécificité analytique</i>	Oui	Non	Oui
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	Oui	Oui	Oui
<i>Justesse (approche de la)</i>	Oui	Oui, dès que possible	Oui
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	Oui	A vérifier si nécessaire ⁴	Oui
<i>Incertitudes/ facteurs de variabilité et évaluation</i>	Oui	Oui	Oui
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles	Oui
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	Oui	Non	Oui
<i>Robustesse</i>	Non	Non	si besoin
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)</i>	Oui	à vérifier si nécessaire ⁵	Oui
<i>Intervalle de référence « ex-valeurs normales »</i>	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié	Oui à établir
<i>Comparaison avec une méthode de référence</i>	Oui (si existe)	Non	Oui (si possible)
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD)⁶</i>	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui
<i>Analyse des discordances⁷</i>	Oui	Oui	Oui
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude⁸ de la méthode ou du système analytique.			

TABLEAU V VALIDATION D'UNE METHODE QUANTITATIVE DE PORTEE B SELON LE GUIDE SH-GTA-04 [51]

2.9.1 Évaluation de la répétabilité.

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. Nous avons dosé les trois contrôles internes de qualité 11 fois le même jour. Pendant la période d'évaluation, les CQI sont conservés à +4°C dans une poche hermétique en présence d'un dessiccant.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$\text{CV en \%} = (s) \times 100/m$$

Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (Fournisseur, Société française de biologie clinique (SFBC), ou des objectifs analytiques reconnus (RICOS, ...)) [51].

2.9.2 Évaluation de la fidélité intermédiaire

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages. Classiquement, la fidélité intermédiaire est évaluée à l'aide des coefficients de variation calculés à partir des résultats des CIQ. La fidélité intermédiaire a été évaluée sur 24 séries d'analyses différentes à 3 niveaux de concentration, basse, moyenne et haute. Pendant la période d'évaluation, les CIQ sont conservés à +4°C dans une poche hermétique en présence d'un dessiccant.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$\text{CV en \%} = (s) \times 100/m$$

Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (Fournisseur, Société française de biologie clinique (SFBC), ou des objectifs analytiques reconnus (RICOS, ...)) [51].

2.9.3 Évaluation de la contamination

L'étude de contamination inter-échantillons a été effectuée selon le protocole suivant : Un échantillon à valeur élevée est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) peuvent être répétées plusieurs fois (5 fois) afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante : [51]

$$\text{Contamination en \%} = [(mB1-mB3) * (mH-mB3)] \times 100$$

La contamination a été évaluée à l'aide des deux niveaux de contrôle de qualité haut (*Tableau IV*)

2.9.4 Évaluation de la limite supérieure de la linéarité

L'évaluation de la linéarité d'une méthode de dosage se fait généralement, par dilution d'un échantillon de concentration très élevée, les résultats obtenus permettront de vérifier la linéarité entre les mesures dilutions effectuées et les concentrations

calculées. La limite supérieure de linéarité et la limite de quantification permettent de définir le domaine de mesure de la méthode » [51].

Pour évaluer la limite de linéarité de notre méthode, nous avons surchargé un sang total ayant une faible concentration en acides aminés ramifiés (valine, isoleucine et leucine) par des quantités croissantes en leucine, valine et isoleucine correspondant aux 7 points de calibration (A, B, C, D, E, F et G). Nous avons ensuite comparé les valeurs mesurées aux valeurs théoriques par régression linéaire. La droite de calibration est considérée comme linéaire si le coefficient de corrélation (r^2) est supérieur à 0.99 [51]. La linéarité de la réponse est illustrée par les figures 30, 32 et 34.

2.9.5 Comparaison de méthodes

La comparaison des résultats d'une méthode Y (à tester) avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire ou prise comme référence) nécessite idéalement une analyse d'au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique. Les données pertinentes sont apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées (similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0) [51].

Notre étude de corrélation a porté sur 25 échantillons de sang total, prélevés sur des tubes BD Vacutainer® Héparine de lithium. Pour chaque échantillon, une partie du sang total est déposé sur des papiers buvard (analyse par LC-MS/MS). Le reste du prélèvement est centrifugé pendant 15 minutes à 3 500 tr/min. Le plasma correspondant est ensuite congelé pour être analysé par la technique de référence du laboratoire. Les corrélations ont comparé cette nouvelle méthode LC-MS/MS à la technique chromatographie échange d'ion avec détection à la ninhydrine (CEI), actuellement utilisée en routine au laboratoire

Chapitre 3 Résultats et Discussion.

3.1 Optimisation de la méthode chromatographique

La spectrométrie de masse en tandem sépare et quantifie les molécules ionisées en fonction du rapport m/z . La leucine et l'isoleucine sont deux isomères (Leu et Ile, $M=131$) avec la même formule chimique et la même masse. La détection en spectrométrie de masse ne permet pas de les séparer dans le premier quadripôle. Il en est de même pour l'alloisoleucine qui est le diastéréoisomère de l'isoleucine. Il était donc indispensable de développer en amont de l'analyse spectrométrique, une méthode chromatographique permettant de séparer les trois composés leucine, isoleucine et alloisoleucine. Les méthodes de séparation chromatographique des acides aminés sont nombreuses. La chromatographie liquide haute performance est la technique la plus utilisée. Elle met en œuvre des séparations sur résines échangeuses d'ions ou des séparations liquide-liquide en phase inverse.

La plupart des laboratoires du réseau maladies métaboliques sont équipés par des analyseurs automatisés d'acides aminés basés sur le principe de la chromatographie d'échange d'ions avec une dérivation post-colonne à la ninhydrine. La séparation des acides aminés ionisés présents dans l'échantillon résulte de leur interaction avec des sites ioniques de la phase stationnaire. C'est la méthode utilisée en routine dans le laboratoire de Biochimie de l'hôpital Pellegrin (CHU de Bordeaux) pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de leucine. Au sein de notre laboratoire, la chromatographie d'échange d'ions n'offre pas la possibilité de quantifier les acides aminés ramifiés sur tache de sang. L'émergence de techniques alternatives comme la spectrométrie de masse en tandem couplée à la HPLC (LC-MS/MS) dans le domaine de la biologie et particulièrement celui du diagnostic et du dépistage néonatal systématique a ouvert la possibilité de remplacer la technique de routine par la LC-MS/MS pour le suivi des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang.

De nombreux travaux ont décrit l'analyse des acides aminés non dérivés à partir d'échantillons plasmatiques ou à partir de taches de sang par chromatographie par appariement d'ions ou paire d'ions en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem [32,52,53]. Piraud *et al* [53] ont décrit la séparation des acides aminés sur une colonne C18 en présence d'un agent d'appariement qui est l'acide tridécafluoroheptanoïque (TDFHA). Cette méthodologie permet l'analyse des acides aminés à partir de matrices complexes telles que le plasma ou l'urine sans l'étape de dérivation. Au cours de ces travaux les auteurs ont validé la quantification de 16 acides aminés (profil long) par rapport aux étalons internes deutérés correspondants.

Les acides carboxyliques perfluorés sont largement utilisés comme agent d'appariement. En raison de leur volatilité, ils sont généralement compatibles avec une détection par MS/MS [54,55]. La formation de paires d'ions favorise les séparations chromatographiques de substances ionisées ou ionisables. Son principe consiste à transformer des espèces chimiques hydrophiles et ioniques en des entités hydrophobes capables d'interagir avec la phase stationnaire apolaire. L'avantage de cette interaction avec la phase stationnaire est d'augmenter la rétention des espèces chimiques à séparer. En revanche, l'inconvénient de l'utilisation des acides carboxyliques perfluorés est la possibilité de suppression de l'intensité du signal en leur présence [56]. Ce phénomène semble dépendre du type d'appareillage utilisé, des espèces chimiques à séparer et du type d'acide carboxylique perfluoré utilisé pour l'appariement d'ions.

Contrairement à l'équipe de Piraud. M et al, notre profil acides aminés est un profil court ciblé pour le suivi des patients atteints de leucinose en dehors des phases de décompensation. Seulement 4 acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, valine, isoleucine et alloisoleucine) sont quantifiés à partir d'une tache de sang par chromatographie de paire d'ions en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). L'agent d'appariement d'ions utilisé est l'acide perfluoropentanoïque. Il sera important de déterminer l'influence de la concentration de l'acide perfluoropentanoïque sur la réponse du détecteur vis à vis des acides aminés à chaîne ramifiée.

Pendant l'étape d'optimisation, de nombreuses conditions chromatographiques ont été évaluées.

Lors de la **première phase expérimentale [phase (1)]**, les essais de séparation des acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine et valine) sont réalisés sur une colonne Atlantis dC 18. Il s'agit d'une phase stationnaire apolaire en silice greffée en C18. La phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile. La rétention d'un soluté en chromatographie à polarité inverse est d'autant plus importante que sa solubilité dans la phase mobile est plus faible. Les composés polaires seront élués avant les composés apolaires car ils sont plus solubles dans la phase mobile. Lors de la phase (1), deux gradients d'élutions sont testés (*Tableaux VI et VII*). Les deux gradients diffèrent principalement par l'importance du % d'acétonitrile entre 0 et 7 minutes. Ces conditions chromatographiques n'ont pas permis de séparer les deux acides aminés, leucine et isoleucine. En revanche le pic de valine est parfaitement identifié (*Figures 20 et 21*). La solution « d'essai » injectée, mélange des trois acides aminés (valine, isoleucine et leucine), étant très concentrée, les pics chromatographiques observés sont énormes provoquant une saturation de la colonne. Ce phénomène a réduit d'autant plus la résolution des pics. (*Figures 22 et 23*).

