



HAL
open science

Mise en place du dépistage néonatal du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) par spectrométrie de masse en tandem

Fanny Zhao

► **To cite this version:**

Fanny Zhao. Mise en place du dépistage néonatal du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) par spectrométrie de masse en tandem. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-02942350

HAL Id: dumas-02942350

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02942350v1>

Submitted on 28 Sep 2020

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2020

**MISE EN PLACE DU DEPISTAGE NEONATAL DU DEFICIT EN ACYL-COA
DESHYDROGENASE DES ACIDES GRAS A CHAINE MOYENNE (MCAD) PAR
SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

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

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

Fanny ZHAO

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 11/09/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur le Professeur Patrice FAURE

Membres :

Madame le Docteur Christelle CORNE, directrice de thèse

Monsieur le Professeur Thierry DEBILLON

Monsieur le Docteur Benoit CHOVELON

Monsieur le Docteur David CHEILLAN

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

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

Vice-doyen et Directrice des Etudes :

Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2019 - 2020

ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WIM	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU -PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	WOUESSIDJEWE	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

Remerciements

À **Monsieur le Professeur Patrice FAURE**, merci de me faire l'honneur de présider ce jury ainsi que pour tout ce que vous m'avez apporté en connaissances le long de mes études de pharmacie et en accompagnement lors de mon internat.

À **Madame le Docteur Christelle CORNE**, je n'aurais vraiment pas pu demander mieux pour l'encadrement de cette thèse. La réactivité, la disponibilité, les bons conseils ont toujours été au rendez-vous. Malgré tous les aléas, qui ne dépendaient pas de nous, mais qui ont fait retarder cette thèse, nous nous en sommes sorties et j'ai énormément apprécié avoir travaillé ensemble. Donc merci, merci, merci. Et bien sûr, merci de m'avoir fait découvrir le merveilleux monde des maladies métaboliques.

À **Monsieur le Professeur Thierry DEBILLON**, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, en espérant qu'il vous apportera également quelque chose pour mieux comprendre le mécanisme interne du laboratoire.

À **Monsieur le Docteur Benoit CHOVELON**, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et merci pour tous les conseils que tu m'as prodigués depuis mes tous premiers petits pas dans la biologie médicale en tant qu'externe jusqu'à l'aboutissement de mon internat avec cette thèse.

À **Monsieur le Docteur David CHEILLAN**, merci d'avoir pris le temps de juger ce travail et de m'avoir laissé participer au versant Lyonnais de cette mise en place. Je suis ravie de pouvoir continuer à travailler ensemble dans la suite de mes aventures.

Je tiens à remercier **l'équipe des MHM**, Valérie, Hélène, Delphine, Mylène, Ophélie, Amélie, Saloua, Michael, Loïc, Filiz, Catherine, Stéphanie, Laurent, Lysiane, Laetitia, pour avoir travaillé sur ce projet mais également pour avoir fait de mes 2 stages avec vous un réel plaisir. Merci notamment à toi Julien pour tout le travail que tu as fourni et pour avoir répondu à mes questions incessantes. Je te dois des pancakes aux bananes !

Merci également à toutes les personnes du laboratoire que j'ai rencontré le long de mon externat et de mon internat, qui m'ont formé, chapeauté et qui ont rendu mon expérience à l'IBP non seulement enrichissante mais réellement agréable.

À mes parents, à Yves, merci de m'avoir soutenu mais surtout supporté toutes ces années. Je ne montre pas assez ma reconnaissance, merci, merci pour tout.

À Léa, tu seras toujours ma grande sœur, même quand on sera vieilles et fripées, j'aurais toujours besoin de toi pour me rappeler qu'il était une fois je m'appelais Manny et je ressemblais à un garçon.

À mes co-internes de cœur : Caro, comment aurais-je pu survivre sans nos pauses cafés/potins et nos excursions bubble tea ; Rezadoudou, on se voit à Amsterdam ; VTH, ton humeur et ton optimisme m'ont gardé à flot ; Claire, quand est-ce qu'on fait de la couture ? Mais bien sûr aussi Simon, Léa, Julliane, VJP (vive les ATI !!), Quentin, Axelle, Charlotte, Tristan, Anaëlle, Benjamin, Capucine, les pioupiou... Que des beaux souvenirs ces années d'internat !

À Dalila, Anne-Flore, Assia, on en aura vécu tellement ensemble toutes ces années de pharmacie. On a traversé des périodes difficiles ensemble, mais finalement on en retient les moments géniaux : les galas, les découvertes végétariennes, les vacances, les Noëls... À une amitié qui continuera encore longtemps !

À Chloé, à nos séances papotage jusqu'à 2h du matin, à nos maisons en pains d'épices, à nos créneaux de 1 heure top chrono entre 2 rdv avec ton emploi du temps de ministre, à nos espoirs d'un jour réussir à prendre une photo avec Giroud...

À Bandit, tu ne m'as pas aidé dans la rédaction de ce manuscrit en traversant constamment le clavier de l'ordinateur... mais toute la ronronthérapie que tu m'as accordé m'a poussé à toujours continuer.

À 常永亮, merci simplement d'être restés à mes côtés. Malgré toutes mes crises de stress, toute mon anxiété, tu as été mon ancre. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	6
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Introduction	13
Partie 1 : Synthèse bibliographique.....	15
Chapitre 1 : Le catabolisme des acides gras	15
1.1. La lipolyse.....	15
1.2. Le système de transport par la carnitine.....	16
1.3. La β -oxydation mitochondriale des acides gras	17
1.4. Les voies alternatives	19
1.5. Les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras	20
Chapitre 2 : Le déficit en MCAD	21
2.1. Historique.....	21
2.2. Epidémiologie	22
2.3. L'acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD)	23
2.4. Physiopathologie.....	25
2.5. Clinique.....	27
2.6. Biologie.....	28
2.7. Biologie moléculaire	34
2.8. Prise en charge	36
2.9. Pronostic.....	40
Chapitre 3 : Le dépistage néonatal.....	41
3.1. Historique.....	41
3.2. L'organisation du dépistage néonatal en France.....	44
3.3. Détermination des pathologies à dépister	48
Chapitre 4 : Le dépistage néonatal du déficit en MCAD.....	50
4.1. La technique	50
4.2. Les marqueurs et détermination du seuil	52
4.3. Dépistage néonatal du déficit en MCAD dans d'autres pays.....	53
4.4. La mise en place en France	56

4.5. Perspectives.....	58
Partie 2 : Données expérimentales	61
Chapitre 1 : Matériels et méthodes	61
1.1. Matériels	61
1.2. Méthode	65
Chapitre 2 : Résultats de la vérification de méthode	75
2.1. SH FORM 43 pour le dépistage néonatal du déficit en MCAD	75
2.2. SH FORM 43 pour le dépistage néonatal de la phénylcétonurie	90
Chapitre 3 : Discussion	103
3.1. Résultats de la vérification de méthode	103
3.2. Gestion post-analytique	105
3.3. Mise en place du dépistage néonatal du déficit en MCAD et de la phénylcétonurie en MS/MS	106
3.4. Amélioration continue	107
Conclusion.....	109
Annexe 1. Dépliant J3 l'âge du dépistage	111
Annexe 2. Critères ANAES d'évaluation <i>a priori</i> d'un programme de dépistage (2004).....	113
Annexe 3. Arrêté du 22 février 2018.....	115
Annexe 4. Extrait de la notice technique Chromsystems	117
Annexe 5. Arbre décisionnel pour la démarche de dépistage néonatal du déficit en MCAD	119
Annexe 6. Arbre décisionnel pour la démarche de dépistage néonatal de la phénylcétonurie	120
Bibliographie.....	121

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un acide gras saturé à n carbonnes

Figure 2 : La voie métabolique de l'acide gras

Figure 3 : Rôle de la carnitine dans le transport des acides gras à chaîne longue

Figure 4 : β -oxydation des acides gras

Figure 5 : Le rôle de la MCAD dans la bêta-oxydation

Figure 6 : Structure de la MCAD

Figure 7 : Pathogénèse d'un patient atteint du déficit en MCAD en crise

Figure 8 : Profil des acylcarnitines plasmatique d'un patient atteint du déficit en MCAD

Figure 9 : Chromatographie des acides organiques urinaires d'un patient atteint du déficit en MCAD

Figure 10 : Variations génétiques du gène ACADM

Figure 11 : Épidémiologie de la mutation fréquente c.985A>G

Figure 12 : Exemples de délais de jeûne maximum acceptable

Figure 13 : Consensus français sur le temps de jeûne autorisé dans le déficit en MCAD en fonction de l'âge

Figure 14 : Nouvelle organisation du dépistage néonatal en France depuis 2018

Figure 15 : Carte des centres de dépistage néonatal en France

Figure 16 : Buvard recto-verso, version 2020

Figure 17 : Images de prélèvements conformes et non conformes

Figure 18 : Principe de dosage de la 17OHP (PerkinElmer)

Figure 19 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem

Figure 20 : Carte des pays d'Europe réalisant le dépistage néonatal du déficit en MCAD (2020)

Figure 21 : Incidence du dépistage sur l'apparition de crises métaboliques

Figure 22 : Algorithme du diagnostic du déficit en MCAD en France proposé en 2012, avant l'introduction du dépistage systématique

Figure 23 : Nombre de pathologies dépistées dans les pays européens en 2020

Figure 24 : Résultat de l'évaluation des maladies métaboliques : maladies proposées pour être intégrées au programme national de DNN

Figure 25 : Xevo® TDQ de Waters

Figure 26. Déroulement de la méthode

Figure 27 : Spectre et « flow profile » d'un CIQ

Figure 28 : Exemple d'un « flow profile » d'un prélèvement qui n'a pas été injecté

Figure 29 : « Flow profile » lorsque le flux est non optimisé

Figure 30 : Chronologie de la mise en place du dépistage néonatal du déficit en MCAD

Figure 31 : Exemple d'un plan de plaques

Figure 32 : Exemple de graphe de Levey-Jennings sur URT

Liste des tableaux

Tableau 1. Les avantages du papier buvard

Tableau 2 : Résultat du dépistage néonatal du déficit en MCAD

Tableau 3 : Chronologie de l'acquisition de la MS/MS pour le CHUGA

Tableau 4 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative

Tableau 5 : Seuils d'action dans d'autres pays

Liste des abréviations

AA : Acides aminés

AFDPHE : Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant

ARDPHE : Association Régionale de Dépistage et de Prévention des Handicaps de l'Enfant

AG : Acides gras

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANAES : Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé

ANSP : Agence nationale de santé publique

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARS : Agence régionale de santé

ATP : Adénosine triphosphate

BP : Paire de base

CACT : Carnitine acylcarnitine translocase

CAO : Chromatographie des acides organiques

CE : conformité européenne

CHU : Centre hospitalier universitaire

CHUGA : CHU Grenoble Alpes

CIQ : Contrôle interne de qualité

CNAMTS : Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés

CNCDN : Centre national de coordination du dépistage néonatal

CoA : Coenzyme A

CPK : Créatine phosphokinase

CPT : Carnitine palmitoyl transférase

CRDN : Centre régional de dépistage néonatal

CV : Coefficient de variation

DGOS : Direction générale de l'offre de soin

DGS : Direction générale de la santé

DM-DIV : Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

DNN : Dépistage néonatal

EEQ : Evaluation externe de la Qualité

ETF : Electron-transferring flavoprotein

FAD : Flavine-adénine-dinucleotide

FATP : Fatty acid transport protein
GC-MS : Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse
HAS : Haute Autorité de Santé
HCL : Hospices Civils de Lyon
HPLC : High performance liquid chromatography
IRT : Trypsine immuno-réactive
ISNS : International Society for Neonatal Screening
LBM : Laboratoire de biologie médicale
LCHAD : Long chain 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase
LC-MS : Chromatographie liquide – spectrométrie de masse
LIMS : Laboratory information management system
LOD : Limite de détection
LOQ : Limite de quantification
MCAD : Medium chain acyl-CoA déshydrogénase
M/SCHAD : Medium/short chain 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
m/z : Masse / charge
PCU : Phénylcétonurie
QALY : Quality-adjusted life year
RESAH : Réseau des Acheteurs Hospitaliers
SFEIM : Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme
TFP : Tri-functional protein
TSH : Thyroid-stimulation hormone
URPHE : Union régionale pour la prévention des handicaps de l'enfant
17OHP : 17-hydroxy-progestérone

Introduction

Le dépistage néonatal est un programme national de santé publique permettant de détecter et prendre en charge précocement les enfants atteints de maladies rares mais graves. Ces malades sont asymptomatiques à la naissance, puis une fois symptomatiques, les conséquences peuvent être irréversibles, allant du handicap au décès. Par conséquent, le dépistage doit être systématiquement proposé à chaque naissance en France. Cette entreprise à grande échelle est possible grâce à une technique particulière : le prélèvement sur papier buvard. Il s'agit du dépôt de gouttes de sang sur un papier buvard au 3^e jour de vie. Ce prélèvement permet ensuite la réalisation de multiples dosages sur ces taches de sang séché. En France, les premiers dépistages de phénylcétonurie ont été réalisés en 1972 puis ont été rapidement généralisés sur tout le pays. Au fur et à mesure des années, d'autres maladies ont été ajoutées au panel : l'hypothyroïdie congénitale en 1978, la drépanocytose en 1989 d'abord dans les départements d'Outre-mer puis en métropole en 1995, l'hyperplasie congénitale des surrénales en 1995 et enfin la mucoviscidose en 2002 (1).

L'évolution technologique, avec l'utilisation croissante de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) depuis les années 90, a permis à de nombreux pays d'augmenter leurs capacités de dépistage de quelques pathologies à une trentaine de maladies métaboliques héréditaires (1,2). En effet, cette technologie permet de doser de manière fiable, rapide et automatisée sur un même prélèvement un spectre large d'analytes. Elle peut doser avec une grande sensibilité et spécificité les acylcarnitines qui sont des marqueurs de déficit de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (AG) et de certaines aciduries organiques et permet également de doser les acides aminés anormalement accumulés en cas d'acidoaminopathie (3).

En France, les contraintes organisationnelles, économiques et législatives ont retardé le développement de cette technologie. Ce ne sera qu'en 2011 que la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande l'adoption de la spectrométrie de masse en tandem pour le dépistage néonatal du déficit en acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD).

Le déficit en MCAD est un déficit enzymatique empêchant le catabolisme des acides gras à chaîne moyenne. Il s'agit de l'anomalie de la β -oxydation des AG la plus fréquente avec une prévalence dans la population européenne entre 1/10 000 et 1/27 000. Les patients atteints de cette maladie peuvent présenter des vomissements, une léthargie, voire un coma hypoglycémique qui peut aller jusqu'au décès. La prise en charge, relativement simple, consiste en une prévention des crises métaboliques par éviction du jeûne et une vigilance accrue lors de l'augmentation des demandes énergétiques comme lors d'une activité sportive ou d'un épisode

infectieux. La fréquence, la gravité et l'existence d'un traitement font de cette maladie un excellent candidat au dépistage néonatal (4).

La réorganisation complète du dépistage néonatal en France en 2018, avec la mise en place des Centres régionaux de dépistage néonatal (CRDN) en coordination avec le Centre national de coordination de dépistage néonatal (CNCDN), la réduction du nombre de laboratoires de dépistage et la volonté de la Direction générale de l'offre de soin (DGOS) ont permis l'acquisition de spectromètres de masse pour tous les CRDN. Ainsi, le démarrage du dépistage systématique du déficit en MCAD pour les nouveau-nés a été programmé pour le 1^{er} trimestre 2020 (3).