Gradient 1^{er} essai

Temps (min)	Phase aqueuse A (%)	Phase organique B (%)
0	95.0	5.0
7.00	75.0	25.0
7.10	0	100.0
11.00	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

TABLEAU VI **GRADIENT DE CONCENTRATION 1^{ER} ESSAI**

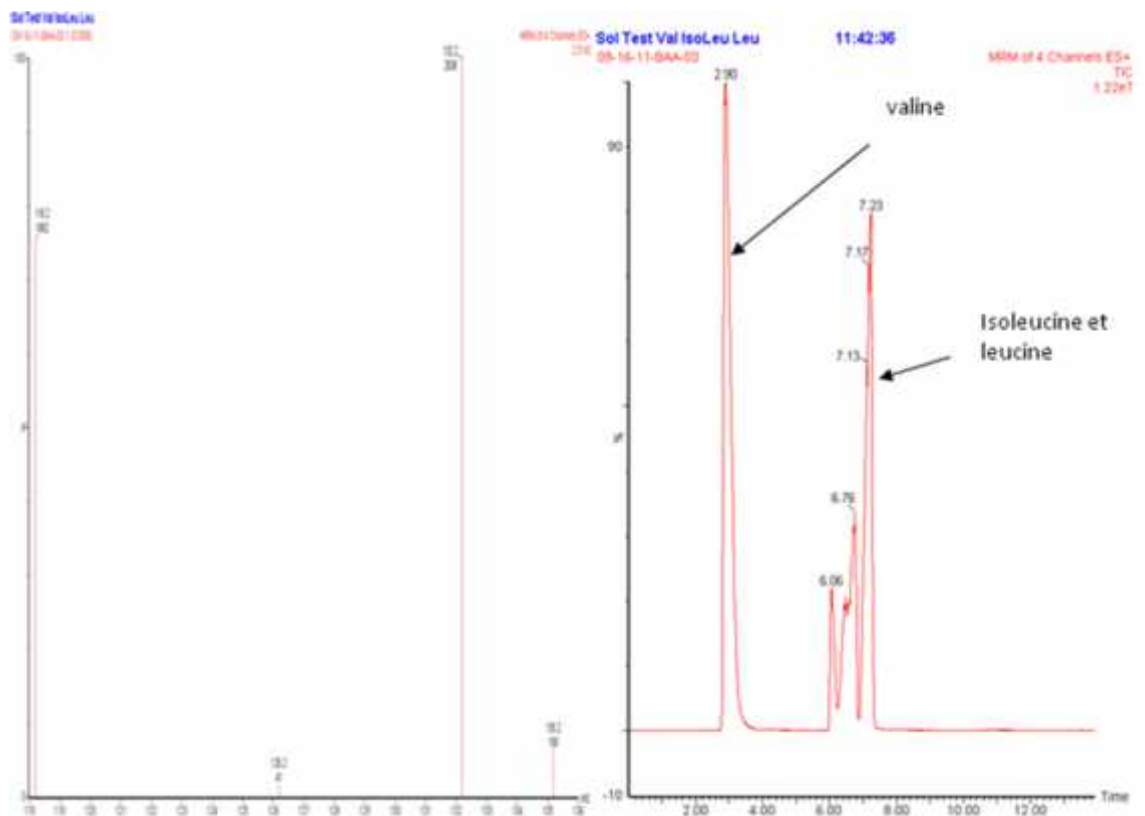


FIGURE 22 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION TEST CONTENANT DE LA VALINE, ISOLEUCINE, LEUCINE AVEC LES CONDITIONS PHASE 1.

Colonne Atlantis dC 18, gradient d'éluion (cf Tableau VI) : phase aqueuse A : eau milliQ, acide formique 0.1%, Acide perfluoropentanoïque 0.1% (PFPA). Phase organique B : acétonitrile, acide formique 0.1%, PFPA 0.1%. Mélange injecté: valine (10000 µmol/l), isoleucine (10000 µmol/l) et leucine (20000 µmol/l). Transitions : Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89.

Gradient essai 2^{ème} essai

Temps (min)	Phase aqueuse A (%)	Phase organique B (%)
0	90.0	10.0
0.50	90.0	10.0
7.00	80.0	20.0
7.10	0.0	100.0
11.00	90.0	10.0
15.00	90.0	10.0

TABLEAU VII GRADIENT DE CONCENTRATION 2EME ESSAI

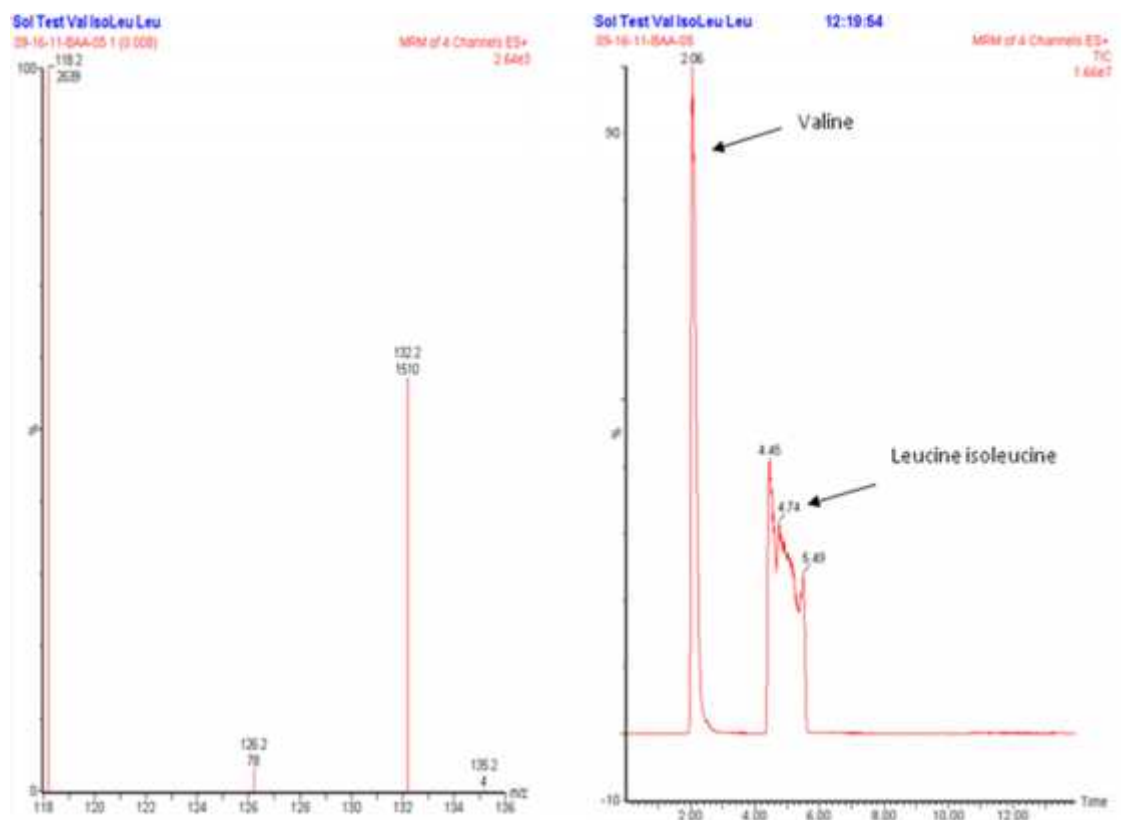


FIGURE 23 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UN MELANGE DE VALINE, LEUCINE, ISOLEUCINE

Colonne Atlantis dC 18, gradient d'éluion (cf Tableau VII): phase aqueuse A: eau milliQ, acide formique 0.1%, Acide perfluoropentanoïque 0.1% (PFPA). Phase organique B: acétonitrile, acide formique 0.1%, PFPA 0.1%. Mélange injecté [valine (10000 $\mu\text{mol/l}$), isoleucine (10000 $\mu\text{mol/l}$) et leucine (20000 $\mu\text{mol/l}$)]. Transitions: Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89.

Les acides aminés sont des espèces chimiques comportant des groupements acides et basiques. Il est donc important de faire varier le pH de l'éluant pour optimiser l'ionisation des espèces chimiques en solution. Plus l'acide aminé est ionisé, plus son temps de rétention diminue car la solubilité augmente en phase aqueuse.

Lors de la phase (2) notre but était d'améliorer la séparation des acides aminés. Nous avons donc diminué l'acidité des phases mobiles en réduisant les proportions d'acide formique et d'acide perfluoropentanoïque. Un gradient d'éluion est appliqué avec une proportion plus importante en acétonitrile dès la septième minute (Tableau VII). La phase mobile de départ était très polaire (phase 1) car riche en eau. L'accroissement

du pourcentage d'acétonitrile (augmentation de la proportion du solvant organique) a graduellement diminué la polarité de la phase mobile avec une augmentation de la force éluante. Nous avons également diminué fortement la concentration des acides aminés dans le mélange de la solution d'essai. La solution dite « d'essai » injectée est composée d'un mélange de valine (100 $\mu\text{mol/L}$), isoleucine (100 $\mu\text{mol/L}$) et leucine (200 $\mu\text{mol/L}$). Ces conditions chromatographiques ont amélioré la résolution des pics chromatographiques sans saturer la colonne. Les temps de rétention des acides aminés, valine, isoleucine et leucine sont respectivement de 2.70 min, 5.01 min et 5.4 min pour une durée analytique de 15 minutes.

Temps (min)	Phase aqueuse A (%)	Phase organique B (%)
0	95.0	5.0
7.00	60.0	40.0
7.10	60.0	40.0
11.00	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

TABLEAU VIII ^{3^{EME}} GRADIENT DE CONCENTRATION

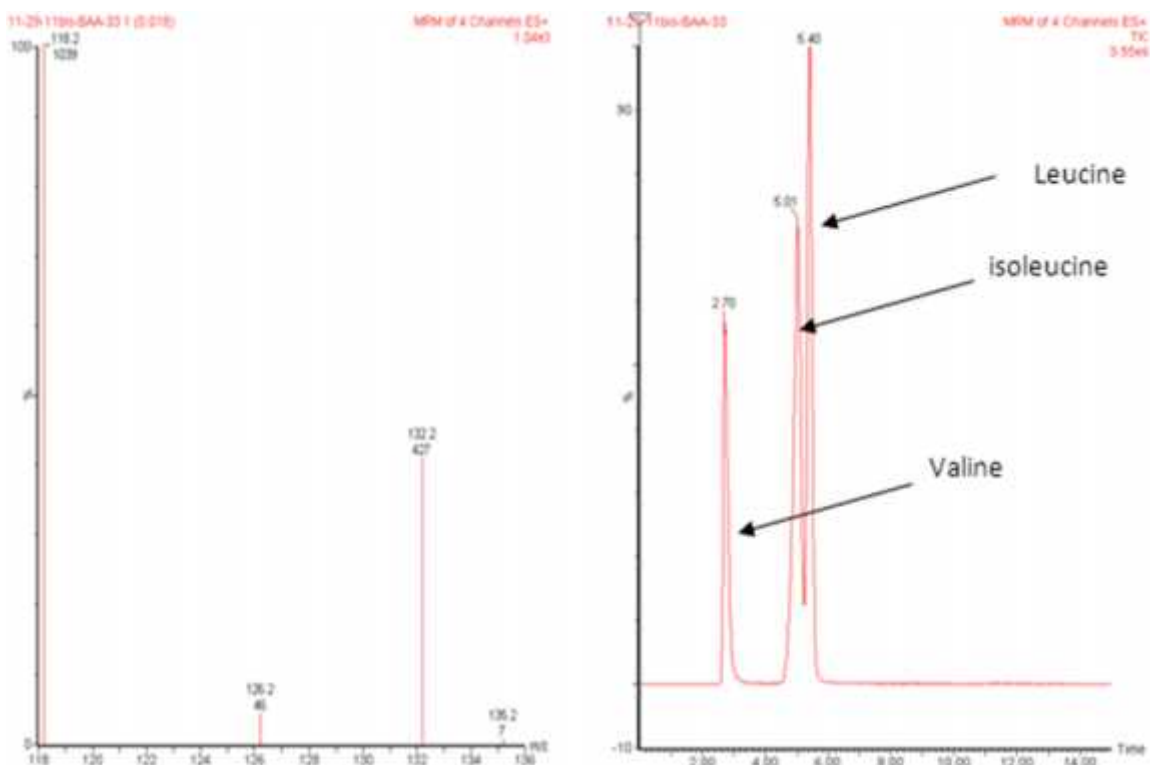


FIGURE 24 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UNE SOLUTION DE VALINE, LEUCINE, ISOLEUCINE

Colonne Atlantis dC 18, gradient d'éluion (cf Tableau VIII): phase aqueuse A eau milliQ, acide formique 0.04 %, Acide perfluoropentanoïque 0.02 % (PFPA). Phase organique B : acétonitrile, acide formique 0.04%, PFPA 0.02 %. Mélange injecté [valine (100 µmol/l), isoleucine (100 µmol/l) et leucine (200 µmol/l)]. Transitions : Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89.