L'objectif de ce travail était de mettre en place le dépistage néonatal du déficit en MCAD par dosage d'octanoylcarnitine (C₈) et décanoylcarnitine (C₁₀) par spectrométrie de masse en tandem au Laboratoire de Dépistage Néonatal du Centre Hospitalier Universitaire Grenoble-Alpes (CHUGA). Il s'agit d'une méthode multiplex permettant de doser simultanément les acylcarnitines et les acides aminés, comme la phénylalanine et la tyrosine qui permettent le dépistage de la phénylcétonurie. Le laboratoire a donc également réalisé la vérification de méthode du dosage de ces acides aminés par MS/MS. Nous présenterons l'ensemble de ces résultats dans ce manuscrit.

Un point historique et bibliographique sur le déficit en MCAD et le dépistage néonatal seront d'abord exposés. Par la suite seront présentés le choix du spectromètre, la mise en place de l'analyse et sa vérification de méthode. Après ce travail, le laboratoire est désormais prêt pour le dépistage néonatal systématique du déficit en MCAD, qui sera effectif après décision ministérielle.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Le catabolisme des acides gras

Il existe 3 substrats clés pour le maintien de l'homéostasie métabolique dans le corps humain : le glucose, les acides gras (AG) et les acides aminés. Le glucose, substrat énergétique majeur, est peu stocké dans le corps à l'inverse des AG qui sont conservés dans les tissus adipeux. Ainsi lors du jeûne prolongé et/ou en période de demande énergétique élevée, le glucose n'est plus suffisant pour alimenter tous les organes. La lipolyse est alors activée pour libérer des AG des tissus adipeux dans la circulation sanguine, leur permettant d'approvisionner les organes, notamment le foie, le cœur et les muscles squelettiques.

Afin de pouvoir les utiliser, les cellules doivent métaboliser les AG en substrats énergétiques. La voie principale de ce métabolisme est la β -oxydation. Elle a lieu majoritairement dans les mitochondries et plus accessoirement dans les peroxysomes et les microsomes. Il s'agit d'une cascade enzymatique oxydative qui écourte l'AG de 2 carbones du côté carboxy-terminal sous forme d'acétyl-CoA en position β (voir **Figure 1**). Ce processus est réalisé plusieurs fois jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un acétyl-CoA (deux carbones) ou un propionyl-CoA (trois carbones) selon la parité de la chaîne initiale. Cet enchaînement de réactions porte le nom d'hélice de Lynen.

Figure 1 : Structure d'un acide gras saturé à n carbones



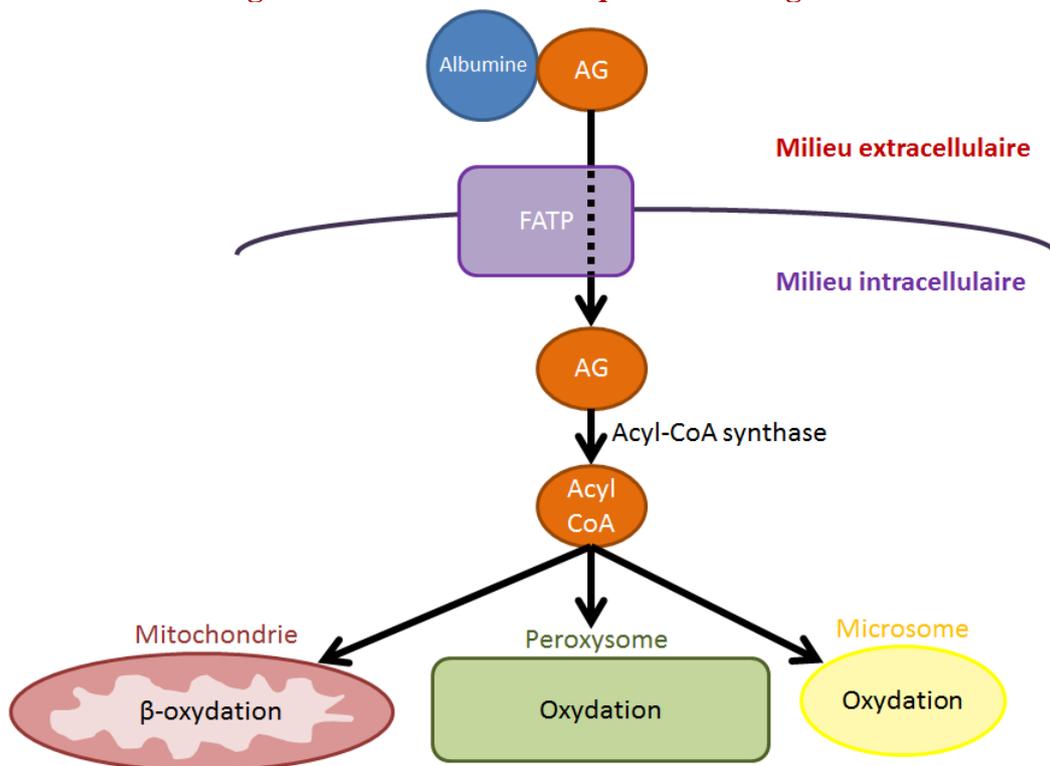
L'acétyl-CoA produit peut être utilisé à divers usages. Il peut entrer dans le cycle de Krebs pour générer de l'ATP (adénosine triphosphate) ou être un point de départ pour la cétogenèse (formation du 3-hydroxy-butyrates et de l'acétoacétate) et la néoglucogenèse. Le cerveau, organe vital incapable d'utiliser directement les acides gras, pourra utiliser ces corps cétoniques à des fins énergétiques (5–8).

1.1. La lipolyse

La majorité des AG sont stockés dans les tissus adipeux sous forme de triglycérides à chaîne longue. Une baisse de la glycémie déclenche l'hydrolyse de ces triglycérides (la lipolyse) qui libère du glycérol et des AG. Ces AG sont ensuite transportés par la circulation sanguine vers les différents organes via une fixation à l'albumine.

Comme le montre la **Figure 2**, les AG passent du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire grâce à des systèmes de transports comme les Fatty Acid Transport Proteins (FATPs) avant de s'introduire dans les différentes organelles intracellulaires qui vont les utiliser. Ils sont ensuite activés par une thio-estérification à un coenzyme A (CoA) pour devenir un acyl-CoA. Cet acyl-CoA doit par la suite traverser la membrane de la mitochondrie afin d'être oxydé. Les AG à courte et moyenne chaîne (≤ 10 carbones) diffusent passivement dans la mitochondrie, mais la membrane mitochondriale est imperméable aux acyl-CoA à chaîne longue (12-20 carbones), leur transport se fait donc via le système de carnitine (5,8).

Figure 2 : La voie métabolique de l'acide gras



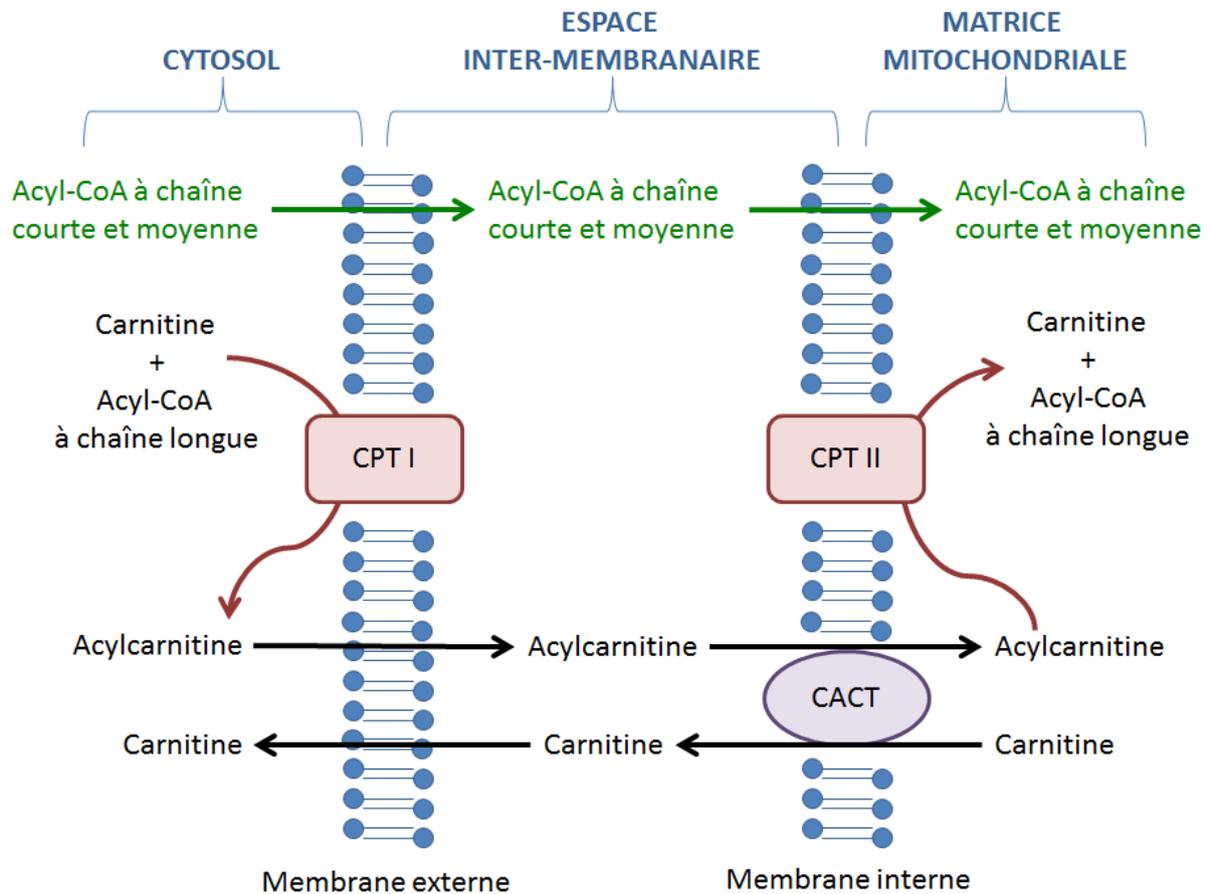
1.2. Le système de transport par la carnitine

La L-carnitine est un métabolite naturel qui possède 2 rôles majeurs. Le premier est de permettre le transport des AG à chaîne longue dans les mitochondries pour qu'ils puissent être β -oxydés. Son deuxième rôle est l'élimination des AG à chaîne courte et moyenne qui s'accumulent dans la mitochondrie que ce soit physiologique ou pathologique. Ceux-ci sont estérifiés à la carnitine par une carnitine acétyltransférase en acylcarnitine qui pourra être transportée hors de la mitochondrie (9).

Le transport par le système de carnitine commence par l'estérification de l'acyl-CoA à la carnitine grâce à la Carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT 1), localisée sur la membrane externe de la mitochondrie, formant ainsi une acylcarnitine. La Carnitine acylcarnitine

translocase (CACT) permet le transfert de cette acylcarnitine dans la mitochondrie en échangeant une carnitine libre mitochondriale. Une fois dans la mitochondrie, la Carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT 2), localisée sur la membrane interne de la mitochondrie, la dissocie en acyl-CoA et en carnitine libre. La carnitine libérée peut retourner dans le cytoplasme grâce à la CACT (voir **Figure 3**).

Figure 3 : Rôle de la carnitine dans le transport des acides gras à chaîne longue



CPT : Carnitine palmitoyl transférase ; CACT : carnitine acylcarnitine translocase

Les acylcarnitines peuvent faire le chemin inverse : elles peuvent revenir dans le cytosol en passant par la CACT, traverser la membrane cellulaire puis rejoindre la circulation sanguine pour finalement être excrétées dans les urines ou dans la bile selon la longueur de chaîne de l'acylcarnitine. Il s'agit d'un moyen de détoxification en cas d'accumulation importante d'acyl-CoA, par exemple en cas d'anomalie de la β -oxydation mitochondriale des AG (5,10).

1.3. La β -oxydation mitochondriale des acides gras

Dans la mitochondrie, l'acyl-CoA va subir plusieurs cycles comprenant 4 réactions enzymatiques afin de libérer un acétyl-CoA par cycle. La première étape est une

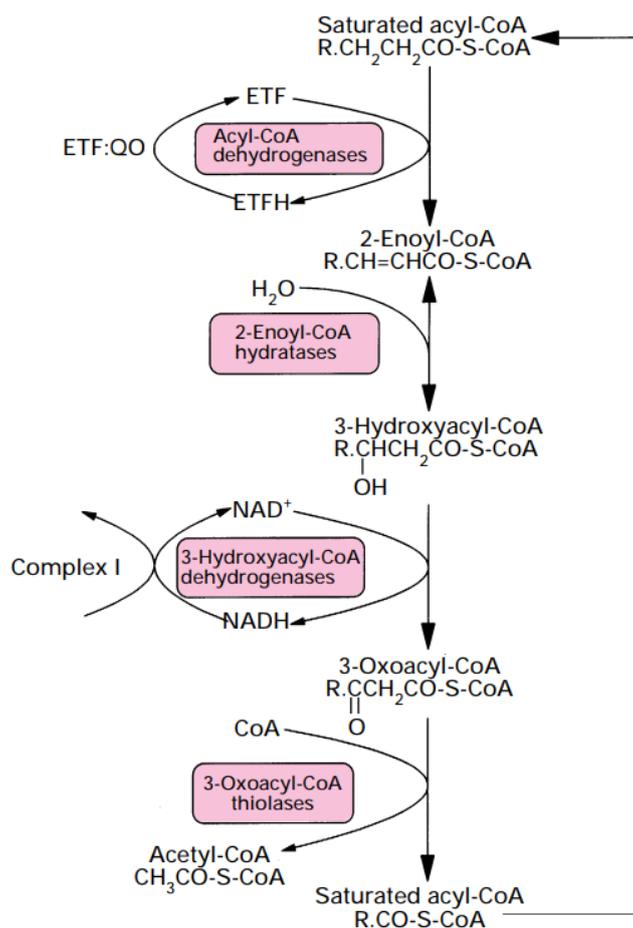
déshydrogénation de l'AG en trans-enoyl-CoA qui peut être catalysée par 4 enzymes différentes en fonction de la longueur de la chaîne de l'AG :

- SCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte (C₄ à C₆)
- MCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (C₆ à C₁₂)
- LCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (C₈ à C₂₀)
- VLCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (C₁₂ à C₂₄)

Cette étape nécessite un cofacteur, le Flavine-adénine-dinucléotide (FAD), pour permettre l'échange d'électron et un système de transport d'électrons, l'ETF (Electron-transferring flavoprotein).

Les 3 étapes suivantes sont catalysées par une protéine mitochondriale trifonctionnelle (TFP) ayant une activité d'hydratase, d'hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase et de thiolase (voir **Figure 4**). Tout d'abord, le trans-enoyl-CoA issu de la première réaction va subir une hydratation par l'acyl-CoA hydratase sur sa double liaison et devenir le L-3-hydroxy-acyl-CoA. En fonction de la longueur de la chaîne, la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (LCHAD) ou moyenne et courte (M/SCHAD) vont le déshydrogéner en 3-céto-acyl-CoA. La dernière étape est un clivage par une thiolase en un acyl-CoA écourté de 2 carbones et un acétyl-CoA. Cet acyl-CoA va pouvoir recommencer un cycle de β -oxydation (5,8).