Lors des essais de la phase 3, nous avons remplacé l'acétonitrile par le méthanol un autre solvant organique, moins polaire que l'acétonitrile. Un gradient d'éluion est testé. (Tableau IX).

Temps (min)	Phase aqueuse A (%)	Phase organique B (%)
0	95.0	5.0
7.00	75.0	25.0
7.10	75.0	25.0
11.00	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

TABLEAU IX 4^{EME} GRADIENT DE CONCENTRATION

Le remplacement de l'acétonitrile par le méthanol n'a pas amélioré la résolution des pics de leucine et isoleucine. Les facteurs de résolution calculés sont respectivement de 1.84 et 2.06 pour le méthanol et l'acétonitrile. On estime que deux pics sont résolus lorsque le facteur de résolution est supérieur à 2. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'une phase mobile organique à base d'acétonitrile. Ce dernier, a également été utilisé comme éluant par de nombreux auteurs [53, 32,55]) (figure 24 et 25).

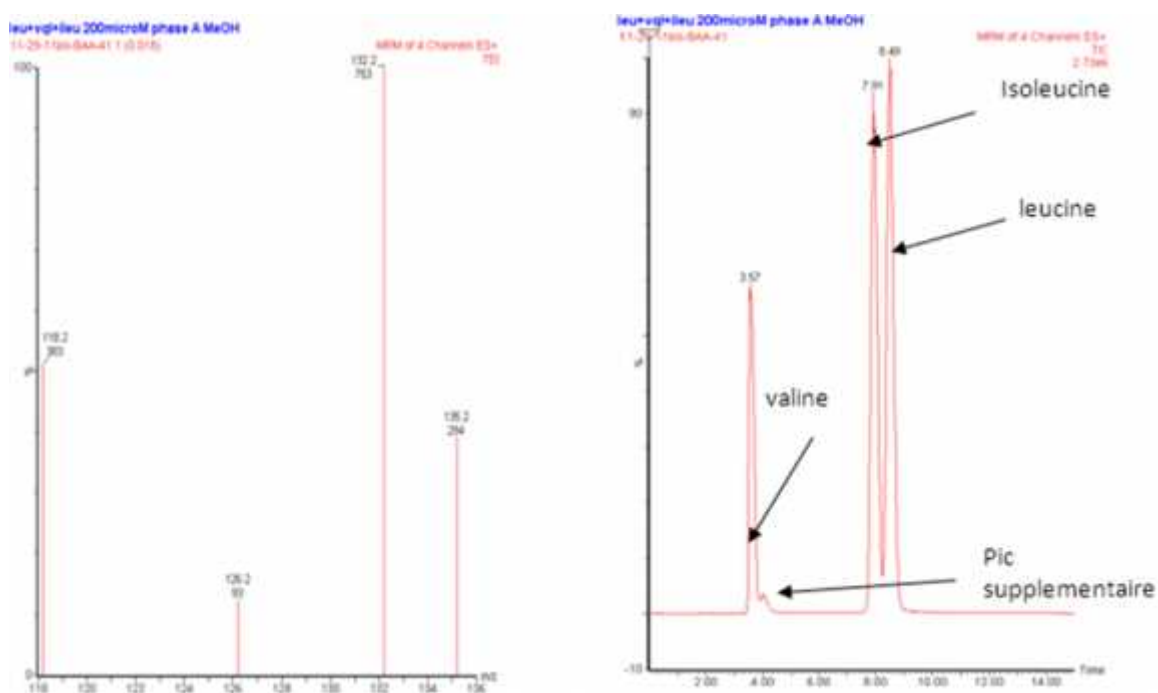


FIGURE 25 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'ÉLUTION D'UN MÉLANGE DE VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE

Colonne Atlantis dC 18, gradient d'éluion (cf Tableau VIII) : phase aqueuse A eau milliQ, acide formique 0.04 %, Acide perfluoropentanoïque 0.02 % (PFPA). Phase organique B : méthanol, acide formique 0.04%, PFPA 0.02 %. Mélange injecté [valine (100 µmol/l), isoleucine (100 µmol/l) et leucine (200 µmol/l)]. Transitions : Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89.

Une bonne séparation en chromatographie liquide implique que les diverses espèces du mélange soient bien retenues sur la colonne avec une affinité suffisante pour la phase stationnaire. Idéalement, le but est d'obtenir une résolution élevée dans un temps très court.

Lors des essais de la Phase 4, de nouvelles conditions chromatographiques sont testées avec comme principal changement la modification de la phase stationnaire. La colonne Atlantis dC 18 précédemment utilisée est remplacée par une colonne Sunfire C18. Cette dernière est deux fois moins longue avec une granulométrie deux fois moins importante. Actuellement, la tendance est à l'utilisation de particules de la phase stationnaire avec un diamètre compris entre 3,5 et 5 µm permettant un bon compromis entre le temps d'analyse et une bonne résolution des pics chromatographiques. Ces colonnes ont comme avantage la rapidité de l'analyse et une moindre consommation de solvant. Ces derniers ayant un coût important. La colonne Atlantis est généralement utilisée pour la séparation de composés polaires. La colonne Sunfire C18 est plus adaptée à la séparation de composés peu polaires. Un gradient d'élution est appliqué (*Tableau X*).

Temps (min)	Phase aqueuse A (%)	Phase organique B (%)
0	95.0	5.0
7.00	75	25
7.10	75	25
11.00	95.0	5.0
15.00	95.0	5.0

TABLEAU X ^{5^{EME}} GRADIENT DE CONCENTRATION

Le changement de la phase stationnaire et la baisse de la granulométrie ont amélioré de façon conséquente le profil chromatographique. Les pics de leucine et isoleucine sont étroits et bien séparés. Les temps de rétention des acides aminés, valine, isoleucine et leucine sont respectivement de 2.75 min, 5.93 min et 6.35 min pour une durée analytique de 15 minutes. La résolution des pics de leucine et isoleucine est de 3.88. La diminution

de la longueur de la colonne n'a eu aucune influence sur la durée de l'analyse. Ce système chromatographique est le meilleur compromis en termes de sélectivité et de temps d'analyse.

La séparation des 3 acides aminés est efficace en un temps court de 15 minutes. Le temps d'analyse est 3 fois moins important qu'un profil acide aminés court (*figure 27*) et 8 fois moins important que le profil acides aminés long (*figure28*) réalisés par l'analyseur automatisé d'acides aminés du laboratoire de Biochimie. La chromatographie de paire d'ions en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) offre la possibilité de quantifier les acides aminés à chaîne ramifiée à partir d'une tache de sang. En revanche, l'analyse des acides aminés par la technique de routine nécessite un prélèvement sur tube hépariné au pli du coude, un acte plus invasif que le prélèvement capillaire de sang total et qui nécessite le déplacement du patient au centre de prélèvement de l'hôpital.

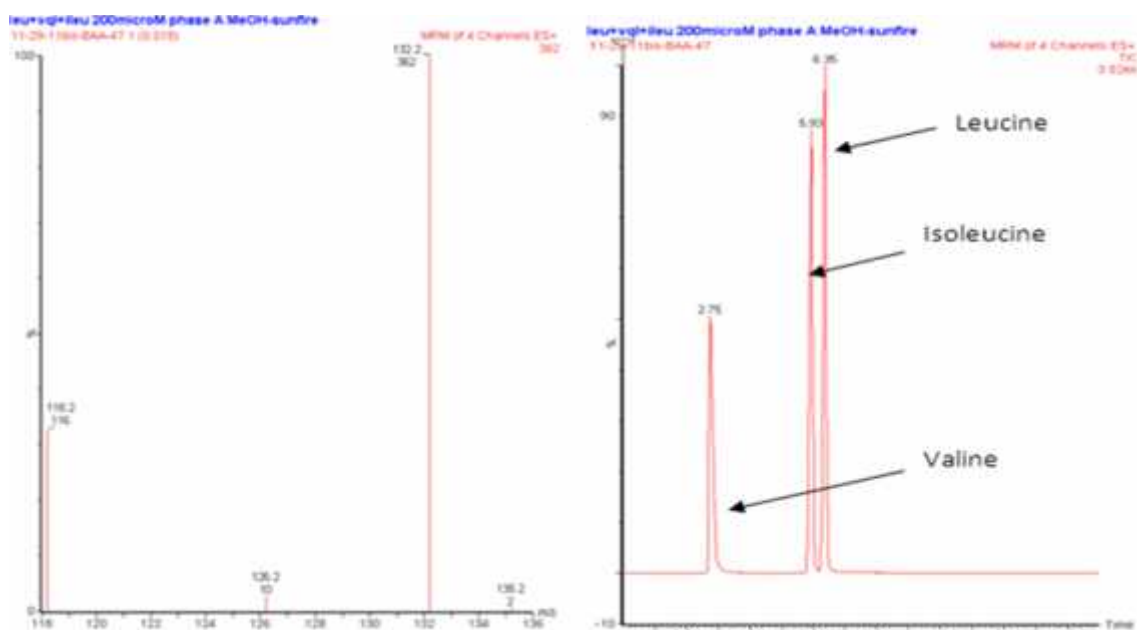


FIGURE 26 SPECTRE ET CHROMATOGRAMMES D'ELUTION D'UN MELANGE LEUCINE, VALINE, ISOLEUCINE.

Colonne Sunfire C18, gradient d'élution (cf *Tableau x* : phase aqueuse A eau milliQ, acide formique 0.04 %, Acide perfluoropentanoïque 0.02 % (PFPA). Phase organique B : acétonitrile, acide formique 0.04%, PFPA 0.02 %. **Mélange injecté** [valine (100 µmol/l), isoleucine (100 µmol/l) et leucine (200 µmol/l)]. **Transitions** : Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89.

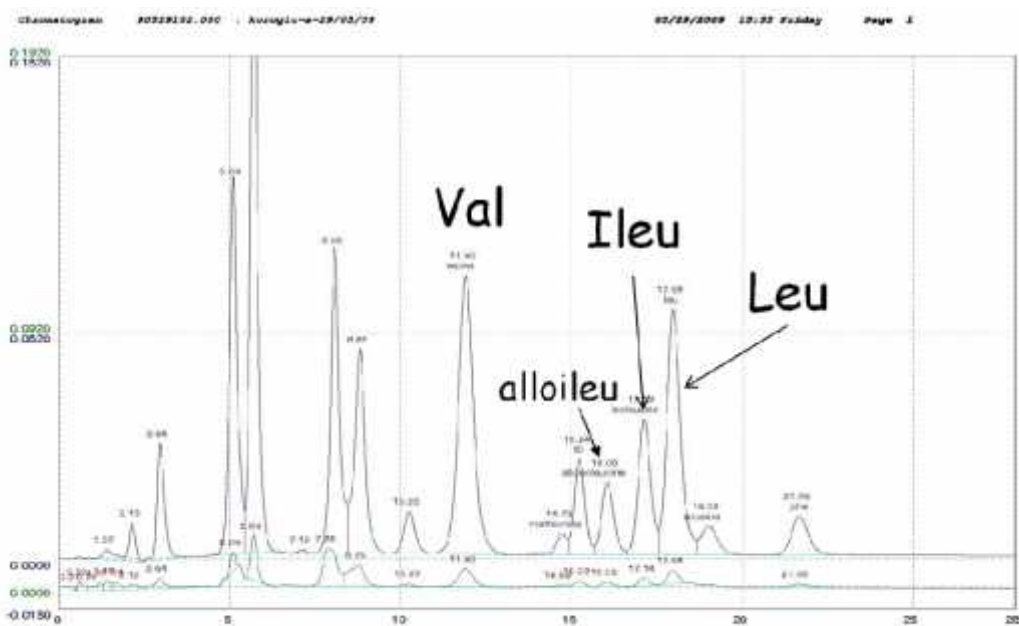


FIGURE 27 PROFIL ACIDES AMINES (COURT) OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE D' ECHANGE D'IONS (JEOL AMINOTAC®)

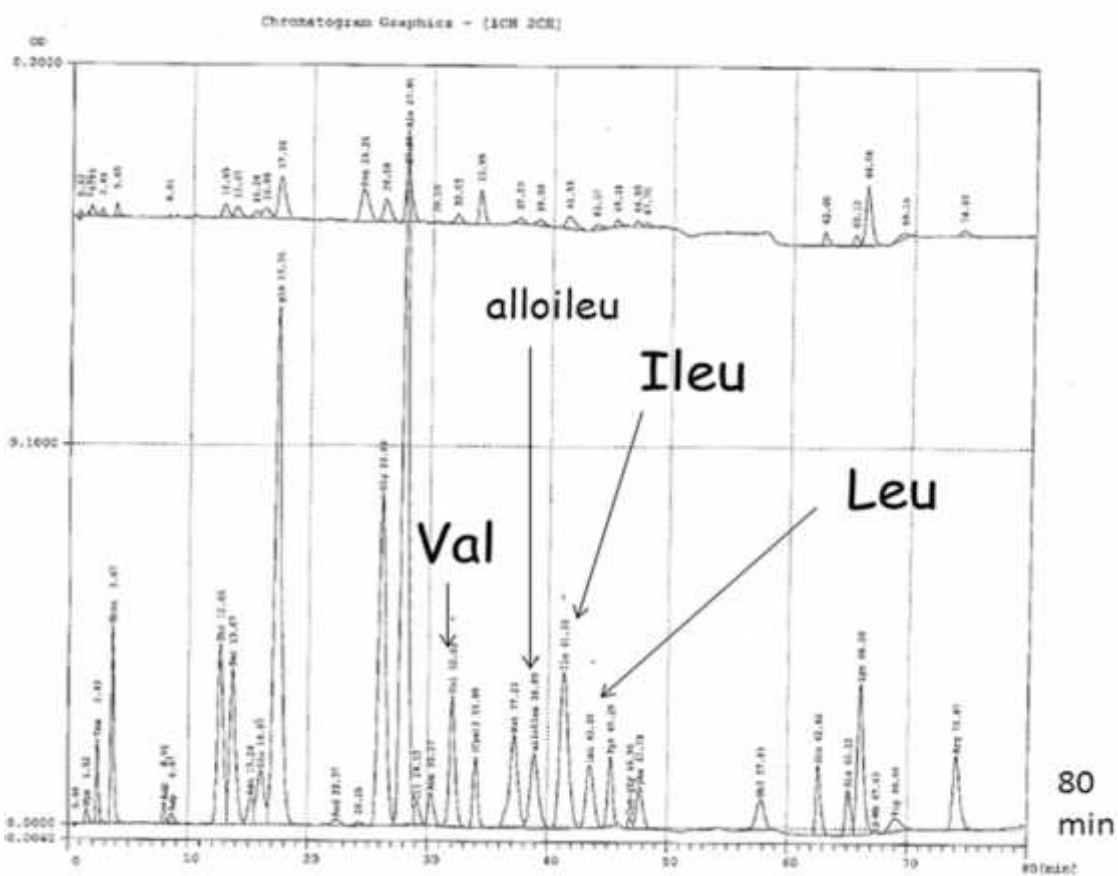


FIGURE 28 PROFIL ACIDES AMINES LONG OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE D' ECHANGE D'IONS (JEOL AMINOTAC®)

L'analyse quantitative des acides aminés plasmatiques des patients atteints de leucinoase montre l'accumulation des acides aminés ramifiés (leucine, valine et isoleucine) et l'apparition de l'alloisoleucine, un diastéréoisomère de l'isoleucine dont la présence est pathognomonique de la pathologie. L'alloisoleucine représente une interférence analytique par sa possibilité de co-éluer avec l'isoleucine ou la leucine et de fausser la quantification de ces deux acides aminés dont la concentration est indispensable à l'adaptation du régime diététique.

Le but du dernier essai (Phase (5)) est de séparer les 4 composés valine, leucine isoleucine et alloisoleucine. La séparation est effectuée sur une colonne Sunfire C18. Les conditions chromatographique de la phase (4) sont appliquées. Une solution dite « d'essai » est composée d'un mélange de valine (100 µmol/L), isoleucine (100 µmol/L), leucine (200 µmol/L) et d'alloisoleucine (200 µmol/L) dans de la phase A. Le profil chromatographique est très satisfaisant. On observe une bonne séparation et une parfaite résolution des 4 pics correspondant à la valine, leucine isoleucine et alloisoleucine. Les temps de rétention des acides aminés, valine, alloisoleucine, isoleucine et leucine sont respectivement de 2.47 min, 5.22 min, 5.60 min et 6.04 min pour une durée analytique de 15 minutes. Ces temps de rétention sont proches de ceux observés par Sowel. J *et al* [32]. Cette équipe a quantifié les acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang par chromatographie en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La séparation des acides aminés à chaîne ramifiée a été réalisée sur une colonne apolaire greffée en C8. En revanche, la durée d'analyse est plus courte (10 minutes). Il serait intéressant de tester ce type de colonne pour un gain de temps.

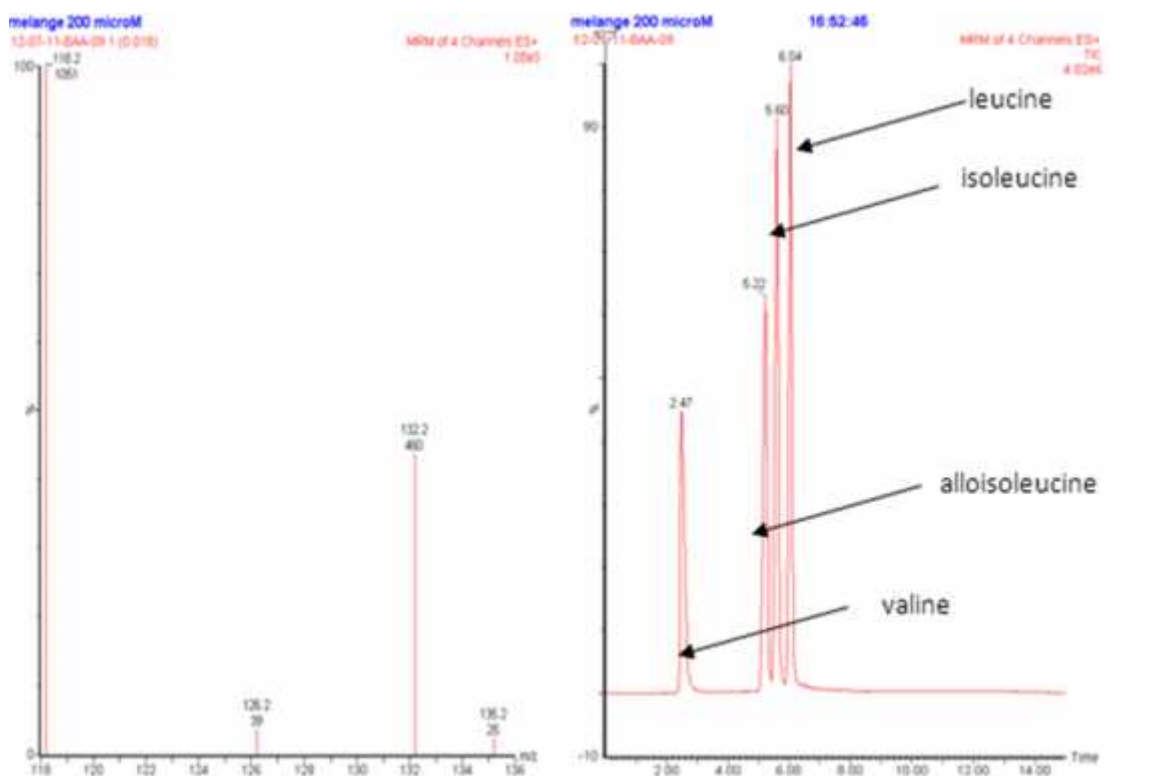


FIGURE 29 SPECTRE ET CHROMATOGRAMME D'UN MELANGE LEUCINE, VALINE, ISOLEUCINE ET ALLOISOLEUCINE.

Colonne Sunfire C18, gradient d'élution (cf *Tableau x* : phase aqueuse A : eau milliQ, acide formique 0.04 %, Acide perfluoropentanoïque 0.02 % (PFPA). Phase organique B : acétonitrile, acide formique 0.04%, PFPA 0.02 %. Mélange injecté [valine (100 µmol/l), isoleucine (100 µmol/l), leucine (200 µmol/l), alloisoleucine (200µmol/l)]. Transitions : Valine 118>72, Valine D8 126>80, Leucine/isoleucine 132>86, Leucine D3 135>89

3.2 Validation analytique

La loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale a rendu obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189. L'ensemble des examens devront être accrédités d'ici à 2020. L'accréditation est délivrée par le Comité Français d'accréditation (COFRAC) qui se base sur les normes européennes harmonisées NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870.