Figure 4 : β -oxydation des acides gras



D'après Eaton et al., 1996 (11)

1.4. Les voies alternatives

Dans des conditions physiologiques, l'oxydation des AG à moyenne et longue chaîne a lieu majoritairement au niveau mitochondrial. Il existe des voies alternatives comme l'oxydation microsomale et peroxysomale. L' ω -oxydation microsomale des AG produit des acides dicarboxyliques qui pourront être dégradés par la β -oxydation peroxysomale. L'oxydation peroxysomale concerne préférentiellement les AG à chaîne très longue (l'acide pristanique, l'acide di- et trihydroxycholestanoïques, l'acide tétracosanoïque et les acides dicarboxyliques à très longue chaîne). Elle rend ces longues chaînes aliphatiques plus polaires, permettant une élimination plus aisée. Lors d'un déficit de la β -oxydation, ces 2 voies oxydatives deviennent plus importantes afin d'éliminer les acyl-CoA accumulés. Les métabolites issus de ces processus sont donc excrétés en plus grande quantité et leur mise en évidence peut être une aide au diagnostic (5,10,12).

1.5. Les anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras

Du système de transport de la carnitine jusqu'à l'hélice de Lynen, chaque étape enzymatique de la β -oxydation peut être le siège d'un déficit. A ce jour, une vingtaine de déficits sont connus. La mise en place du dépistage néonatal systématique de ces pathologies dans d'autres pays a permis d'estimer leur incidence globale à 1/5 000 – 1/10 000. Il s'agit d'un assortiment hétérogène de maladies que ce soit au niveau de l'âge de déclaration de la maladie, de la gravité ou des manifestations cliniques. La forme la plus sévère est la présentation néonatale avec une cardiomyopathie grave, une hypoglycémie hypocétosique et une insuffisance hépatique ayant une évolution souvent fatale. L'expression infantile se caractérise par des épisodes de léthargie et vomissements pouvant mener à une atteinte hépatique, une hypoglycémie hypocétosique, une encéphalopathie voire le décès. Les présentations tardives chez l'adolescent ou l'adulte sont marquées par une atteinte musculaire avec faiblesse musculaire, myalgie, rhabdomyolyse et atteinte rénale (6,8,13,14).

Lors d'une suspicion d'une anomalie de la β -oxydation, le bilan biologique d'exploration doit a minima rechercher une hypoglycémie hypocétosique avec un dosage du glucose plasmatique et de corps cétoniques sanguins, ainsi qu'un profil des acylcarnitines plasmatique afin de cibler le lieu du déficit. L'étude de l'oxydation des AG dans les lymphocytes, les dosages enzymatiques sur fibroblastes et la biologie moléculaire sont utiles pour confirmer le diagnostic.

La prise en charge de ces pathologies comporte 2 versants : le traitement de la phase aiguë et la prise en charge à long terme. En phase aiguë, lors d'une décompensation métabolique, il faut très rapidement traiter le patient par perfusion de glucose intraveineuse (12-15 mg/kg/min chez le nourrisson et l'enfant puis 8-10 mg/kg/min chez le grand enfant et l'adolescent). Une supplémentation en L-carnitine (50-100 mg/kg/jour) peut également être administrée en cas de carence. A long terme, le traitement est essentiellement préventif. Il convient d'éviter ou au moins d'anticiper les facteurs de risques de décompensation par l'éviction du jeûne notamment grâce à des repas fréquents, une surveillance accrue lors d'épisodes infectieux ou d'exercice physique intensif avec l'administration de solutions riches en glucides et éventuellement une supplémentation en L-carnitine. Selon l'atteinte enzymatique, certaines sources d'acides gras doivent être proscrites. Le pronostic est variable selon la pathologie mais certaines anomalies de la β -oxydation ont un excellent pronostic avec ces actions préventives (8,15).

Chapitre 2 : Le déficit en MCAD

Le déficit en MCAD est une maladie métabolique héréditaire dans laquelle la β -oxydation mitochondriale des AG est inhibée au niveau des AG à chaîne moyenne. Avec une prévalence dans les pays limitrophes de la France entre 1/10 000 à 1/27 000 (4), il s'agit de l'anomalie de la β -oxydation des acides gras la plus fréquente. Cette pathologie peut conduire à des épisodes d'hypoglycémie avec un défaut de cétogenèse potentiellement grave se traduisant par de la léthargie, le coma voire le décès. La plupart des cas se déclarent dans la petite enfance, cependant dans de rares cas les premières crises se manifestent dès la période néonatale ou n'apparaissent qu'à l'âge adulte. Ces épisodes de décompensation peuvent engager le pronostic vital mais peuvent être évités par de relativement simples mesures préventives (4,16).

2.1. Historique

Le premier cas de déficit en MCAD décrit dans la littérature date de 1976, lorsque Gregersen et al. décrivent un patient de 3 ans ayant présenté plusieurs épisodes de léthargie et de troubles de la conscience associés à des hypoglycémies (17). L'exploration biologique met en évidence une excrétion dans ses urines d'acides dicarboxyliques (l'acide adipique C₆, subérique C₈ et sébacique C₁₀) et de subérylglycine. Il décède suite à une épreuve de jeûne à visée diagnostique. En 1980, ils expliquent ce syndrome qu'ils retrouvent chez d'autres patients par le déficit d'une acyl-CoA déshydrogénase (18). Deux ans plus tard, Kølvråa et al. parviennent à localiser plus précisément le déficit en réalisant une étude enzymatique sur fibroblastes de patients présentant le même syndrome et mettent en évidence un déficit en MCAD (19). Par la suite, la gravité de cette maladie devient apparente lorsque Howat et al. attribuent le premier cas de mort subite du nourrisson à un déficit en MCAD en 1984 (20).

L'exploration biologique de cette pathologie est approfondie avec le travail de Roe et al. qui mettent en évidence l'intérêt du profil des acylcarnitines pour poser le diagnostic de déficit en MCAD (21). L'origine génétique de la maladie est élucidée au début des années 90s lorsque la mutation prépondérante c.985A>G sur le gène *ACADM* codant pour la MCAD est découverte quasi-simultanément par plusieurs laboratoires (22–26).

Un premier dépistage prénatal est réalisé en 1987 par détermination de l'activité enzymatique des cellules du liquide amniotique (27) puis par biologie moléculaire en 1995 (28). En 2000, un diagnostic préimplantatoire est réalisé avec succès chez un couple ayant précédemment perdu 2 enfants atteints d'un déficit en MCAD (29). La possibilité de rechercher le déficit en MCAD lors du dépistage néonatal est étudiée dès 1989 et est mise en place aux

États-Unis depuis les années 90s (3,30). Alors qu'en 2011 la Haute Autorité de Santé (HAS) émet des recommandations sur l'intérêt d'inclure le dépistage du déficit en MCAD chez le nouveau-né en France (31), ce n'est qu'en 2018 que les financements sont octroyés et l'organisation du dépistage national remaniée pour permettre sa mise en place dans les laboratoires de dépistage néonatal.

2.2. Epidémiologie

Historiquement, les données épidémiologiques du déficit en MCAD venaient des patients diagnostiqués sur la base de symptômes cliniques. L'incidence allait de 1/30 000 à 1/135 000. Cette population était constituée à 80% d'homozygotes pour la mutation c.985A>G de transmission autosomique récessive et essentiellement de patients caucasiens avec des origines d'Europe du nord. La fréquence de portage de cette mutation dans la population générale est variable selon la localisation géographique : en Europe du nord, aux Etats-Unis et en Australie, le portage de cette anomalie génétique est estimé entre 1:40 et 1:100 nouveau-nés. Au contraire, lors de la recherche de cette mutation sur le test de Guthrie de 1000 nouveau-nés japonais, aucun porteur n'a été retrouvé. Le portage élevé dans les populations caucasiennes permet de calculer un taux d'incidence théorique d'homozygotes de 1/6 400. La discordance entre ce chiffre et l'incidence des patients diagnostiqués sur la base de symptômes cliniques citée plus haut est probablement le résultat du sous-diagnostic lié au nombre de patients asymptomatiques (28,32–36).

L'arrivée du dépistage néonatal dans de nombreux pays a fait évoluer les connaissances de l'épidémiologie du déficit en MCAD de manière considérable. En effet, l'incidence de la maladie a significativement augmenté avec le dépistage : elle est de l'ordre de 1/10 000 à 1/20 000 dans les populations européennes. De plus, cette maladie a historiquement été décrite chez les caucasiens, mais le dépistage a permis d'évaluer sa prévalence dans de nombreux pays comportant d'autres ethnies :

- **Japon** : 1/51 000 naissances vivantes
- **Arabie Saoudite** : 1/18 000 naissances vivantes
- **Taiwan** : 1/263 500 naissances vivantes
- **Australie** : 1/19 000 naissances vivantes
- **Europe** : 1/4 900 (Allemagne) à 1/24 900 (Autriche) naissances vivantes
- **Amérique du Nord** : 1/23 400 (Canada) à 1/13 000 (certains états aux Etats-Unis) naissance vivantes

L'incidence chez les nouveau-nés en France n'est pas connue mais peut être estimée à 1/15 000 en se basant sur les données épidémiologiques des pays limitrophes, ce qui correspond à environ 50 nouveaux cas par an (4,34–36).

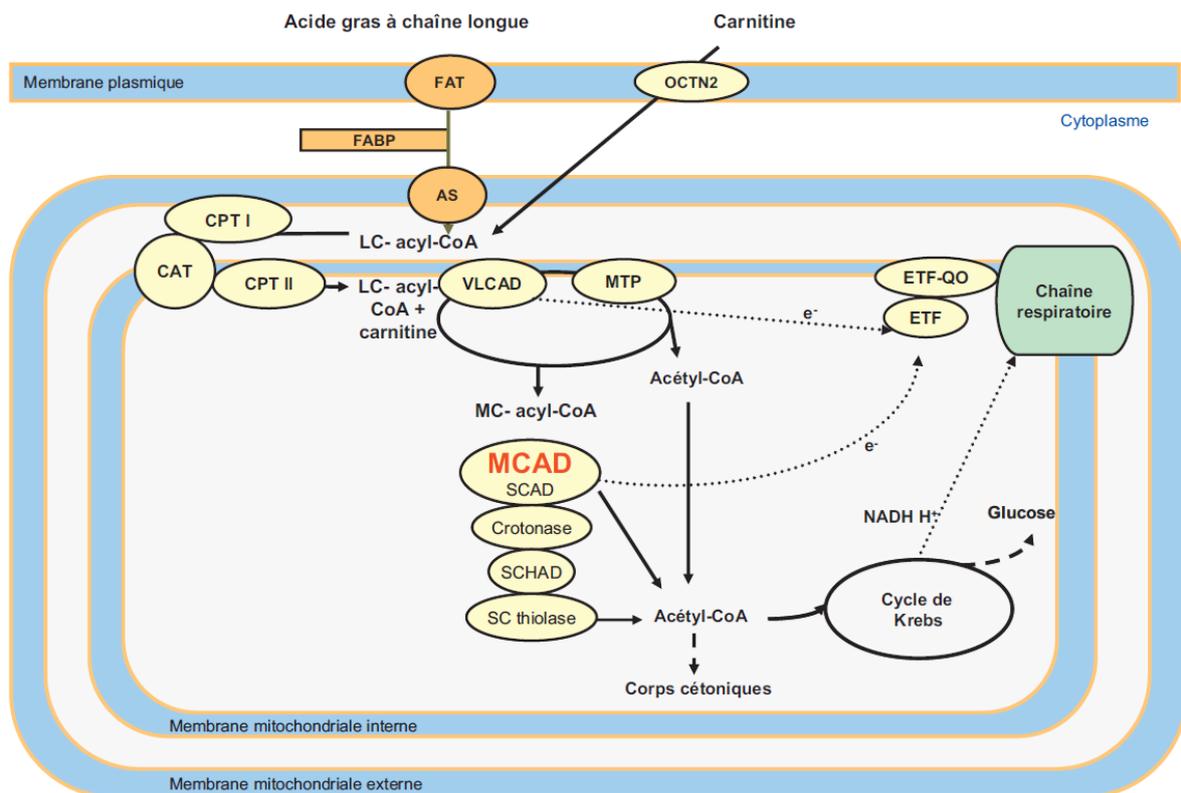
2.3. L'acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD)

La MCAD est une oxydoréductase qui intervient dans la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras de chaîne moyenne comportant 6 à 12 atomes de carbone (voir **Figure 5**) (4). Il s'agit d'une flavoenzyme homotétramérique dont les sous-unités ont une taille de 44 kDa. Chaque sous-unité de l'enzyme est composée de 3 domaines : un domaine α N-terminal, un domaine β et un domaine α C-terminal (voir **Figure 6**). Les domaines N et C-terminal sont essentiellement des hélices α et contribuent largement au cœur du tétramère. Le domaine β est compris de 2 feuillets β orthogonaux.

Cette enzyme est codée par le gène *ACADM* situé sur le bras court du chromosome 1 au niveau de la bande p31 et contient 12 exons. Il comprend une séquence de 1263 paires de bases codant pour les 421 acides aminés (AA) de la sous-unité précurseur. La synthèse de son précurseur, pMCAD (2,9 kDa plus large que son équivalent mature), se réalise au niveau des ribosomes cytosoliques. Il possède un peptide « leader » de 25 AA chargés positivement qui va le diriger vers la matrice mitochondriale. Une fois transporté dans la mitochondrie, le pMCAD subit un clivage et prend sa forme mature en formant un tétramère et en incorporant un FAD (32,37). L'expression du gène *ACADM* varie en fonction du type de tissu et l'âge du patient. A la naissance, le cœur présente un pic d'expression du gène. Ceci expliquerait la prépondérance de la symptomatologie cardiaque (arrêt cardiaque) retrouvé dans la période néonatale (38).

Figure 5 : Le rôle de la MCAD dans la bêta-oxydation

Déficit en MCAD : consensus français



D'après Feillet et al., 2012 (4)

Figure 6 : Structure de la MCAD



La MCAD forme une structure tétramérique (dimères de dimères). Les domaines N-terminal et C-terminal contiennent surtout des hélices α tandis que les domaines du milieu sont composés de feuillets β . Les couleurs permettent de distinguer chaque monomère (39) (RCSB Protein Data Bank).

2.4. Physiopathologie

Le déficit en MCAD est dû à une perte de fonction de l'enzyme liée aux diverses mutations pouvant atteindre le gène *ACADM*. Pour les génotypes les plus fréquents, cette perte de fonction est imputée à un mauvais repliement de la protéine et de tétramérisation de la protéine MCAD. Lorsque l'enzyme est sauvage, la lysine en position 304 interagit avec l'aspartate en 346 pour former la structure 3D de la protéine. Dans la mutation faux-sens la plus fréquemment retrouvée c.985A>G, la substitution d'une adénosine par une guanine engendre le remplacement de la lysine par un glutamate (p.Lys329Glu) à l'emplacement 329 du précurseur MCAD soit sur l'emplacement 304 de la sous-unité MCAD mature (22,37,40,41), engendrant une anomalie de la conformation de l'enzyme et une réduction de son activité. Cette anomalie est accentuée par la chaleur, ce qui explique que la fièvre retrouvée dans les épisodes infectieux puisse déclencher des crises métaboliques (42). D'autres types de mutations peuvent être retrouvés : par exemple, une mutation non-sens peut tronquer l'enzyme et réduire ainsi son activité (43–46).