L'objectif de l'accréditation est de garantir la fiabilité et la qualité des examens réalisés au sein du LBM. [57]. Concernant la validation analytique, nous avons suivi le protocole décrit dans le guide de vérification et de validation des méthodes en biologie

médicale (SH-GTA-04).

Lors de cette première étape de validation partielle, nous avons étudié la linéarité de la méthode, la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la contamination inter-échantillons et enfin la corrélation avec la méthode actuellement utilisée en routine au laboratoire (CEI, Jeol-Aminotac®).

3.2.1 Linéarité

Une droite d'étalonnage en 7 points est réalisée par surcharge d'une purée globulaire par la solution stock comme indiqué dans le Tableau III. Les étalons sont traités dans les mêmes conditions que les échantillons de patients ou de contrôles de qualité. L'étalonnage est linéaire pour les 3 acides aminés, valine, leucine et isoleucine (*Figures 30, 32 et 34*). La linéarité de la méthode a été évaluée par une analyse de régression linéaire. Les valeurs théoriques et mesurées pour les 7 points de calibration (A, B, C, D, E, F et G) et pour chacun des acides aminés sont comparées par régression linéaire. (*Figures 31, 33 et 35*). Les coefficients de corrélations sont de 0.999 pour les trois acides aminés. Ces résultats montrent que notre méthode est linéaire jusqu'à une concentration de 500 $\mu\text{mol/L}$ pour la valine et l'isoleucine et jusqu'à 1000 $\mu\text{mol/L}$ pour la leucine. Ces plages de mesure conviennent pour le suivi des patients en phase métabolique stable. En dehors des phases de décompensation, les patients présentent en générale des taux de leucine plasmatique inférieur à 380 $\mu\text{mol/L}$. L'objectif du traitement étant de maintenir la concentration de la leucine plasmatique entre 100-300 $\mu\text{mol/L}$.

Compound name: Val
Correlation coefficient: $r = 0.996190$, $r^2 = 0.992394$

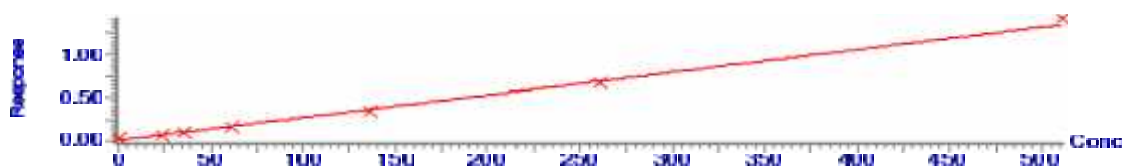


FIGURE 30 DROITE DE CALIBRATION : VALINE

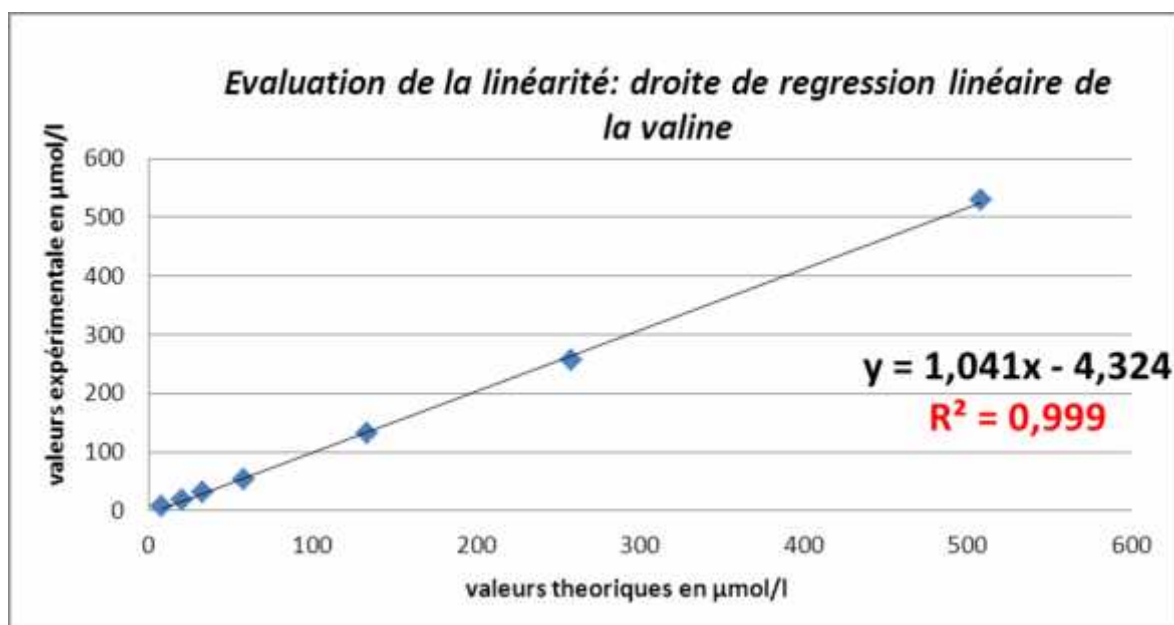


FIGURE 31 LINEARITE DU DOSAGE DE LA VALINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS.

Compound name: Iso-Leu
Correlation coefficient: $r = 0.996496$, $r^2 = 0.993005$

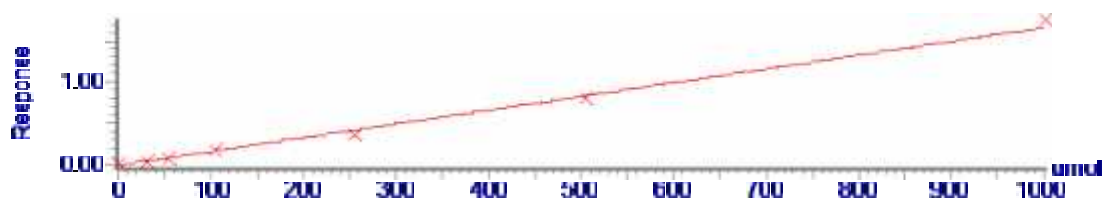


FIGURE 32 DROITE DE CALIBRATION : ISOLEUCINE

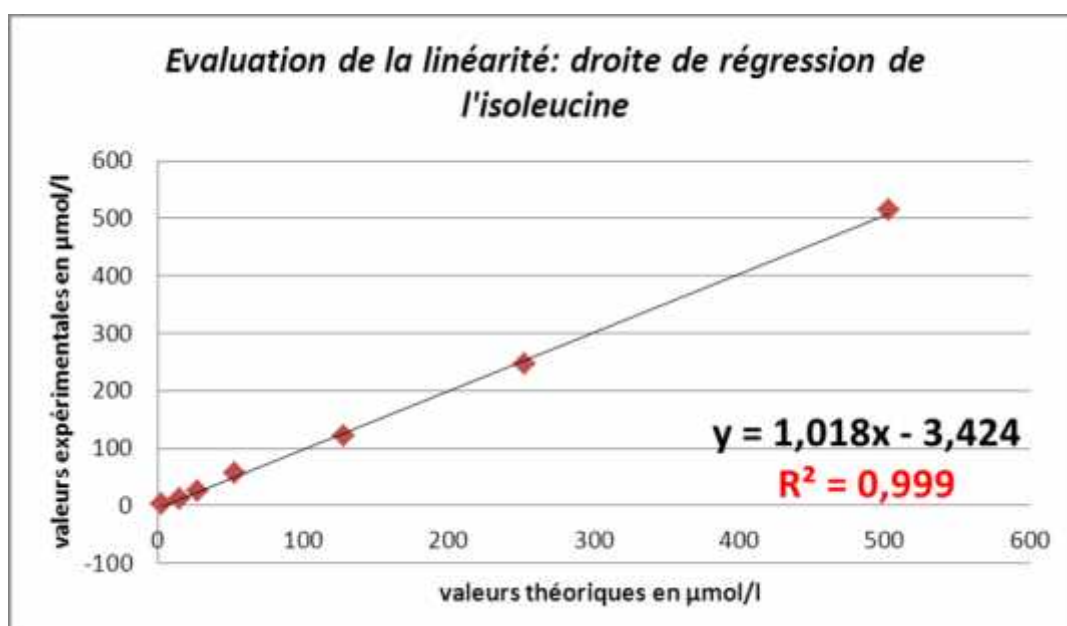


FIGURE 33 LINEARITE DU DOSAGE DE L'ISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS

Compound name: Lév
Correlation coefficient: $r = 0.998728$, $r^2 = 0.997457$

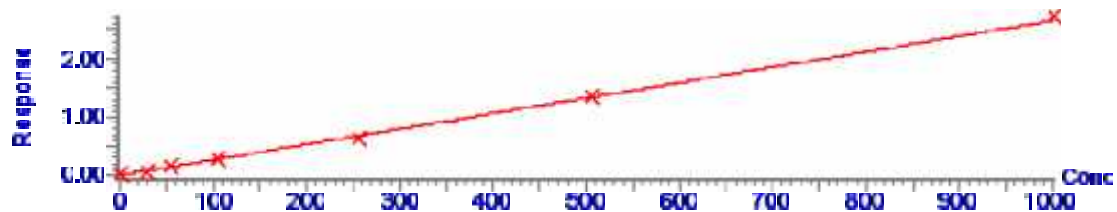


FIGURE 34 DROITE DE CALIBRATION : LEUCINE

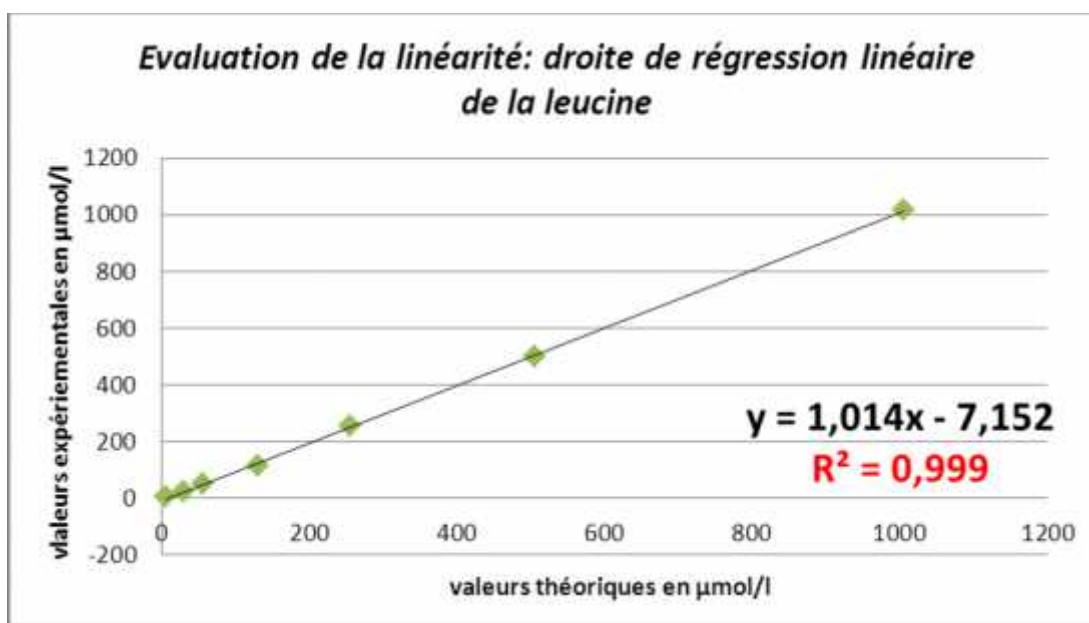


FIGURE 35 LINEARITE DU DOSAGE DE LA LEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS). REGRESSION LINEAIRE ENTRE LES VALEURS THEORIQUES ET LES VALEURS MESUREES DES ETALONS.