Conséquence de la perte de fonction de la MCAD

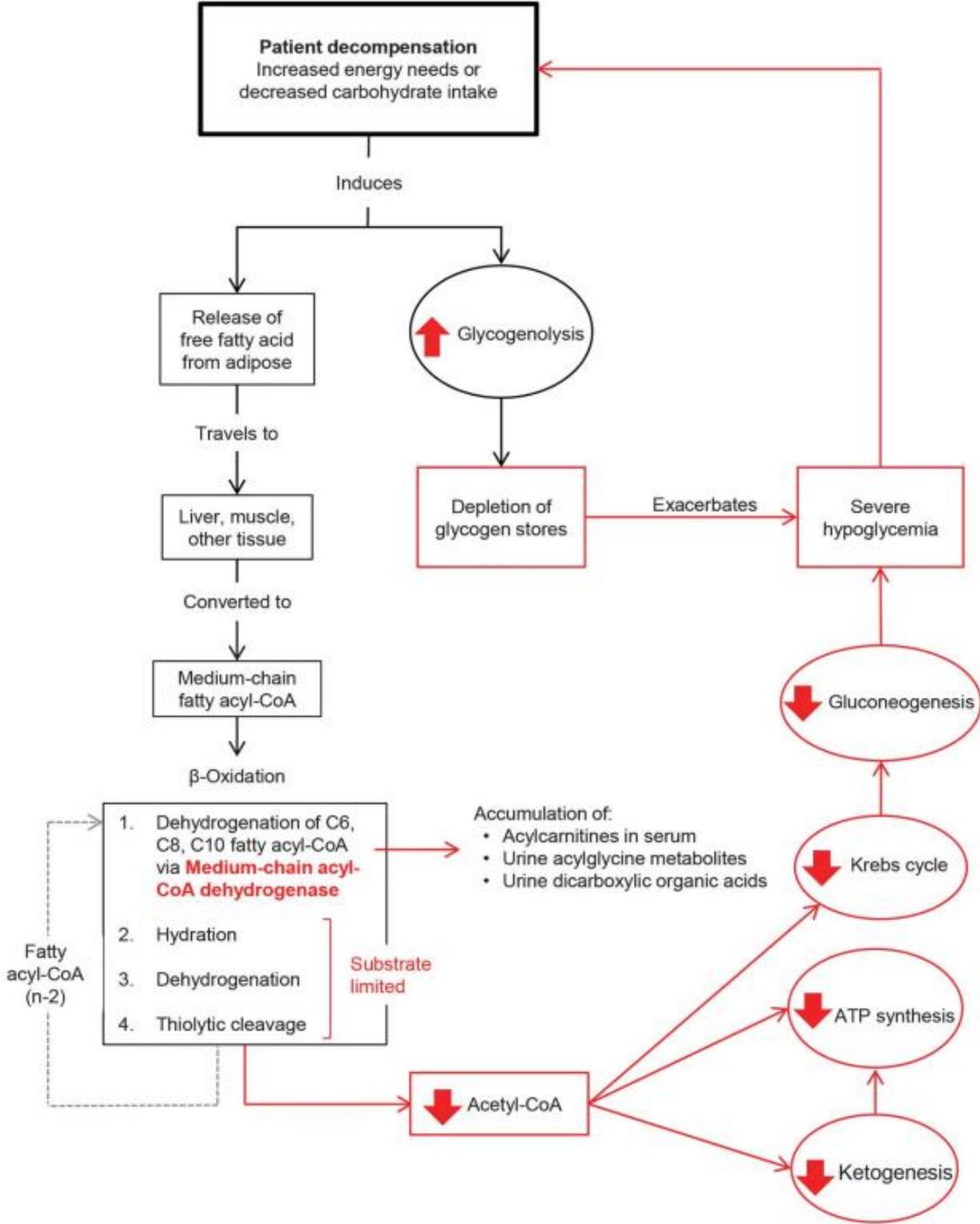
La perte de fonction de la MCAD se manifeste cliniquement lorsque la β -oxydation des AG est fortement sollicitée : en cas de défaut d'apport alimentaire (lors d'un jeûne prolongé, notamment au cours de la nuit, suite à des vomissements ou pour une anesthésie générale) ou d'augmentation des besoins énergétiques (gastro-entérite virale, infection respiratoire, maladie intercurrente, exercice physique, stress, vaccination combinant diphtérie-coqueluche-tétanos). Les cas décrits dans la littérature sont le plus souvent des crises métaboliques liées à une infection intercurrente (4,33,47,48).

Lorsque la β -oxydation est fortement sollicitée, les AG à chaîne moyenne s'accumulent car la MCAD défaillante ne peut pas catalyser leur déshydrogénation avec une cadence suffisante. Il faut cependant noter qu'étant donné le chevauchement d'activité entre la MCAD et les autres acyl-CoA-déshydrogénases, la β -oxydation des AG n'est pas complètement bloquée. Cela explique l'accumulation prédominante de l'acide octanoïque (C_8) et moindre des acides décanoïque (C_{10}) et hexanoïque (C_6). La diminution de production d'acétyl-CoA résultante empêche la production d'ATP par le cycle de Krebs et la production de corps cétoniques (voir **Figure 7**) (49).

L'insuffisance de production énergétique à partir des lipides se traduit par une consommation du glucose sanguin par les organes vitaux. L'hypoglycémie consécutive

contribue à de nombreux signes cliniques du déficit en MCAD comme la léthargie, les troubles de la conscience ou le décès (10).

Figure 7 : Pathogénèse d'un patient atteint du déficit en MCAD en crise



D'après Gartner et al, 2015 (16)

Toxicité des AG à chaîne moyenne

L'accumulation des AG à chaîne moyenne présente en elle-même une toxicité. Le cœur et le foie étant des sièges importants de β -oxydation, les AG s'y accumulent et engendrent une stéatose hépatique et une toxicité cardiaque (4,50).

Par ailleurs, l'accumulation d'AG à chaîne moyenne perturbe l'homéostasie mitochondriale cérébrale. Ils ont une activité inhibitrice au niveau de la chaîne respiratoire, de la phosphorylation oxydative et de l'activité Na^+/K^+ -ATPase cérébrale chez le rat. Ces interférences contribueraient à la neurotoxicité du déficit en MCAD (51–58).

2.5. Clinique

Le déficit en MCAD est une pathologie d'apparition épisodique provoquée par les facteurs déclencheurs cités plus haut. L'âge médian d'apparition du premier épisode est de 1 à 1,5 ans, il existe cependant des présentations néonatales et des décompensations plus tardives lors de la période scolaire. Des manifestations à l'adolescence et à l'âge adulte sont rares mais ont été décrites dans la littérature (59,60). A l'inverse, la pénétrance incomplète explique que certains patients peuvent rester asymptomatiques toute leur vie (49,61).

Présentation clinique chez l'enfant

Les signes de décompensation les plus courants chez l'enfant sont les vomissements, la léthargie, l'encéphalopathie, l'hypotonie voire le coma. Historiquement, lorsque la maladie était encore peu connue, cette clinique était souvent étiquetée comme syndrome de Reye. Certains patients peuvent également présenter des crises convulsives et une hépatomégalie. La gravité de la maladie relève du fait que ces épisodes métaboliques peuvent être fatals. En effet, le taux de mortalité est d'environ 20% lors de la première crise métabolique lorsque le diagnostic n'est pas connu (4,33,34,62,63).

A plus long terme, des séquelles neurologiques ont été décrites dans la littérature chez des patients ayant présenté une décompensation métabolique dans l'enfance. Il a été rapporté des retards du développement, des troubles du langage, de l'aphasie ou des troubles de déficit de l'attention. Ces complications pourraient être dues à des lésions cérébrales créées lors d'épisodes métaboliques aigus et qui sont particulièrement délétères chez le nourrisson et l'enfant en bas âge en plein développement neurologique. Cependant, le lien de corrélation entre la maladie et tous ces troubles neurologiques n'est pas établi : certains auteurs ne retrouvent pas de différence statistiquement significative dans le neurodéveloppement des personnes atteintes du déficit en MCAD par rapport à la population générale (33,47,64).

Présentation clinique chez l'adulte

Chez l'adulte, les crises métaboliques sont beaucoup moins fréquentes car la dépendance à la β -oxydation des AG à chaîne moyenne diminue avec l'âge : le risque de décompensation est donc moindre sans pour autant être nul. Différents types d'atteintes d'organes sont décrits dans la littérature : au niveau digestif (vomissements), neurologique (sommolence, crise épileptique, coma) (4), musculaire (faiblesse, douleur musculaire, rhabdomyolyse, intolérance à l'effort) (63,65), hépatique (66) et cardiaque (arythmie) en plus des signes de décompensation métabolique (acidose métabolique, hyperammoniémie, hyperlactacidémie, hypoglycémie) (67). La faiblesse musculaire est le plus souvent une séquelle retrouvée chez des patients ayant déjà eu plusieurs crises métaboliques et plusieurs hospitalisations avant d'être diagnostiqués. Chez l'adulte, au moins un facteur déclenchant était toujours retrouvé : l'exercice physique, le jeûne, la prise d'alcool ou une infection intercurrente. Dans certains de ces cas, l'épisode s'est terminé en décès (4,33,63,65,66,68,69).

2.6. Biologie

Investigations biochimiques initiales

Lors d'une décompensation aiguë, la caractéristique la plus souvent retrouvée est une hypoglycémie hypocétosique avec un trou anionique augmenté. L'hypoglycémie est documentée chez 42-96% des patients avec une décompensation métabolique sévère (33,47). Il faut cependant être vigilant sur l'interprétation des corps cétoniques, car leur présence ou leur augmentation ne permet pas d'exclure un déficit en MCAD. En effet, les acyl-CoA déshydrogénases des acides gras à chaîne longue et courte permettent tout de même une production d'acétyl-CoA et donc de corps cétoniques. On peut également retrouver une hyperuricémie, une acidose lactique et une élévation des transaminases hépatiques. La diminution d'apport énergétique au niveau hépatique réduit l'activité des voies métaboliques hépatiques, notamment celle du cycle de l'urée, résultant en une hyperammoniémie et par conséquent une encéphalopathie. L'hyperuricémie pourrait être le reflet de la perturbation mitochondriale et du dommage tissulaire engendré par la décompensation métabolique (16,62,70-73).

Dosage des acides gras libres

Un autre paramètre intéressant à doser est la concentration d'acides gras libres plasmatiques. Ceux-ci peuvent être augmentés ainsi que le ratio d'acides gras libres / 3-hydroxybutyrate, témoin de l'anomalie de la cétogenèse. Cette élévation des acides gras libres

peut être responsable d'arythmie cardiaque (74). Parmi les métabolites plus spécifiques, on peut trouver une élévation de la concentration d'octanoate saturé (C₈) et surtout de *cis*-4-décénoate insaturé plasmatique lors de crises métaboliques ou d'épreuve de jeûne. Le *cis*-4-décénoate est pathognomonique dans le déficit en MCAD et non influencé par une supplémentation en triglycérides à chaîne moyenne (47).

Profil des acylcarnitines plasmatiques

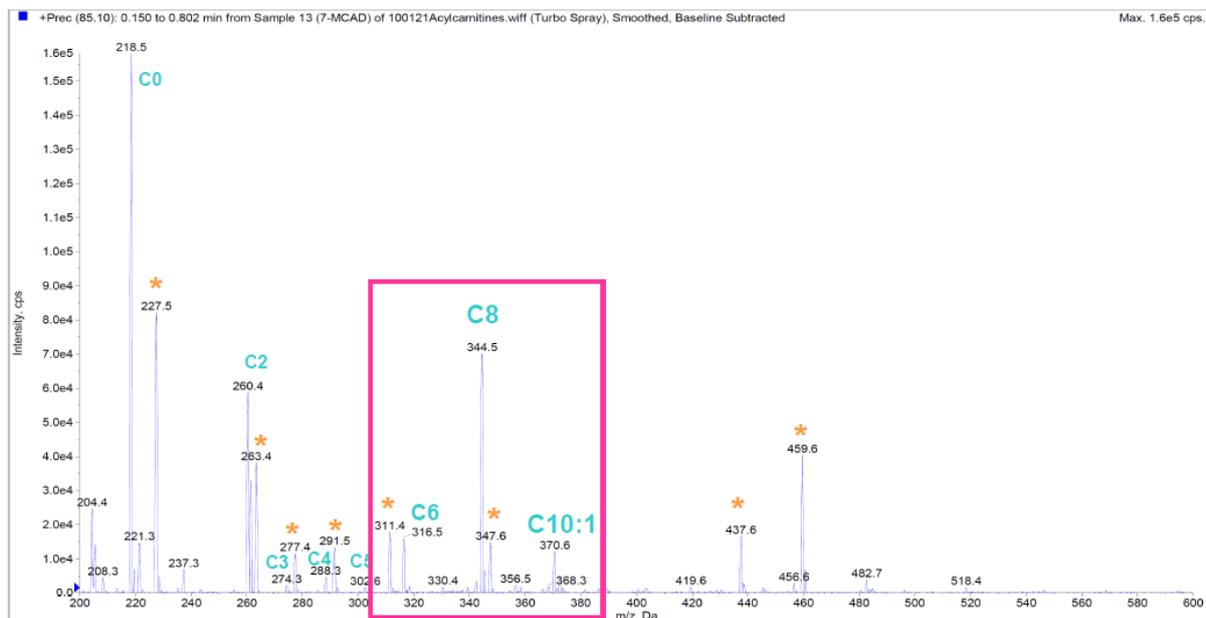
Le profil des acylcarnitines plasmatiques, réalisé par spectrométrie de masse en tandem dont le principe est décrit dans le chapitre 4.1., est l'analyse phare pour établir le diagnostic des anomalies de la β -oxydation mitochondriale des AG. Les acyl-CoA accumulés forment des acylcarnitines dosables dans le plasma ou le sang total permettant de situer le lieu du déficit en fonction du type de profil. Le profil peut cependant se normaliser en dehors des épisodes de décompensation, le prélèvement doit donc être réalisé lors d'une crise métabolique ou à défaut, à jeun.

Lors du déficit en MCAD, le profil des acylcarnitines va refléter l'accumulation des acylcarnitines à chaîne moyenne de C₆ à C₁₀ : C₆ (hexanoylcarnitine), C₈ (octanoylcarnitine), C₁₀ (décanoylcarnitine) et C_{10:1} (décénoylcarnitine). Le C₈ est le plus élevé tandis que le C₆ et le C₁₀ peuvent être catabolisés par la SCAD et la LCAD respectivement, d'où une accumulation moins importante. Cet écart peut être mis en évidence par l'augmentation du ratio C₈/C₁₀. Ce ratio permet également de distinguer les génotypes dit « sévères » (homozygotes c.985A>G) pour lesquels le ratio sera plus élevé, des génotypes « modérés » (hétérozygotes composites). Le ratio C₈/C₂ peut également être utilisé dans l'interprétation du profil. Bien que le profil des acylcarnitines soit un excellent outil diagnostique, il est mal corrélé au risque de décompensation métabolique (42,75,76).

L'interprétation du profil des acylcarnitines doit toujours prendre en compte la concentration de carnitine (C₀) libre plasmatique, car un déficit en carnitine peut masquer une anomalie de la β -oxydation mitochondriale des acides gras. En cas de déficit en carnitine, la carnitine libre et totale seront diminuées. En cas d'anomalie de la β -oxydation, la carnitine totale, qui comprend la carnitine libre et les acylcarnitines accumulées, sera normale voire augmentée tandis que la carnitine libre sera diminuée par consommation. Par ailleurs, l'heure de prélèvement joue un rôle dans le dosage des carnitines : à jeun, la libération de carnitine libre dans le plasma est augmentée, reflet d'une mobilisation des réserves de carnitine dans les tissus. A l'état postprandial, la carnitine libre plasmatique est souvent basse (47,74,77).

Un critère de diagnostic du déficit en MCAD proposé pour le profil des acylcarnitines est une concentration en $C_8 > 0,3 \mu\text{mol/L}$, un ratio $C_8/C_{10} > 5$ et une absence d'accumulation significative des acylcarnitines à chaînes de plus de 10 carbones (75).