3.2.2 Conservation des échantillons

Les étalons sont préparés par surcharge d'une purée globulaire à partir d'une solution stock composée d'un mélange des 4 acides aminés. Le sang surchargé est déposé sur un papier buvard. De nombreuses études ont démontré l'importance du contrôle de l'humidité et de la température lors du stockage des taches de sang sur papier buvard. En effet, une dégradation plus ou moins importante des acides aminés sur tache de sang est observée lors du stockage en atmosphère humide ou à forte température [58,59]. Oglesbee D. *et al* [60]) ont montré une stabilité des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang à température ambiante, à +4°C, à -20°C et à 37°C. L'étude a porté sur une période de 7 jours. Il est donc indispensable de prévoir au laboratoire une étude de stabilité des acides aminés à chaîne ramifiée sur taches de sang aux différentes conditions de stockage mais sur une période plus longue.

3.2.3 Études de la répétabilité et de la reproductibilité

Les essais de répétabilité et de reproductibilité de la technique LC-MS/MS ont été réalisés sur 3 niveaux de concentration en acides aminés ramifiés (leucine, valine et isoleucine). Les CV% intra et inter-séries obtenus pour chaque CIQ et pour chaque acide aminé sont reportés respectivement dans les tableaux XI et XII. Les CV% de notre méthode sont comparés aux CV% répertoriés dans les tables RICOS [61]. Les coefficients de variation obtenus pour chacun des CIQ sont inférieurs à ceux recommandés par les tables RICOS. Il s'agit donc d'une méthode répétable. En effet, les CV% sont proches de ceux déterminés par Oglesbee D. *et al* [60].

Analyte		nombre de test	Moyenne	Ecart type	CV% calculé	CV% RICOS	Résultat
Valine	CIQ1	11	19.77	1,76	8.9	<10.6	Conforme
	CIQ2	11	73.64	5.80	7.9		
	CIQ3	11	364.16	35.08	9.6		
Leucine	CIQ1	11	35.74	3.26	9.1	<14.8	Conforme
	CIQ2	11	140.80	10.33	7.3		
	CIQ3	11	723.78	65.86	9.1		
Isoleucine	CIQ1	11	15.86	1.61	10.2	<15.5	Conforme
	CIQ2	11	67.81	7.11	7.5		
	CIQ3	11	356.06	32.56	9.1		

TABLEAU XI REPETABILITE DU DOSAGE DES ACIDES AMINES VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE PAR LC-MS/MS

Analyte		nombre de test	Moyenne	Ecart-type	CV% calculé	CV% RICOS	Résultat
Valine	CQ1	24	22.30	3.35	15.0	<40.1	Conforme
	CQ2	24	73.60	5.20	7.1		
	CQ3	24	355.13	23.20	6.5		
Leucine	CQ1	24	37.48	2.83	7.5	<44.0	Conforme
	CQ2	24	138.03	7.95	7.8		
	CQ3	24	697.94	39.37	5.6		
Isoleucine	CQ1	24	18.18	2.12	11.7	<45.5	Conforme
	CQ2	24	67.56	5.76	8.5		
	CQ3	24	352.44	29.96	8.2		

TABLEAU XII FIDELITE INTERMEDIAIRE DU DOSAGE DES ACIDES AMINES VALINE, LEUCINE ET ISOLEUCINE PAR LC-MS/MS

La maîtrise du processus analytique se fait à l'aide des CIQ. Les objectifs du contrôle de qualité sont de vérifier l'étalonnage, de valider les résultats des échantillons de patients et enfin de contrôler la reproductibilité dans le temps de la technique. Lors de cette première étape de validation, nous avons choisi l'utilisation de CIQ préparés à partir d'un «pool» d'échantillons sanguins. L'interprétation des CIQ « maison » se fera à l'aide du logiciel de gestion du CIQ (*MultiQC*). Il est important de définir la méthode de fabrication des pools et de s'assurer de leur stabilité dans le temps. Une deuxième possibilité est l'utilisation des CIQ [MassCheck® Aminoacids, Acylcarnitines Dried blood spot control] de la trousse de réactifs MassChrom® pour la détermination par LC/MS-MS des acides aminés et des acylacrnitines sur sang séché pour le dépistage des nouveau-nés sans dérivation (*Chromsystems instruments and Chemicals GmbH, Munich, Allemagne* [50]). L'inconvénient de l'utilisation des MassCheck® est l'absence de valeur cible pour l'isoleucine et l'alloisoleucine.

3.2.4 Contamination

Notre technique ne présente pas de contamination inter-échantillons. Les pourcentages de contamination sont négligeables pour la valine, leucine et isoleucine et sont respectivement de 0.07%, 0.06% et 0.06%.

3.2.5 Comparaison des méthodes

Une étude de corrélation par régression linéaire est réalisée entre la méthode LC-MS/MS, nouvelle méthode mise au point, et la méthode de chromatographie d'échange d'ions (CEI) utilisée en routine pour le dosage des acides aminés plasmatiques. 25 échantillons plasmatiques sont analysés pour les 4 acides aminés (valine, alloisoleucine, isoleucine et leucine) par CEI, parallèlement à l'analyse par LC-MS/MS du sang total correspondant déposé sur papier buvard (*Figures 36-39*). La corrélation entre les deux

méthodes est faible. Les coefficients de corrélation des droites de régression pour les acides aminés, valine, leucine, isoleucine et alloisoleucine sont inférieurs à 0.9592 (Figures 36-39). Les pentes des droites de régression pour les acides aminés, valine, leucine, isoleucine et alloisoleucine sont respectivement de 0.45, 0.63, 0.44 et 0.42. Les concentrations en acides aminés trouvés par LC-MS/MS sont systématiquement nettement plus faibles que celles obtenues par CEI. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux présentés par Sowell.J *et al* [32]. Ces auteurs ont comparé également les résultats des dosages d'acides aminés à chaînes ramifiées sur tache de sang par LC-MS/MS et par chromatographie d'échange d'ions (CEI) sur le plasma correspondant. Les valeurs trouvées par LC/MS-MS sont systématiquement plus élevées par rapport à celles obtenues par CEI [32]. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des méthodes d'étalonnage différentes. Nos étalons sont préparés par surcharge d'une purée globulaire à l'aide d'une solution stock composée d'un mélange des 4 acides aminés puis déposés sur un papier buvard. La matrice biologique de nos étalons est identique à celle des échantillons des patients (sang total déposé sur papier buvard). En revanche, Sowell .J *et al* [32] ont procédé à une calibration à l'aide d'étalons préparés par surcharge d'une solution à base de sérum albumine. En règle générale, la matrice des étalons doit être la plus proche possible de celle des échantillons biologiques analysés.

La méthode LC-MS/MS nouvellement mise au point et la méthode de chromatographie d'échange d'ions (CEI) utilisée en routine pour le dosage des acides aminés plasmatiques ne sont pas corrélées. Les deux techniques sont reconnues spécifiques. Concernant le suivi médical, cet écart est inacceptable. Prenons l'exemple de la leucine, acide aminé dont la concentration plasmatique est indispensable pour la prise de décisions thérapeutiques (régime diététique, dialyse etc...). Le pourcentage moyen des différences entre la LC-MS/MS et la CEI est de l'ordre de 50%. Un régime de semi-urgence est instauré si la concentration de leucine dépasse 380 $\mu\text{mol/L}$ (plasma, dosage par CEI) équivalent à une concentration de leucine de 190 $\mu\text{mol/L}$ (sang total correspondant, dosage par LC-MS/MS). Si l'on se réfère aux objectifs de concentration de leucine plasmatique précédemment cités, aucun changement thérapeutique n'est indiqué pour une valeur de leucine à 190 $\mu\text{mol/L}$. Il est clair que cet écart entre les deux techniques a

un impact sur le suivi médical. Il est donc important d'établir de nouvelles valeurs de référence spécifiques à la méthode de dosage des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang par LC-MS/MS.

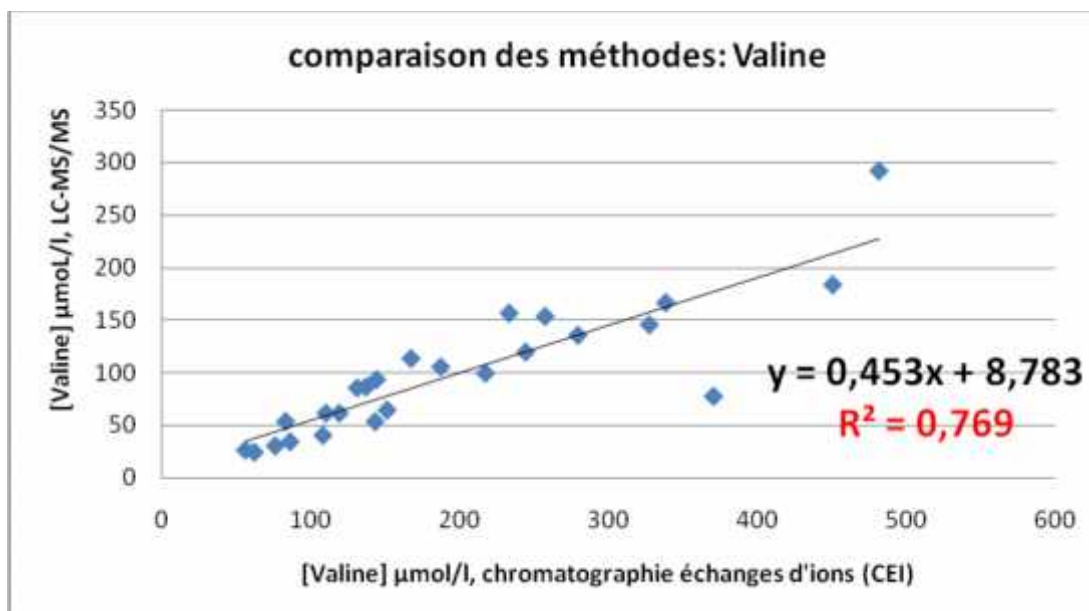


FIGURE 36 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE LA VALINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®).