Figure 8 : Profil des acylcarnitines plasmatique d'un patient atteint du déficit en MCAD

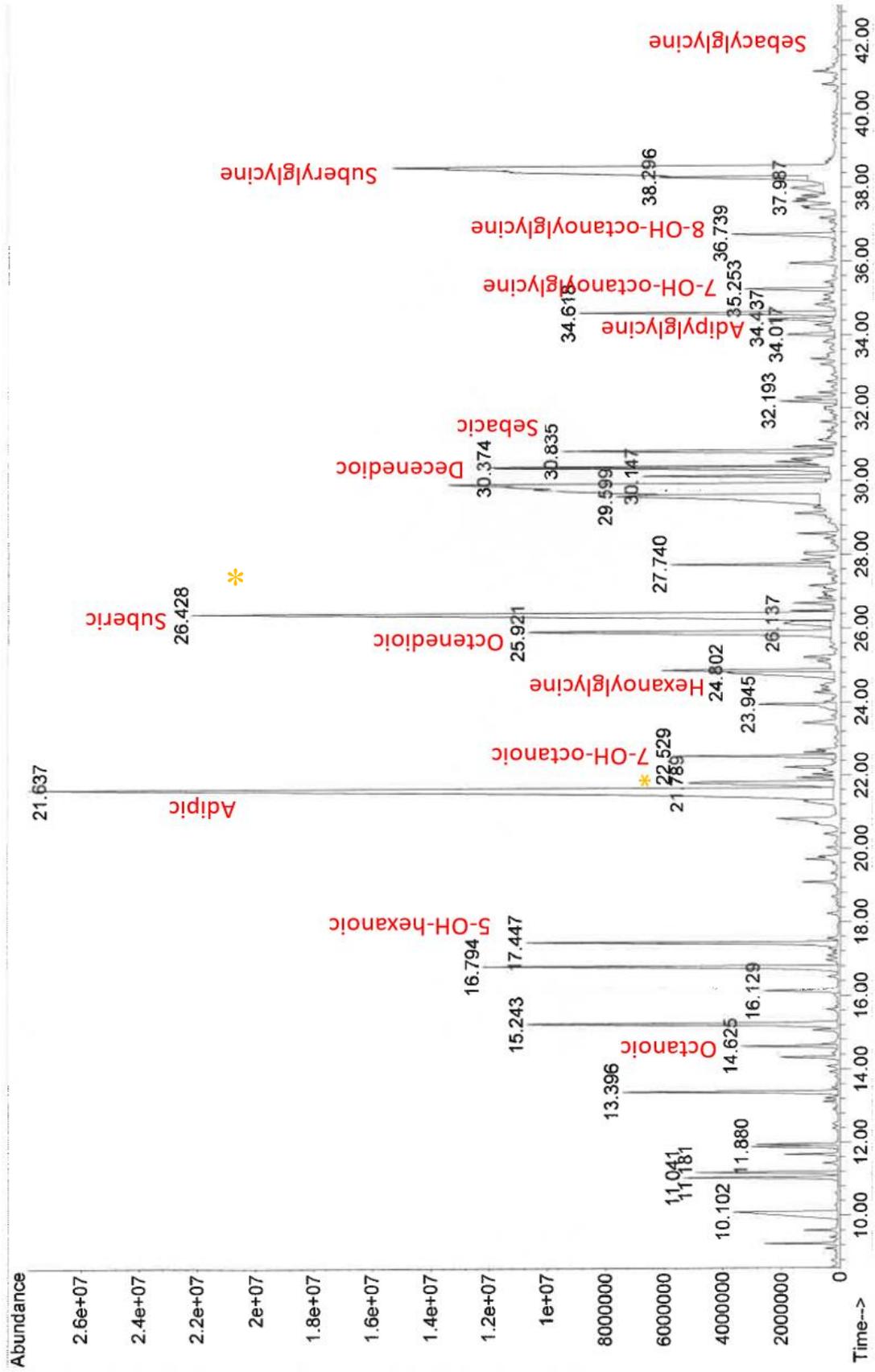


Ce profil présente en abscisses le rapport m/z et en ordonnées l'intensité du signal. Sur ce profil, les pics indiqués par une étoile * correspondent aux étalons internes. Les autres pics correspondent à des acylcarnitines dont la longueur de chaîne est indiquée en bleu. Par exemple, C_0 correspond à la carnitine libre, C_2 correspond à l'acétylcarnitine, etc. Sur ce profil d'un patient atteint de déficit en MCAD, une augmentation de C_6 , C_8 et $C_{10:1}$ est observée.

Chromatographie des acides organiques urinaires (CAO)

La chromatographie des acides organiques urinaires (CAO) est un outil puissant pour détecter les erreurs innées du métabolisme par la mise en évidence de métabolites intermédiaires. Il peut être réalisé par chromatographie gazeuse avec détection en spectrométrie de masse (GC-MS) ou par chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse. Dans toute anomalie de la β -oxydation des AG, une excrétion urinaire d'acides dicarboxyliques et d'acylglycines, voie alternative d'élimination des AG cumulés, peut être retrouvée à la CAO lors d'un épisode aigu. Si les urines sont prélevées en dehors d'un épisode aigu, la CAO peut se normaliser (78).

Figure 9 : Chromatographie des acides organiques urinaires d'un patient atteint du déficit en MCAD



Cette chromatographie des acides organiques urinaires présente en abscisses le temps en minutes et en ordonnées l'abondance du signal. Sur ce profil, les pics indiqués par une étoile * correspondent à des étalons internes (D3-AMM et 4-phénylbutyrique).

La spécificité du déficit en MCAD est l'excrétion massive des acides dicarboxyliques à chaîne moyenne dans les urines : l'acide adipique C₆ (hexanedioïque), l'acide subérique C₈ (octanedioïque) et l'acide sébacique C₁₀ (decanedioïque). La présence d'acides dicarboxyliques peut être expliquée par une ω -oxydation des acides décanoïques, dodécanoïque et tétradécanoïques suivie d'une β -oxydation des acides dicarboxyliques produits. Les dérivés de l' ω -oxydation des AG peuvent également être retrouvés sur la chromatographie, notamment l'acide 5-hydroxy-hexanoïque. Au niveau des glycines, ce sont l'hexanoylglycine, la phénylpropionylglycine et la subérylglycine qui augmentent fortement lors d'épisodes de décompensation aigue tandis que l'acide 7-OH-octanoïque, l'acide 9-OH-decanoïque, *cis*-5-dodecenedioïque et *cis*-4-decenedioïque (C_{10:1}) sont modérément augmentés (79). Chez le nouveau-né, la phénylpropionylglycine est absente car il s'agit d'un métabolite issu de la flore intestinale (61).

Étant donné le défaut de production de corps cétoniques, les corps cétoniques urinaires sont généralement bas mais il est tout de même possible d'en retrouver à la CAO et à la bandelette urinaire. La présence de corps cétoniques ne doit donc pas exclure un déficit en MCAD.

Lors de l'interprétation de la CAO, il faut rester vigilant sur une possible interférence des suppléments de triglycérides à chaîne moyenne, retrouvé par exemple dans les laits pour prématurés, qui engendrent une augmentation des concentrations en acide octanoïque et décanoïque et des acides dicarboxyliques correspondants (47,77,78,80–82).

Analyse des acylglycines urinaires

En dehors de la CAO, un dosage spécifique des acylglycines urinaires par chromatographie gazeuse détecté par spectrométrie de masse (GC-MS) peut être réalisé. Cette analyse repose sur la détermination quantitative, spécifique par isotope de l'excrétion urinaire de la n-hexanoylglycine, la 3-phénylpropionylglycine et de la subérylglycine. Les acylglycines sont formées dans la mitochondrie lorsque les esters d'acyl-CoA se conjuguent avec une glycine grâce à la glycine N-acyltransférase.

L'intérêt de l'hexanoylglycine et de la phénylpropionylglycine est leur persistance même chez les patients asymptomatiques. Par ailleurs, cette analyse ne nécessite pas de préparation du patient : celui-ci n'a pas besoin d'être à jeun ou de faire des épreuves de charges avec des triglycérides à chaîne moyenne, de la carnitine ou de l'acide phénylpropionique. Cependant, ces métabolites ne sont pas spécifiques : ils peuvent également être retrouvés dans l'acidurie glutarique de type II et l'acidurie éthylmalonique-adipique (83–85).

Analyse de la β -oxydation sur fibroblastes ou leucocytes

Une exploration globale de la β -oxydation peut être réalisée sur des fibroblastes ou des leucocytes du patient. Les cellules sont mises en culture puis un profil des acylcarnitines du milieu de culture est effectué. Une accumulation des acylcarnitines C₆ à C₁₀ permet de confirmer les anomalies du profil des acylcarnitines plasmatiques (77,86).

Mesure de l'activité enzymatique

La mesure spécifique de l'activité enzymatique de la MCAD est un autre outil diagnostique. Elle peut être réalisée sur des fibroblastes en culture ou sur d'autres tissus (leucocytes, foie, cœur, muscle squelettiques ou amniocytes) par HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography) ou par spectrométrie de masse en tandem. Le seuil de positivité est cependant variable selon les pays, pouvant aller de 25 à 35% (4,74,87,88).

Anatomo-pathologie

Lorsqu'une biopsie hépatique est réalisée chez un patient présentant un déficit en MCAD, généralement dans le cadre d'une autopsie, une stéatose hépatique panlobulaire avec des hépatocytes vacuolisés remplis de micro- ou macrovésicules de lipides peut être observée. Dans un cas décrit dans la littérature d'un adulte présentant une rhabdomyolyse (65), une biopsie musculaire a été réalisée sur laquelle des vésicules de lipides entre les myofibrilles ont été mises en évidence. Ces vésicules peuvent également être retrouvées dans le myocarde et les cellules épithéliales rénales (62,78,89).

Tests dynamiques

Les épreuves dynamiques peuvent participer au diagnostic. Il existe par exemple l'épreuve de jeûne qui consiste à mettre le sujet à jeun en surveillant son évolution clinique et biologique. S'il évolue vers une décompensation métabolique et que les anomalies biochimiques compatibles avec un déficit en MCAD sont retrouvées, le diagnostic d'une anomalie de la β -oxydation peut être posé. Ce type de test est cependant dangereux pour le patient : il a été mis en évidence chez 50% de patients mis à l'épreuve, des manifestations cliniques sévères voire de rares décès. Un test de charge en lipides et triglycérides à chaîne moyenne est également potentiellement dangereux car il peut induire une détérioration neurologique ou hépatique (47).

Le test de charge à l'acide phénylpropionique permet de mettre en évidence une anomalie de la MCAD car le phénylpropionate est oxydé par la MCAD en acide benzoïque. Un patient sain, pouvant le métaboliser correctement, l'excrétera sous forme d'hippurate. Un

patient atteint du déficit en MCAD excrétera 1/3 de phénylpropionylglycine et 2/3 d'hippurate. Il faut cependant noter que chez le nouveau-né, ce test peut être négatif malgré un profil d'acylcarnitines évocateur (47,90).

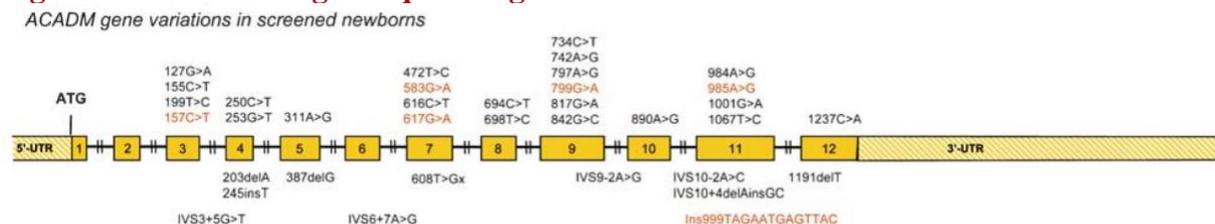
Post-mortem

Devant tout cas de mort subite du nourrisson ou de décès dans un contexte de syndrome de Reye, il faut penser aux anomalies de l'oxydation des acides gras dont le déficit en MCAD, comme le précisent les recommandations de la HAS dans la « Prise en charge en cas de mort inattendue du nourrisson (moins de 2 ans) » de février 2007 (91). Un diagnostic post-mortem peut être réalisé par prélèvement de sang et/ou de bile sur papier buvard pour faire un profil des acylcarnitines voire une analyse du gène. La combinaison des 2 prélèvements augmente les chances de faire un diagnostic. Les prélèvements post-mortem étant souvent parasités par des pics interférents liés aux dommages tissulaires, il est préférable dans la mesure du possible d'utiliser le papier buvard prélevé à J3 pour le dépistage néonatal, avec le consentement des parents, pour réaliser un profil des acylcarnitines (77).

2.7. Biologie moléculaire

Le déficit en MCAD est dû à une anomalie sur le gène *ACADM* codant pour la MCAD. A ce jour, 294 variants ont été identifiés (92), dont une majorité sont des mutations faux-sens. L'impact clinique de la plupart de ces mutations n'est pas connu. En effet, la plupart de ces mutations ayant été découverte grâce au dépistage néonatal, les enfants concernés sont prémunis contre toute décompensation par des mesures préventives (34,42).

Figure 10 : Variations génétiques du gène *ACADM*



D'après Gregersen et al, 2008 (93)

L'introduction du dépistage néonatal dans de nombreux pays a permis une meilleure compréhension de la pathologie, notamment au niveau génétique, par la détection d'un plus grand nombre de cas. L'exploration génétique de ces nouveau-nés montre que seulement 36-71% des patients diagnostiqués suite au dépistage sont homozygotes pour la mutation

c.985A>G. Par ailleurs, 30-40% sont des hétérozygotes composites avec la mutation c.985A>G et une autre mutation plus rare (3).

La deuxième mutation la plus fréquente, découverte grâce au dépistage néonatal, est la mutation faux-sens c.199C>T (p.Tyr67His). Cette mutation est retrouvée chez 6-10% des nouveau-nés dépistés positifs. Elle représente 20-30% des mutations non-c.985A>G retrouvées au dépistage. L'activité résiduelle enzymatique d'un patient hétérozygote composite avec c.199C>T est souvent plus élevée que le génotype classique avec une activité entre 11-30% ce qui ne permet pas de les différencier des porteurs de la mutation c.985A>G. Par ailleurs, le profil des acylcarnitines est significativement moins perturbé lorsqu'un patient a cette mutation vis-à-vis du C₈, du C_{10:1} et des ratios C₈/C₆, C₈/C₁₀ et C₈/C₁₂. Des études enzymatiques démontrent que cette mutation n'altère que légèrement l'activité enzymatique, cependant elle modifie la stabilité de l'enzyme. A température élevée, l'activité enzymatique est significativement abaissée, ce qui peut être le cas lors d'une infection intercurrente avec hyperthermie (34,41,76,90,93-98).

En ce qui concerne les autres mutations, leur rareté les rend difficiles à interpréter. Ces nouveaux variants étaient-ils précédemment sous-diagnostiqués car ils n'ont aucune conséquence clinique ? Ont-ils une pénétrance incomplète ? Des outils de prédiction ou d'analyse protéique en 3D peuvent être utilisés pour simuler l'impact de ces mutations sur la protéine MCAD. Cependant ces techniques ont leurs limites : par exemple, certaines mutations décrites comme non délétères en simulation donnent en réalité une protéine MCAD avec une structure perturbée. Dans tous les cas, il n'existe pas de corrélation entre le génotype et le phénotype clinique : certains patients n'ayant aucune activité enzymatique résiduelle (décalage du cadre de lecture ou codon stop prématuré) peuvent être asymptomatiques toute leur vie tandis que des patients avec un profil dit « modéré » (par exemple un hétérozygote composite avec la mutation c.985A>G et c.157C>T) peuvent décéder soudainement de leur maladie (4,34,42,46,76,94,96).

Épidémiologie des génotypes

L'épidémiologie des différentes mutations est variable selon la géographie. Le portage de la mutation prépondérante c.985A>G est fréquent : l'incidence est d'environ 1/40 en Angleterre, en Australie ou en Amérique du Nord. En France, sur une population de donneurs de sang à Paris, la fréquence de la mutation observée en 1995 était de 1/138, ce qui ferait une incidence estimée de la maladie liée à la mutation c.985A>G de 1/19 000. En Asie (Taiwan,

Japon, Corée), on retrouve plutôt la délétion c.499_452delCTGA. Elle engendre un décalage du cadre de lecture, résultant en un codon stop prématuré (99–101).

Figure 11 : Épidémiologie de la mutation fréquente c.985A>G

Table 1
Frequency by country of homozygosity and heterozygosity for K304E MCAD mutation

Country of origin	Frequency of homozygosity*	Frequency of heterozygosity	Homozygotes	Heterozygotes	Population total	Sample source	Reference No.
Australia	1/20,000	1/71	0	5	353	Anonymous spare Guthrie cards	7
Belgium	1/24,000	1/77	0	13	998	Surveyed newborn blood samples	8
Bulgaria	1/33,000	1/91	1	9	1005	Surveyed newborn blood samples	8
Czech Republic	1/231,000	1/240	0	5	1201	Surveyed newborn blood samples	8
Denmark	1/42,000	1/102	0	9	921	PKU cards	9
Finland	1/10,000	1/50	0	4	200	Blood donors	10
France							
Lyon		1/532	0	2	1064	Unselected newborn blood spots	11
Aquitaine	1/44,000	1/105	0	20	2090	Unselected newborn blood spots	12
Normandy		1/118	0	17	2000	Random newborn blood spots	13
Paris	1/19,000	1/140	0	6	414	Caucasian blood donors	14
Germany	1/53,000	1/116	0	26	3015	Surveyed newborn blood spots	8
Hungary	1/192,000	1/168	0	6	1008	Surveyed newborn blood spots	8
Italy	1/442,000	1/333	0	3	997	Newborn PKU cards	15
Japan	0	0	0	0	1000	Anonymous spare Guthrie cards	7, 8
Netherlands	1/16,000	1/63	0	99	6195	Anonymous spare Guthrie cards	16
Poland	1/38,000	1/98	0	10	980	Surveyed newborn blood spots	8
Russia	1/27,000	1/83	0	5	413	Unselected newborn blood spots	17
Scotland	1/304,000	1/276	0	2	552	Women AFP lab clotted blood	18
Spain	1/82,000	1/141	1	5	1000	Unspecified newborn blood spots	8
Switzerland	1/11,000	1/52	0	22	1142	Guthrie cards from healthy babies	19
Turkey	1/186,000	1/216	0	5	1079	Surveyed newborn blood spots	8
UK	1/17,000	1/64	0	158	10,171	Surplus dried blood samples	20
Trent	1/18,500	1/68	0	6	410	Neonatal population	21
Birmingham	1/6,400	1/40	0	12	479	Anonymous Guthrie cards	22
US							
North Carolina	1/28,000	1/84	0	31	2611	Caucasian PKU cards	4
Texas		1/107	0	5	536	Anonymous spare Guthrie cards	7
Pennsylvania**	1/20,408	†	4	5‡	80,371	Supple. newborn screening program	5

*Estimated from frequency of heterozygosity; †, cannot be calculated—entire population not genotyped; ‡, compound heterozygotes, not including carriers.
**Prospective population-based study.

D'après Wang et al., 1999 (102)

2.8. Prise en charge

2.8.1. Approche diététique

La prise en charge du déficit en MCAD repose essentiellement sur le régime alimentaire. Le but est de prévenir les situations où les AG seront fortement mobilisés. Il faut donc éviter les longues périodes de jeûne par un rapprochement des repas, avec une attention particulière chez le nouveau-né et le nourrisson la nuit. Les connaissances actuelles ne permettent pas de réaliser une prise en charge adaptée au génotype et le traitement préventif étant relativement

simple sans risque iatrogène, tout patient, quel que soit son génotype ou ses concentrations de C₈, devrait suivre ces consignes alimentaires (103).

Il existe cependant peu d'études robustes permettant de faire des recommandations reconnues au niveau international sur les délais de jeûne acceptable. La **Figure 12** résume des recommandations de délai de jeûne maximal acceptable dans quelques pays différents. Selon une étude bibliographique de Derks et al. (104), il est proposé qu'entre 6 mois et 1 an d'âge, il ne faut pas dépasser 8h de jeûne, puis 10h dans la 2^e année de vie et enfin 12h par la suite. En dehors des repas habituels, cela correspond finalement à assurer un repas vespéral durant les 2 premières années de vie. Il faut garder en tête que ces recommandations sont pour des enfants en bonne santé (en dehors de toute infection intercurrente avec fièvre ou autres situations de stress). Toutefois, une étude réalisée en 2013 au Pays-Bas suggère qu'il n'est peut-être pas utile de conseiller l'éviction du jeûne pour les patients avec une activité enzymatique > 10% au-delà de 6 mois d'âge. Dans cette étude, 6 patients dans cette catégorie ont supporté 15h de jeûne sans perturbations biochimique et clinique (105,106). Le consensus français pour le délai de jeûne maximal acceptable est résumé dans la **Figure 13**.

Il faut noter que les nouveau-nés nourris exclusivement au lait maternel ont un risque plus élevé de morbidité et de mortalité que ceux nourris au lait artificiel dans la période néonatale, lorsque les résultats du dépistage néonatal ne sont pas encore connus. Ceci est probablement lié à l'insuffisance de production de lait maternel lors des premiers jours de vie du nouveau-né (107). Cependant, l'allaitement maternel n'est pas systématiquement responsable de décompensation, car 5 sur 8 nouveau-nés avec un déficit en MCAD asymptomatiques sont allaités (61,63).

Figure 12 : Exemples de délais de jeûne maximum acceptable

Age (months)	Maximum fasting time for children with MCAD deficiency (hours)			
	Germany (M. Lindner, personal communication, 2008)	Australia (B. Wilcken, personal communication, 2008)	UK (Dixon & Champion 2008)	Holland (Derks et al 2007)
1	6	4	6	Not stated
2			8	
3				
4				
5	6	10		
6				
7	8	8-10	12	8
8				
9				
10				
11				
1 year	10	12	10	
2 years			12	
3 years				
>4 years	10			

D'après Walter et al., 2009 (105)

Figure 13 : Consensus français sur le temps de jeûne autorisé dans le déficit en MCAD en fonction de l'âge

Âge	Temps de jeûne nocturne (heures)
Naissance à 2-4 semaines	3 à 4
1 à 4 mois	4 à 6
4 à 8 mois	6 à 8
8 à 10 mois	8 à 10
10 à 12 mois	10 à 12
1 à 6 ans	12
> 6 ans	< 14

MCAD : acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne.

D'après Feillet et al., 2012 (4)

L'élément primordial à la prise en charge est donc l'éducation thérapeutique. Les parents doivent connaître les facteurs de risque et pouvoir détecter le plus tôt possible les signes annonciateurs d'une décompensation afin de pouvoir initier tout de suite une action préventive. En cas d'infection ou d'exercice physique intense, ils doivent donner une boisson riche en glucides (à ne pas confondre avec les solutions de réhydratation orales qui ne contiennent pas suffisamment de glucose) jour et nuit jusqu'à récupération. La mesure de la glycémie à domicile pour détecter une décompensation métabolique n'est pas recommandée car elle peut mener à une fausse sensation de sécurité : d'une part, la sensibilité des appareils de mesures capillaires

n'est pas suffisante notamment dans les valeurs basses ; d'autre part, l'hypoglycémie peut apparaître tardivement lors d'une décompensation et donc retarder la prise en charge (108).

L'éducation thérapeutique doit également faire comprendre aux parents les situations dans lesquelles une prise en charge médicale doit être requise. Par exemple, en cas de refus de boisson, d'aggravation de l'état du patient, de vomissements ou de diarrhée, il faut rapidement se tourner vers un professionnel de santé afin de mettre en place des perfusions intraveineuses de glucose et d'électrolytes. Enfin, lorsque l'enfant devient adolescent puis adulte, il doit lui-même être éduqué afin de savoir reconnaître ses symptômes et la conduite à tenir devant ces symptômes (103,108).

2.8.2. Supplémentation en L-carnitine

L'intérêt de la supplémentation en L-carnitine (Levocarnil®) chez les patients avec un déficit en MCAD reste controversé. En théorie, l'apport de carnitine devrait réduire la fréquence et la gravité des décompensations métaboliques en corrigeant le déficit en carnitine secondaire, en éliminant les métabolites toxiques qui s'accumulent, en restaurant le ratio acyl-CoA/CoA intramitochondrial. Par ailleurs, des expériences *in vitro* montrent un effet protecteur de la carnitine face à la toxicité de l'acide octanoïque envers le plexus choroïde (109). Des études mettent en évidence une augmentation de l'excrétion d'acylcarnitines urinaires à l'effort sous supplémentation en L-carnitine, mais dans tous les cas, les patients restent asymptomatiques avec ou sans apport de L-carnitine. Finalement, en pratique, aucune étude suffisamment robuste confirme un bénéfice clinique de cette supplémentation (110–113).

2.8.3. Supplémentation en riboflavine

La riboflavine (ou vitamine B2) est un précurseur de la FAD qui à son tour est un cofacteur de la MCAD. Le rôle anti-oxydant de la riboflavine pourrait avoir un effet protecteur. Par ailleurs, le FAD issu de la riboflavine aurait un effet stabilisant vis-à-vis de la MCAD (114). L'utilisation thérapeutique de la riboflavine pourrait donc en théorie agir comme chaperon pharmacologique de l'enzyme. De plus, Duran et al. (115) ont démontré *in vitro* une augmentation de l'activité enzymatique chez des patients homozygotes pour la mutation c.985A>G après supplémentation en riboflavine. Il faut prendre cette information en compte lors des premiers tests diagnostiques : une supplémentation en riboflavine peut surestimer les résultats des tests enzymatiques. Néanmoins, son intérêt clinique n'est pas démontré *in vivo* (114–117).

2.8.4. Conseil génétique

Le déficit en MCAD étant une maladie génétique, le diagnostic chez un patient doit entraîner une enquête familiale, notamment au niveau de la fratrie. Ce dépistage peut être réalisé par biologie moléculaire en étant complété par des marqueurs biochimiques (103). Une vigilance particulière doit être appliquée en cas de nouvelles naissances lorsqu'une atteinte dans la fratrie est connue : des précautions doivent être prises d'emblée dès la naissance. En effet, même si le dépistage néonatal existe, une décompensation peut avoir lieu entre la naissance et les résultats du dépistage (33).

2.9. Pronostic

La gravité du déficit en MCAD s'explique par le risque de décès de 20-25% lors d'une décompensation chez un patient non diagnostiqué (48,118). En outre, le risque de séquelles neurologiques, même s'il n'est pas complètement démontré, ne doit pas être écarté. En revanche, lorsque le diagnostic est posé et un traitement préventif est mis en place, le pronostic est très bon avec un risque de décès qui diminue significativement. Ceci explique l'importance du dépistage néonatal du déficit en MCAD (103,119,128–131,120–127).

Chapitre 3 : Le dépistage néonatal

3.1. Historique

L'histoire du dépistage néonatal commence en 1963, lorsque Robert Guthrie, bactériologiste américain motivé par sa propre expérience personnelle familiale avec la phénylcétonurie, publie une technique de dépistage de cette maladie handicapante. Il se base sur le principe que la croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* est inhibée par la β -thienylalanine mais que la phénylalanine lève cette inhibition. Il suffit donc d'une tache de sang recueillie sur papier filtre, dont une pastille est déposée sur une géloseensemencée avec du *Bacillus subtilis* et d'observer 24 heures plus tard la pousse bactérienne pour détecter les patients malades. Ainsi est né le test de Guthrie. Il a été implémenté rapidement dans les pays développés puis le progrès technologique a permis de mettre au point des dosages plus quantitatifs par fluorimétrie, par chromatographie liquide ou par colorimétrie. Ce progrès a également permis le dépistage d'autres pathologies. Le type de prélèvement est cependant resté universel du fait du faible volume de sang requis idéal pour un nouveau-né, le nombre important d'analytes différents pouvant être dosés et leur stabilité dans cette matrice (132).

Tableau 1. Les avantages du papier buvard

Avantages (Hirtz et al, 2015 (133))

Mode de prélèvement	<ul style="list-style-type: none">• Facile à réaliser• Volume faible : 50 μL de sang par disque soit 250 μL au total• Peut être réalisé à domicile : intéressant pour les accouchements à domicile
Risque infectieux	<ul style="list-style-type: none">• Le séchage de la goutte de sang entraîne l'inactivation des virus (CMV, VHC, VIH, HTLV) permettant de réduire le risque infectieux
Identification de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none">• Simple : directement sur le papier buvard
Stabilité	<ul style="list-style-type: none">• Nombreux analytes stables à température ambiante permettant le transport par courrier (possibilité d'éloignement géographique entre le site de prélèvement et le laboratoire d'analyse)• Conservation post-analytique facilitée par la stabilité et le faible espace requis par prélèvement
Analyses	<ul style="list-style-type: none">• Possibilité d'analyse de nombreux analytes : acides nucléiques, protéines, lipides, petites molécules organiques et non organiques

En France, le dépistage néonatal voit ses débuts en 1972, lorsque la recherche de la phénylcétonurie sur le test de Guthrie est mise en place. Le dépistage néonatal devient un programme national en 1978 mené par l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) qui organise, coordonne et réalise le suivi du

programme. Son financement est assuré par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS). Afin d'optimiser la coordination à une échelle plus locale, le dépistage est organisé dans chaque région par une association régionale : l'ARDPHE (Association Régionale de Dépistage et de Prévention des Handicaps de l'Enfant). Au fur et à mesure des années, les autres maladies sont ajoutées au panel : l'hypothyroïdie congénitale avec le dosage de la TSH (thyroid stimulating hormone) en 1978, la drépanocytose chez les enfants à risque par électrophorèse de l'hémoglobine en 1989, l'hyperplasie congénitale des surrénales avec le dosage de la 17OHP (17-hydroxyprogesterone) en 1995 et la mucoviscidose avec le dosage de l'IRT (trypsine immuno-réactive) en 2002 (134).

Le dépistage néonatal est défini par le Code de la santé publique (l'article R1131-21 modifié par le décret n°2008-321 du 4 avril 2008) comme étant un programme de santé national. La liste des maladies dépistées était initialement fixée par l'arrêté du 22 janvier 2010. Suite aux recommandations de l'HAS en 2011 pour l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD par spectrométrie de masse (31), il a fallu réorganiser le dépistage en France afin de mettre en place dans les laboratoires de dépistage des spectromètres de masse en tandem (MS/MS). En effet, l'investissement dans cette technologie (en coût économique et en ressources humaines) n'est justifié que pour le dépistage d'un minimum de 50 000 nouveau-nés par an par MS/MS (31). Sur 22 laboratoires de dépistage néonatal en France, 4 analysaient plus de 50 000 buvards par an et 7 en réalisaient moins de 20 000 (31). En conséquence, l'arrêté du 22 février 2018 a ordonné une restructuration du dépistage, en diminuant notamment le nombre de laboratoires de dépistage en France afin d'obtenir un CRDN par région (voir **Figure 15**). Les ARDPHE ont été dissoutes pour donner place aux CRDN et l'AFDPHE a laissé place au Centre National de Coordination du Dépistage Néonatal (CNCDN) à Tours. Cette nouvelle organisation est décrite dans la **Figure 14**. Dans la région Auvergne-Rhône-Alpes, le nombre de naissances est suffisant pour justifier la persistance de 2 antennes pour un CRDN (dont le siège est à Lyon) : une aux Hospices Civils de Lyon (HCL) et une au CHU Grenoble Alpes (CHUGA). L'acquisition de ces appareils MS/MS permet d'ajouter le dépistage du déficit en MCAD, mais elle ouvre également la porte à l'extension du dépistage de nombreuses autres maladies du métabolisme intermédiaire.