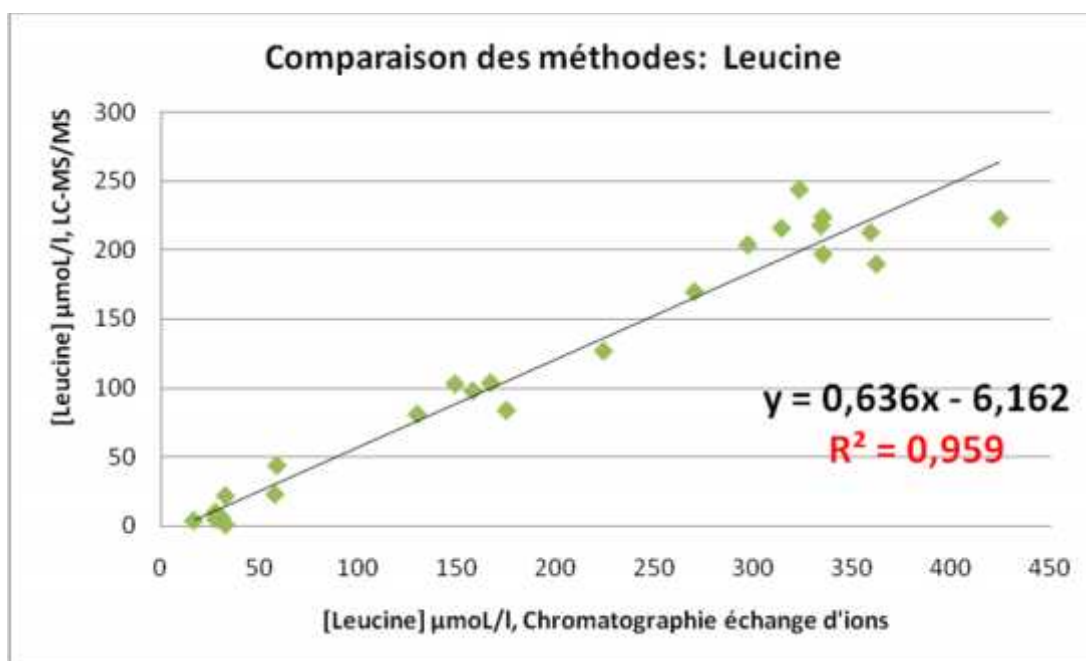


FIGURE 37 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE LA LEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®).

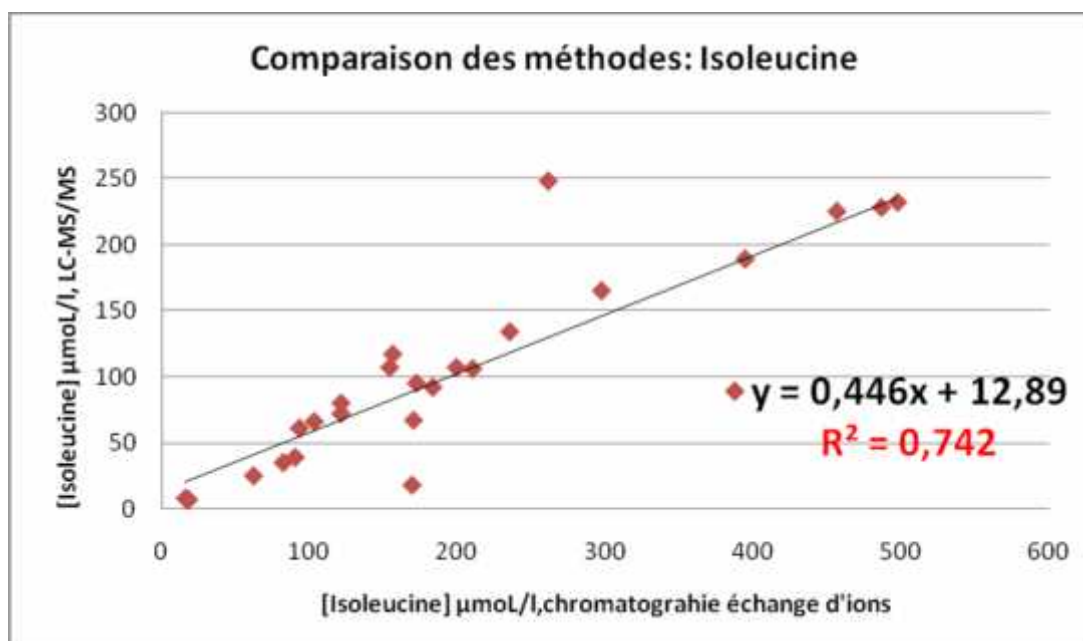


FIGURE 38 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE L'ISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®).

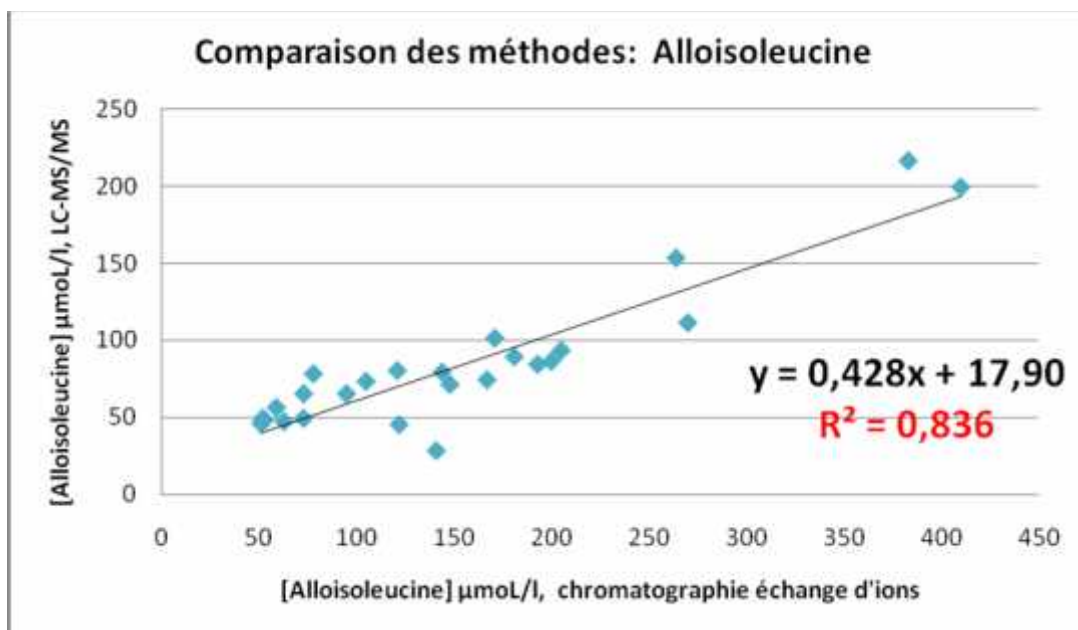


FIGURE 39 COMPARAISON PAR REGRESSION LINEAIRE DU DOSAGE DE L'ALLOISOLEUCINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) ET PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS AVEC UNE DETECTION A LA NINHYDRINE (CEI, JEOL-AMINOTAC®).

Conclusion

Nous avons développé et mis en place une méthode chromatographique en phase inverse couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour la quantification des acides aminés à chaîne ramifiée. Cette méthode sera dédiée au suivi des acides aminés à chaîne ramifiée sur sang séché déposé sur papier buvard pour le suivi des patients atteints de leucineose en dehors des phases de décompensation.

Actuellement, quel que soit l'état clinique du patient, le suivi biologique se fait par chromatographie d'échange d'ions. Une prise de sang au pli du coude est nécessaire ainsi que le déplacement de l'enfant au centre de prélèvement de l'hôpital.

Les critères de validation de la méthode ont permis de mettre en évidence la robustesse et la fiabilité de la technique. Notre méthode est répétable, spécifique et reproductible. La durée d'analyse est de 15 minutes, beaucoup plus rapide que la méthode de routine du laboratoire. En revanche, elle n'est pas comparable à celle-ci. Il est donc important de déterminer les intervalles des valeurs biologiques de référence spécifiques à cette méthode.

Le prélèvement sanguin fait partie du périmètre pré-analytique. L'obtention d'un prélèvement de bonne qualité nécessite une formation des parents ou des patients adultes à la réalisation du prélèvement qui doit être clairement identifié et sec avant l'envoi par voie postale.

La mise en place de l'analyse quantitative par LC-MS/MS des acides aminés ramifiés sur sang déposé sur papier buvard apporte plusieurs avantages :

- i) Un prélèvement capillaire moins invasif, moins traumatique et plus rapide à réaliser qu'une prise de sang conventionnelle.
- ii) Un prélèvement réalisé à domicile par les parents, expédié ensuite au laboratoire par courrier postal.
- iii) Un volume d'échantillons moins important (2 taches de sang)

iv) Une amélioration de la qualité de vie des patients.

En France, un programme national de dépistage néonatal systématique existe depuis 1978. Actuellement cinq maladies font l'objet d'un dépistage systématique à la naissance : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la drépanocytose (populations à risque) et la mucoviscidose. Le développement de la technique MS/MS et son application pour l'analyse des acides aminés (AA) et des acylcarnitines (AC) est en train de révolutionner le dépistage néonatal des MHM. En effet, la mise au point d'un protocole analytique permettant en deux minutes de quantifier à partir d'une tache de sang différents métabolites a rendu possible le diagnostic de plus d'une trentaine de MHM dont la leucinose. De nombreux pays ont intégré la MS/MS dans leur programme de dépistage néonatal. En France, à ce jour l'HAS recommande dans un premier temps un dépistage systématique par MS/MS d'un déficit de la bêta-oxydation des acides gras à chaînes moyennes (MCAD) et envisage dans un second temps une extension du dépistage néonatal aux autres maladies héréditaires du métabolisme dont la leucinose.

En attendant l'intégration de la MS/MS dans le programme de dépistage néonatal français, la mise en place dans notre laboratoire d'une technique de dosage des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang et particulièrement de l'alloisoleucine, marqueur spécifique de la leucinose serait un atout pour le laboratoire de Biochimie spécialisée du CHU de Bordeaux. En effet, la rapidité de confirmation de la pathologie directement à partir du Guthrie de naissance permettrait une prise en charge spécifique et rapide du nouveau-né.