Figure 14 : Nouvelle organisation du dépistage néonatal en France depuis 2018

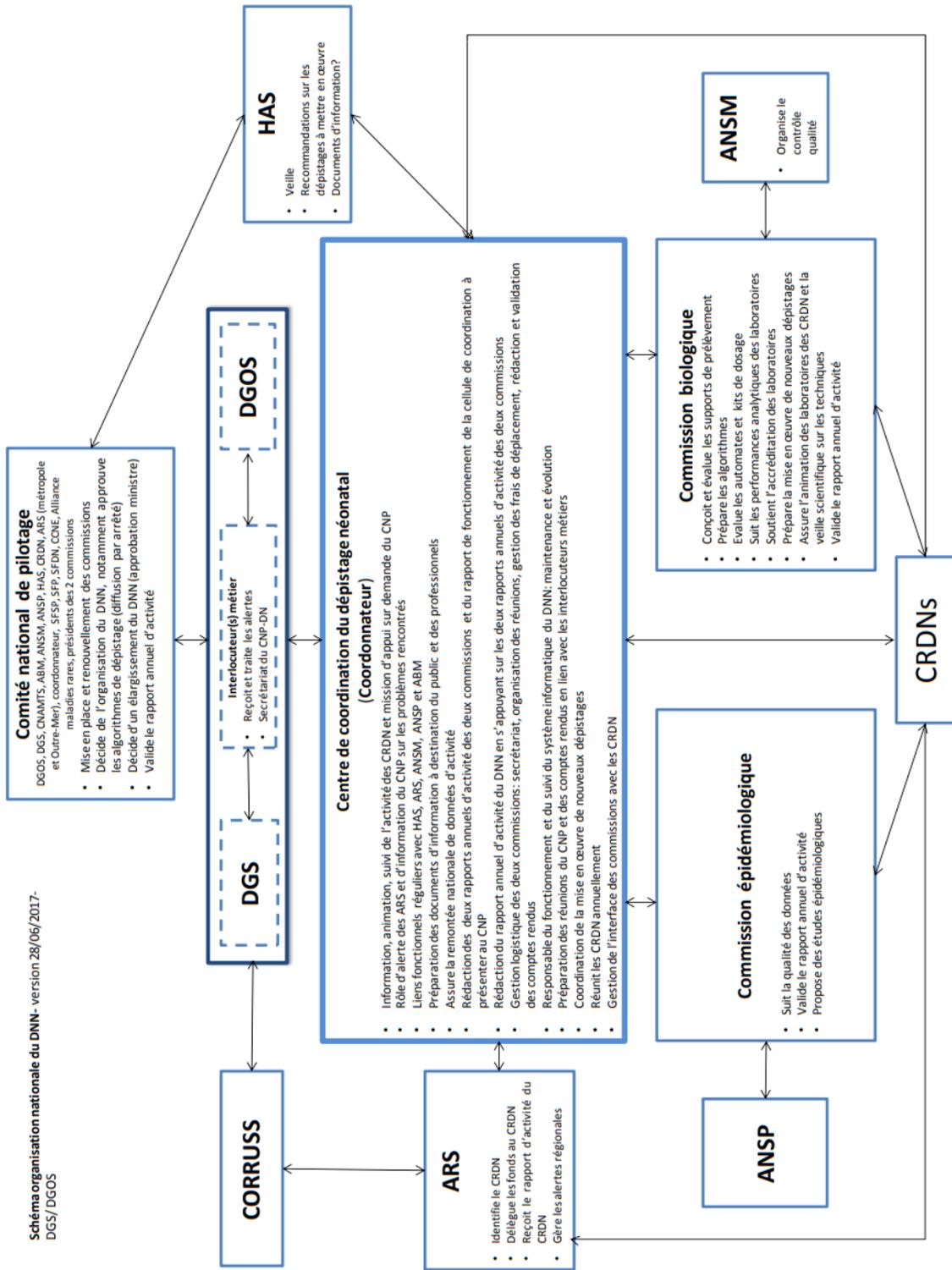
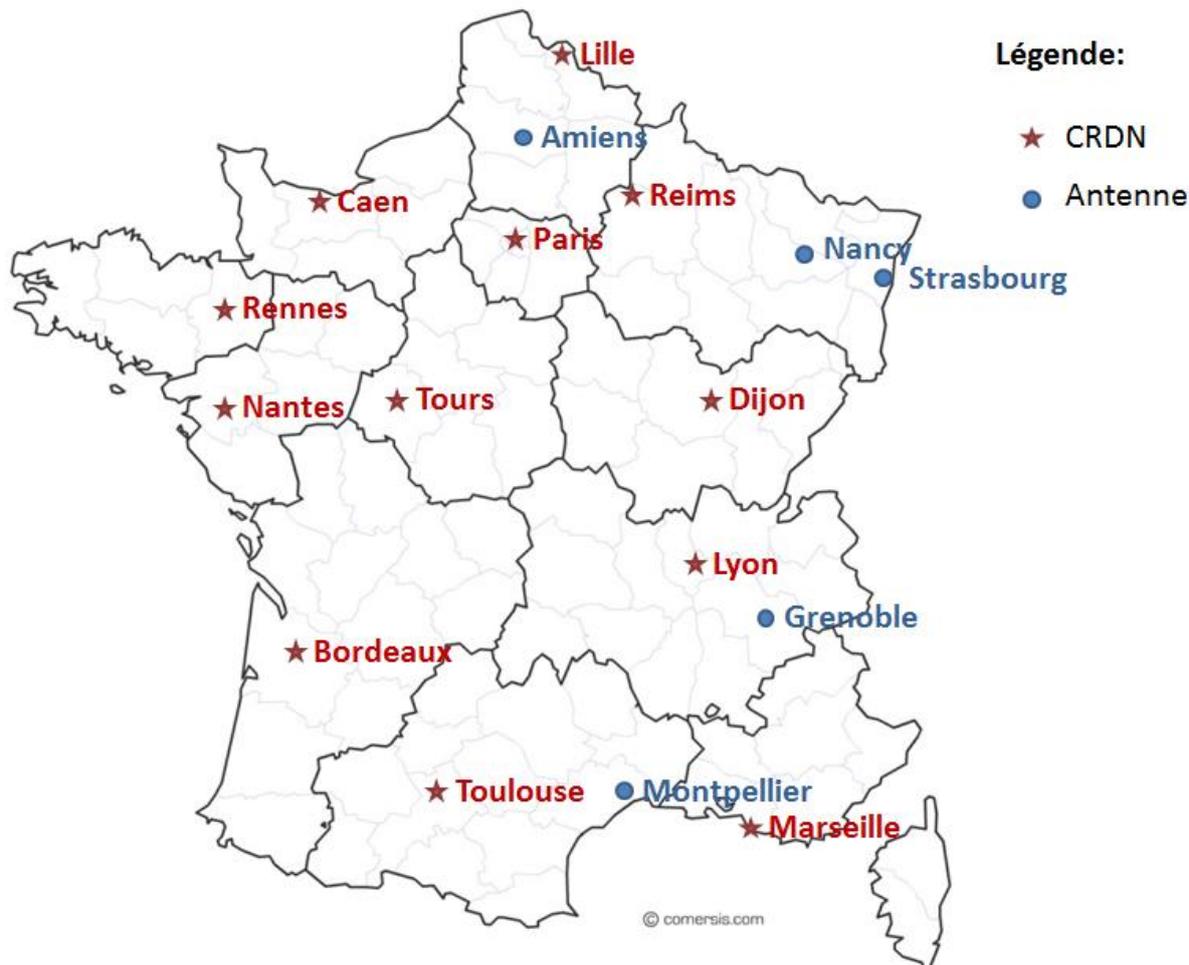


Figure 15 : Carte des centres de dépistage néonatal en France



3.2. L'organisation du dépistage néonatal en France

3.2.1. Le pré-analytique

Les professionnels de santé ont l'obligation de proposer le dépistage néonatal aux parents de chaque nouveau-né. Son déroulé et son intérêt doivent être expliqués aux parents afin de recueillir leur consentement. Un accord oral est suffisant pour procéder au dépistage ; cependant, dans le cadre du dépistage de la mucoviscidose, un test de deuxième intention par biologie moléculaire peut être nécessaire en cas de premier résultat anormal ce qui nécessite un consentement écrit. C'est pourquoi un consentement écrit est systématiquement demandé au verso du papier buvard.

Les parents peuvent refuser le dépistage de leur enfant, auquel cas une trace écrite de ce refus doit être conservée. En effet, les CRDN sont tenus d'assurer l'exhaustivité du dépistage en vérifiant que toutes les naissances déclarées ont fait l'objet d'un dépistage ou d'un refus des

parents. Les laboratoires doivent donc travailler en collaboration étroite avec les réseaux de santé en périnatalité, les maternités, les services de néonatalogie et les sages-femmes chargées du suivi des suites de couches à domicile (1,135).

Le dépistage est réalisé sur un test de Guthrie : le nouveau-né est piqué au niveau du talon afin de récupérer quelques gouttes de sang capillaire sur un papier buvard préalablement identifié avec toutes les données démographiques qui le concernent. Il est également possible d'utiliser du sang veineux, déposé sur le buvard à partir d'une seringue ou d'un embout de cathéter. Les taches sont séchées environ 2h à l'abri d'une source de chaleur comme le soleil, un radiateur ou une lampe à infrarouge (1).

Figure 16 : Buvard recto-verso, version 2020



Ne pas toucher la surface de dépôt de l'échantillon. Assurez-vous que le sang a bien traversé.

CODE MATERNITÉ

ENFANT N-NÉ À RISQUE DE DRÉPANOCYTOSE: Oui Non

NOM :
(Patronyme déclaré à l'état civil) :

Prénom : _____ Sexe : M F

Nom de naiss. de la mère : _____

Né(e) le : _____ à : _____ h _____ min

Poids : _____ g Terme : _____ SA + _____ jours

Maternité naissance : _____

Accouchement à domicile

Grossesse multiple Si oui, Rang de naissance : /

PRÉLÈVEMENT INITIAL 2° PRÉLÈVEMENT

Prélevé le : _____ à : _____ h _____ min

Nom Préleveur : _____

Lieu prélèvement : Maternité de Domicile Autre

si autre Lieu / Code :

Transfusion globules rouges Date : _____

N° NAISSANCE ANNUEL

VÉRIFICATION AUDITION

N-né à risque de surdité. Si OUI, précisez : _____

1 ^{er} test		Re-test	
Date: _____	Date: _____		
Lieu: _____	Lieu: _____		
OEA <input type="checkbox"/>	PEA <input type="checkbox"/>	OEA <input type="checkbox"/>	PEA <input type="checkbox"/>
Normal	À surveiller	Normal	À surveiller
OD <input type="checkbox"/>	OG <input type="checkbox"/>	OD <input type="checkbox"/>	OG <input type="checkbox"/>

Rendez-vous le : _____

Lieu: _____

Avec : _____

Tél : _____

Le dépistage auditif n'a pas pu être réalisé car: _____

PARENTS

Adresse des parents: _____

CP: Ville: _____

Tél (1): _____ Tél (2): _____

Email: _____

Médecin déclaré CPAM: _____

Ville: _____

CONSENTEMENT PARENTAL MUCOVISCIDOSE

Après avoir été informés, nous soussignés, (noms, prénoms): _____

Mère , Père de l'enfant: _____

Né(e) le (date de naissance de l'enfant): _____

Autorisons N'autorisons pas les médecins responsables du dépistage à réaliser, si nécessaire, un test génétique pour le dépistage de la mucoviscidose.

Fait le: _____ Signature(s) obligatoires(s)

INFORMATIONS MÉDICALES

Perfusion d'acides aminés

Surcharge iodée

Autres facteurs de risques

Précisez : _____

Pour Drépanocytose (si connu) :

Type Hb _____

Mère _____

Père _____

Cadre réservé CRDN

SN 1900000001

CNCND
CHRU de Tours
2 Bd Tonnellé
37044 TOURS cedex 9
Téléphone : 02 47 47 80 97

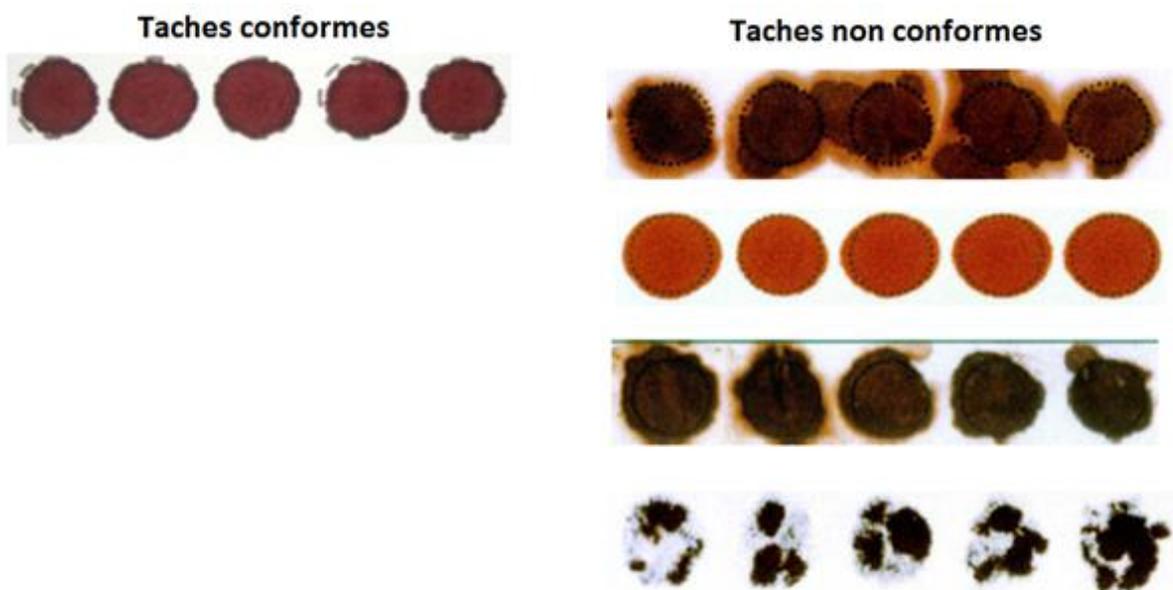
En France, le prélèvement est effectué au troisième jour de vie (J3), mais peut éventuellement être réalisé au plus tôt, à partir de la 48^e heure, si un départ précoce de la

maternité est prévu. Ce délai n'a pas été choisi arbitrairement, il permet de respecter l'intervalle libre pour la phénylcétonurie, c'est-à-dire le temps d'accumuler suffisamment de phénylalanine pour être détectable afin d'éviter les faux négatifs. Les seuils de positivité pour les autres pathologies ont par ailleurs été déterminés pour des prélèvements réalisés à 48-72h de vie. A l'opposé, si le prélèvement est réalisé au-delà de 120h de vie, le rendu de résultat devient trop tardif : il s'agit une perte de chance pour le nouveau-né. Pour le déficit en MCAD, la concentration d'octanoylcarnitine sanguine, l'analyte dosé pour réaliser le dépistage, diminue d'un facteur 3 entre le 1-2^e jour et 6-10^e jour de vie (36).

Le buvard peut par la suite être envoyé par voie postale ou par coursier vers un centre de dépistage. Malgré la stabilité de la plupart des analytes sur papier buvard à température ambiante, l'envoi du prélèvement ne doit pas tarder afin de pouvoir prendre en charge rapidement tout enfant malade.