Bibliographie

[1] Chuang D. Maple syrup disease : Its come a long way. *The Journal of Pediatrics*. Mars 1998, pp17-19

[2] Saudubray J.M. Leucinose. *Orphanet*. Aout 1998, mise à jour en mars 2002 et mars 2004, pp1-3

[3] Riquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. *Médecine et science*, vol 21, n°5. 2005, pp512-516. Disponible sur : <http://www.erudit.org/revue/ms/2005/v21/n5/010961ar.pdf>

[4] Guersen R, Heer P, Kirkeness B et al. Maladies héréditaires du métabolisme. *Des médicaments au service de l'humanité*. pp1-2. Disponible sur http://www.medicinesformankind.eu/upload/pdf/F_inhmeta.pdf

[5] Saudubray JM, Sedel F. les maladies héréditaires du métabolisme à l'âge adulte, Inborn errors of métabolism in adults. *Annales d'endocrinologie*. 2009, pp14-24. Disponible sur : <http://www.em-consulte.com/showarticlefile/203261/main.pdf>

[6] Saudubray JM. Maladies héréditaires du métabolisme. *Traité de médecine, 3^{ème} édition : médecine-sciences Flammarion*. 1996, pp1521-1560

[7] Saudubray JM, Nuoffer JM, De Lonlay P et al. Les maladies héréditaires du métabolisme à l'âge adulte. *Revu Med Int*. 1998, pp366-375

[8] Fernades J, Saudubra JM, Van Der Berghe J. Metabolic diseases : diagnosis and treatment. *Springer verlag*. 2006, pp2-48

- [9] Saudubray JM, Sedel F, Walter JH et al. clinical approach to treatable inborn metabolic disease: an introduction. *Journal Inherit Metabolism disease*. 2006; pp261-274
- [10] Sedel F, Saudubray JM. Therapy insight : inborn metabolism in adult neurology- A clinical approach focused on treatable diseases. *Nat Clinical Pract Neurol*. 2007, pp279-290
- [11] Sedel F, Barnerias C, Dubourg O et al. Peripheral neuropathy and inborn errors of metabolism in adults. *Journal Inherit Metabolism disease*. 2007, pp642-653
- [12] Sedel F, Baummann N, Turpin JC et al. Psychiatric manifestations revealing inborn errors of metabolism in adolescents and adults. *Journal Inherit Metabolic Disease*. 2007, pp631-641
- [13] Sedel F, Gournfinkel-an I, Baulac M et al. Epilepsy and inborn errors of metabolism: a diagnosis approach. *Journal Inherit Metabolic Disease*. 2007, pp846-854
- [14] Sedel F, Fontaine B, Saudubray JM, et al. hereditary spastic paraparesis in adults associated with inborn errors of metabolism: a diagnostic approach. *Journal Inherit Metabolic Disease*. 2007, pp854-855
- [15] Sedel F, Saudubray JM, Roze F, et al. Movement disorders and inborn errors of metabolism in adults: a diagnosis approach. *Journal Inherit Metabolic Disease*. 2008, pp308-318
- [16] Sedel F, Tourbah A, Fontaine B et al. Leukoencephalopathy associated with inborn errors metabolism in adults: a diagnosis approach. *Journal inherit metabolic disease* 2008, pp295-307
- [17] Milington DS, Kodo N, Norwood DL et al. Tandem mass spectrometry : A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Journal Inherit Metabolic Disease*. 1990, pp321-324

[18] Dimauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain disease. *New England Journal Med.* 2009, pp2656-2668

[19] Saudubray, Van Den Berghe, Walter. Inborn metabolic disease 5th edition. , 2011, pp278-289

[20] Wenger DA, Coppola S, Liu SI. Insights into diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch Neurologic.* 2003, pp322-328

[21] Jaeke J, Stibler H, Hagberg. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome : a new inherited multisystemic disease with severe nervous involvement. *Acta paediat Scand.* 1991, pp375-371

[22] Derache Philippe. Métabolisme des acides aminés. *Université Victor Segalen, cours 1^{ère} année.* 2007 pp1-10

[23] Borg Jacques, Reeber André. Biochimie métabolique. *Les cours du PCEM. Ellipses.* Décembre 2004, pp3-47

[24] Le Treut André. Métabolisme des acides aminés. *Faculté de médecine de Rennes, biochimie moléculaire et biochimie métabolique, PCEM1.* Année 2009-2010, pp1-22.

Disponible sur : https://facmed.univ-rennes1.fr/wkf//stock/RENNES20100210123029letreutPOLY_MEtabolisme_des_AA_-_2010.pdf

[25] Ricquier D. Métabolisme des acides aminés et cycle de l'urée. *Chimie biochimie et biochimie moléculaire, 1^{ère} année santé, 2^{ème} édition.* Omnisciences. 2010, pp 407-428

[26] Berg J, Tymoczko JL, Stryer L. Biochimie, 6^{ème} édition. *Medecine-sciences.* 2007 pp649-672

- [27] Saudubray J.M, Ogier De Baulny H. Branched-chain organics acidurias. *Semin Neonatol.* 2002, pp65-74. Disponible sur : <http://www.idealibrary.com>
- [28] Saudubray J.M. Leucinose. *EncyclopédieOrphanet.* Mars 2002 (*mise à jour Mars 2004*),p1-3
- [29] Chuang DT. Disorders of branched-chain amino acid and keto acid metabolism. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7ème edition, volume 1. 1995, pp1239-1277
- [30] Mitsubuchi H, Owada M, Eendo F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to Upper levels of intake in healthy. *American society for nutritional sciences.* 2005, pp1565-1569
- [31] Strauss K, Puffenberger E, Morton H et al. Maple syrup urine disease. *Genereview.* 2006 (*mise à jour mai 2009*). Disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1319/>
- [32] Sowell J, Pollard L, Wood T. Quantification of branched-chain amino-acids in blood spots and plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the diagnosis of maple urine disease. *Journal separation Science.* Mars 2011, pp631-639
- [33] De Lonlay P, Dubois S, Valayannopoulos V et al. *Prise en charge médicale et diététique des maladies héréditaires du métabolisme.* Springer-verlag, 2013, pp107-151
- [34] Acosta PB. *The ross metabolic formula system, nutrition support protocols.* 4th ed. Ross Products Division, Abbott laboratory, Columbus, OH
- [35] Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, et al. diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: a study of 36 patients. *Pediatrics.* 2002, pp999-1008

- [36] Jouvert P, Rabier D, et al. Combined nutritional support and continuous extracorporeal removal therapy in the severe acute of maple syrup urine disease. *Intensive care Med.* 2001, 27: pp806-1798
- [37] Ricquier Daniel. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. *Medecines sciences, vol 21, n°5.* 2005, pp512-516
- [38] Marchal R, Antonot E, Umber J. Chromatographie : théorie. *Université Nancy-Metz.* pp1-50
- [39] Lafont R. Méthodes physique de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. *Bmedia.* Disponible sur :
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A62.html>
- [40] Chromatographie liquide. Disponible sur :
<http://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre4.pdf> (consulté en mars 2014); pp1-79
- [41] Fafa. Les acides aminés. *Cours Medecine info.* Mise à jour avril 2010. Disponible sur :
<http://www.cours-medecine.info/biochimie/acides-amines.html>
- [42] Rabier D. La chromatographie des acides aminés. *Laboratoire de biochimie médicale, Hôpital Necker-Enfants malades, paris.* pp1-39
- [43] Cheillan D, Cognat S, Vianey Saban C et al. La spectrométrie de masse tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme : le point sur les utilisations actuelles. *Ann Biol Clin.* 2004, pp269-277.
- [44] Laprevotte O. spectrométrie de masse : intrdoduction à l'instrumentation utile en analyse protéomique. *Proteomics.Necker.* disponible sur :
<http://www.proteomics.necker.fr/pdfs/ModuleproteomiqueParisDescartesOLaprevotte.pdf>

- [45] School of chemistry. *Bristol University*. Disponible sur : <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esionisation.html> (consulté en mars 2014) p19
- [46] Adonnata, Se Abbatiello, et al. Evaluation multi-sites de la précision et la reproductibilité des mesures multiples sur la base de surveillance de réaction de protéines dans le plasma. *Nat Biotechnol*. 2009, pp633-641
- [47] La spectométrie de masse tandem. ChapitreIV icsn, cnrs. pp24-31 Disponible sur : <http://www.icsn.cnrs-gif.fr/IMG/pdf/chapitre4.pdf>
- [48] La protéomique. *Université d'Angers*. Disponible sur : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/6Proteomique/1Proteomiq.htm> (consulté en mars 2014)
- [49] Chromatographie liquide haute performance. *Ac Nancy-Metz*. Disponible sur : http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/jumber/hplc/chromatographie_en_phase_liquide_fichiers/hplc.html(consulté en février 2014)
- [50] Chromsystems instruments and Chemicals GmbH. Newborn screening, Acides amines et acylcarnitines Masschrom® sur sang séché sans dérivation. *Chromsystems Diagnostics by HPLC and LC/MS-MS*. Novembre 2008, pp1-34.
- [51] COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (Portée B) des méthodes en biologie médicale SH GTA 04. *COFRAC*. Révision avril 2011, p1-46
- [52] Zoppa M, Gallo L, Zacchello F et al. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of chromatography*. Février 2006, pp267-273

[53] Piraud M, Vianey-saban C, Bourdin C et al. A new reversed-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for analysis of underivatized amino acids: evaluation for the diagnosis and the management of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid communication mass spectrometry*. 2005, pp3287-3297

[54] Petris K, Dreux M, Elfakir C. et al. ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides. *Journal of chromatography*. Mai 2002, pp173-185

[55] Petris K Dreux M, Elfakir C. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *Journal of chromatography*. Juin 2002 pp9-21

[56] Apffel A, Fischer S, Goldberg G et al. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *Journal of chromatography*. Septembre 1995, pp177.190

[57] HAS. Accreditation en biologie médicale. *Evaluation et amélioration des pratiques*. Janvier 2013, p1-3. Disponible sur : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/accreditation_en_biologie_medicale_lbm_fiche_technique_2013_01_31.pdf

[58] Chace DH, Adam BW, Smith SJ et al. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. *Clinical chemistry*. Août 1999, pp1269-1277

[59] Adam Bw, Hall EM, Sternberg M et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clinical biochemistry*. Décembre 2011, pp1445-1450

[60] Oglesbee D, Sanders KA, Lacey JM et al. Second-tier test for quantification of alloisoleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD). *Clinical chemistry*. Mars 2008, pp542-549

[61] Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. desirable specification for total error, imprecision and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. *Westgard QC*. 1999;59, p491-500. Disponible sur: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

Serment 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.