A l'arrivée au laboratoire, la qualité du prélèvement doit être vérifiée. En effet, la tache doit être conforme (taille suffisante, visible des 2 côtés du buvard, sans souillure, etc. Voir **Figure 17**) pour pouvoir réaliser l'analyse.

Figure 17 : Images de prélèvements conformes et non conformes
(procédure « Non-conformités des buvards du dépistage Néonatal » du CHUGA)

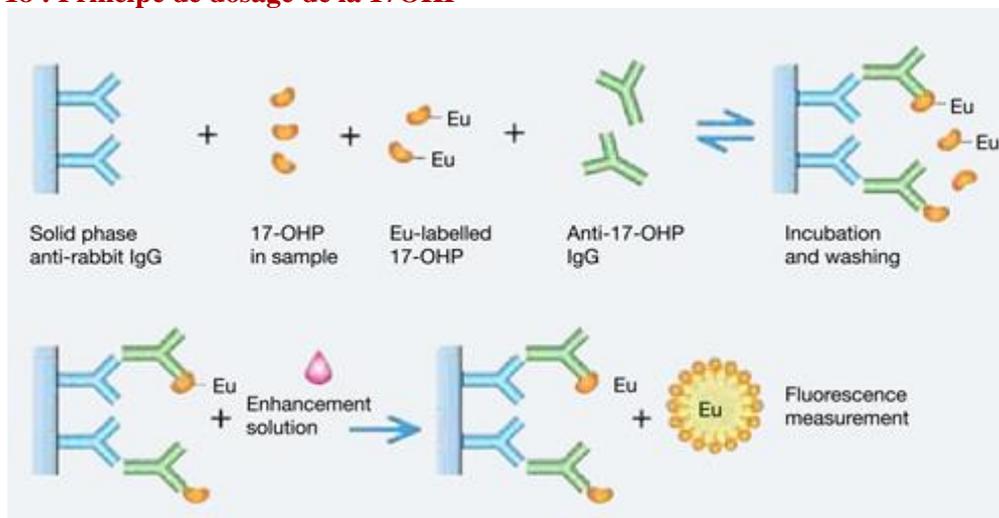


3.2.2. L'analytique

Des pastilles de taille paramétrée sont découpées des taches de sang pour être analysées en microplaque. Selon la maladie recherchée, différentes techniques peuvent être utilisées : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales et la

mucoviscidose peuvent être dépistées par technique immunofluorimétrique (fluorimétrie manuelle ou méthode DELFIA® à fluorescence en temps retardé) ou par technique radio-immunologique pour certaines maladies. Le principe de la fluorescence à temps retardé est décrit dans la **Figure 18** pour la 17OHP. Les analyses peuvent être réalisées manuellement ou sur des analyseurs automatisés comme le GSP® ou l'AutoDELFIATM de PerkinElmer. En cas de résultat anormal pour la mucoviscidose, l'analyse des mutations sur le gène *CFTR* est réalisée en test de 2^e intention. Enfin, plusieurs techniques permettent le dépistage de la drépanocytose pour rechercher l'hémoglobine S par électrophorèse de l'hémoglobine : l'HPLC par échange de cations, l'électrophorèse capillaire de zone et la spectrométrie de masse MALDI-TOF (1).

Figure 18 : Principe de dosage de la 17OHP



Le dosage de 17OHP DELFIA est une méthode compétitive utilisant de la 17OHP liée à l'euporium et des anticorps 17OHP-spécifiques. Site de PerkinElmer.

3.2.3. Le post-analytique

La Commission Biologie du CNCND détermine le seuil d'action pour chaque analyse ainsi que les conduites à tenir associées. Le seuil d'action correspond au seuil à partir duquel un résultat est considéré anormal. Chaque laboratoire va ensuite définir au niveau local un seuil d'alerte (ou seuil de retest) pour chaque analyte, seuil déterminé par l'incertitude de mesure de la méthode, qui déclenche un contrôle du résultat sur le même buvard. Le but ultime est de bannir les faux-négatifs et de limiter dans la mesure du possible les faux-positifs qui peuvent être source de stress pour la famille (136). Lorsqu'un résultat est supérieur au seuil d'alerte, le prélèvement est quantifié une 2^e fois en double afin de confirmer le 1^{er} résultat. L'écart dans le doublet est validé s'il est inférieur à 2,8 fois l'écart-type de la répétabilité. L'écart entre le

doublet et le test initial est validé s'il est inférieur à 2,8 fois l'écart-type de la fidélité intermédiaire.

Dans la région Auvergne-Rhône-Alpes, le logiciel Dépistar est utilisé pour la validation biologique. Les résultats physiologiques ne sont rendus ni au médecin ni aux parents mais sont disponibles sur demande. Cependant, dès lors qu'un résultat est anormal, le médecin référent régional pour la maladie en question est prévenu au plus vite afin de décider si un deuxième prélèvement de contrôle doit être réalisé ou s'il faut d'emblée réaliser des tests de confirmation diagnostique. Le centre de dépistage doit donc travailler en concertation avec les pédiatres référents et les centres de référence des maladies dépistées afin de pouvoir réaliser une prise en charge rapide et efficace. Le délai de rendu de résultats est un élément critique car il détermine l'âge de prise en charge de l'enfant. Il faut tenir compte de l'âge au prélèvement (en principe 3 jours), du délai d'acheminement (en moyenne 2 jours) et du délai de réalisation de l'analyse et de sa confirmation (2 jours).

Les papiers buvards sont ensuite stockés pendant au moins un an à +4°C avec un dessiccant. Ces buvards ne peuvent pas être utilisés pour d'autres dépistages ou diagnostics ni pour de la recherche sans un consentement écrit des parents (1).

3.2.4. Exigences de qualité

La qualité du résultat est assurée par l'obligation d'accréditation des laboratoires de biologie médicale, exigé par l'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010. Cette accréditation s'appuie sur la norme NF EN ISO 15189 version 2012 qui décrit les exigences adaptées aux laboratoires de biologie médicale (LBM) qui peuvent s'aider de documents de référence comme le SH REF 08 (Expression et évaluation des portées d'accréditation) et le SH REF 02 (Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870). Par ailleurs, un groupe de travail qualité de l'AFDPHE a rédigé en 2015 un « Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal », permettant d'homogénéiser les pratiques et cibler spécifiquement les problématiques liées au dépistage néonatal (137).

3.3. Détermination des pathologies à dépister

Étant donné le nombre de maladies métaboliques et endocrines potentiellement dépistables, sur quels critères les maladies dépistées sont-elles sélectionnées ? En France, comme dans de nombreux autres pays, les critères de Wilson et Jungner établis dans les années 1970 permettent de cribler les pathologies candidates au dépistage. En résumé, il s'agit des critères suivants (138) :

- La maladie est un problème de santé publique.
- L'histoire de la maladie est comprise.
- La maladie est sensible à un traitement efficace avec des protocoles thérapeutiques précis.
- Le dépistage est effectué à un stade pré-symptomatique.
- Le marqueur de dépistage est fiable avec :
 - o Sensibilité
 - o Spécificité
 - o Technicité robuste
- La maladie est acceptée de la population générale.
- La balance coût-bénéfice est positive.
- Le financement est pérenne.
- L'organisation du diagnostic et du traitement des malades est définie.

En France, l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES) a élaboré des critères d'évaluation *a priori* pour un programme de dépistage en général en 2004 (voir Annexe 2). Ceux-ci se basent sur les critères de Wilson et Jungner en ajoutant des points supplémentaires plus adaptés au contexte de santé publique spécifique à la France. Un total de 16 critères ont été rédigés concernant les aspects suivants : la maladie, le test, le diagnostic, l'intervention, l'efficacité et la sécurité du programme de dépistage, l'évaluation médico-économique du dépistage, l'organisation du dépistage et le suivi et l'évaluation du programme de dépistage. En plus des critères de Wilson et Jungner, on peut retrouver par exemple l'apport de preuve d'efficacité du programme de dépistage concernant la mortalité ou la morbidité, l'intervention de l'assurance qualité et le versant éthique vis-à-vis de l'information et le droit de refus de la population. La HAS a utilisé en 2011 ces critères pour évaluer l'intérêt du dépistage de la MCAD.

Au final, la rédaction des recommandations pour l'extension du dépistage est réalisée par un groupe de travail multidisciplinaire qui se base sur une revue extensive de la littérature et des réunions de concertation. Un groupe de relecture participe à la finalisation du texte et la validation finale est livrée par le Collège de la HAS (139).

Chapitre 4 : Le dépistage néonatal du déficit en MCAD

Après avoir défini le déficit en MCAD et le dépistage néonatal, il est clair que cette pathologie est un excellent candidat au dépistage (31) : les patients sont asymptomatiques à la naissance, mais les conséquences cliniques peuvent être graves voire fatales alors qu'un traitement préventif efficace existe. Par ailleurs les recommandations de la HAS en 2011 prédisent un réel impact médico-économique du dépistage en permettant d'éviter chaque année 5 décès chez des enfants de moins de 5 ans et avec la diminution de l'occurrence de séquelles neurologiques. La HAS a également évalué le rapport coût-efficacité incrémental par année de vie gagnée ajustée à la qualité (estimé à 7 600 € par QALY [Quality-Adjusted Life Year]) qui est jugé favorable (31).

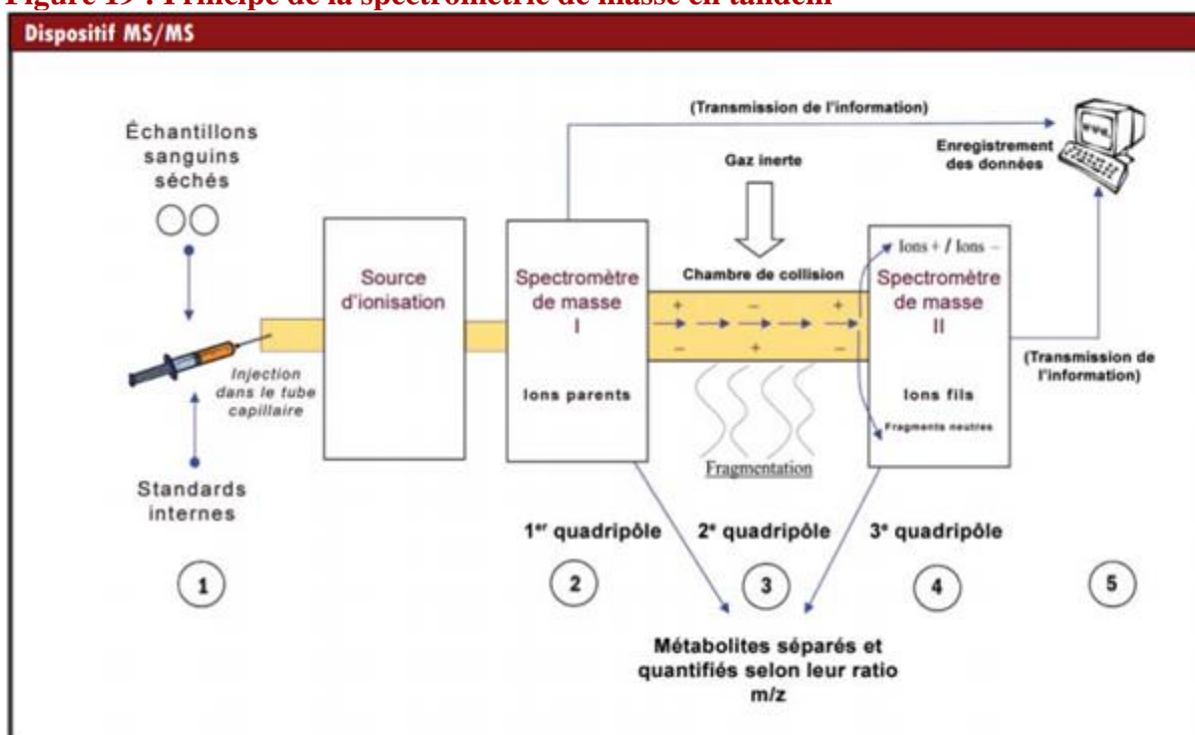
4.1. La technique

Plusieurs approches pourraient permettre le dépistage néonatal du déficit en MCAD. L'analyse de l'activité enzymatique n'est pas adaptée, car elle nécessite du tissu ou des cellules et n'est pas envisageable sur un grand nombre de prélèvements comme c'est le cas dans le dépistage néonatal. La recherche de métabolites urinaires (acides dicarboxyliques, acylglycines et conjugués à la carnitine) par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse n'est pas suffisamment sensible car l'excrétion n'est significative que lors d'une décompensation métabolique. La mutation principale c.985A>G n'étant retrouvée que chez une partie des patients et au vu des délais importants de rendu de résultats de biologie moléculaire, la piste génétique n'est pas non plus une solution. En revanche, l'analyse des acylcarnitines par spectrométrie de masse en tandem en ESI-MS/MS (electrospray ionisation) est une technique rapide, automatisable, de bonne sensibilité et de bonne spécificité. En outre, il s'agit d'une technique qui permet simultanément sur une même pastille de sang de dépister de nombreuses pathologies différentes en dosant les acylcarnitines et les acides aminés, c'est pourquoi la spectrométrie de masse en tandem a été une idée révolutionnaire dans les années 1990s dans le monde du dépistage néonatal. La phénylcétonurie pourrait donc être dépistée par le dosage de la phénylalanine en MS/MS sur la même pastille que pour le déficit en MCAD. En conséquence, l'extension du dépistage néonatal ne requiert pas d'augmenter le volume de sang prélevé (41).

La spectrométrie de masse en tandem permet de séparer et identifier des métabolites en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Une fois le prélèvement injecté dans l'appareil, les métabolites sont ionisés et transférés sous forme gazeuse. Ces ions sont sélectionnés par le premier spectromètre de masse grâce à un champ électromagnétique puis passent dans une

chambre de collision qui les fragmente en ions fils. Ces fragments traversent un deuxième spectromètre de masse et arrivent à un point différent du détecteur en fonction de leur rapport m/z . Ce détecteur traduit ce signal en un signal informatique permettant de dessiner un spectre de masse avec en abscisse les ratios m/z et en ordonnée la quantité des ions. Plusieurs modes analytiques sont possibles selon la quantité d'information que l'on souhaite obtenir : en mode « balayage », les métabolites de plusieurs familles différentes peuvent être recherchés tandis qu'en « selected reaction monitoring » SRM ou en « multiple reaction monitoring » MRM, des ions spécifiques sont recherchés (139–141).

Figure 19 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem



Adapté de Banta-Wright et Steiner, 2004; Fearing et Levy, 2003; et Clarke, 2002.

D'après Makni et al, 2007 (141)

Dans le cadre plus spécifique du déficit en MCAD, l'analyse en MS/MS par MRM permet de doser les différentes acylcarnitines. L'utilisation du mode MRM permet une plus grande sensibilité, en sélectionnant spécifiquement les transitions des ions parents et fils qui nous intéressent. Le temps analytique par échantillon est rapide (de l'ordre de 2 minutes), critère essentiel pour le dépistage néonatal où le nombre d'échantillons est souvent très important. Les autres avantages de cette technique sont sa grande sensibilité, sa précision, la possibilité d'avoir une approche quantitative grâce à l'utilisation de standards internes et la possibilité d'analyser plusieurs métabolites simultanément sur une même pastille de sang séché (139).

4.2. Les marqueurs et détermination du seuil

Un profil des acylcarnitines permet de détecter de nombreuses anomalies de la β -oxydation des AG. Dans le cadre du dépistage du déficit en MCAD, il n'y a pas d'intérêt à lire le profil entier mais plutôt de cibler les marqueurs d'intérêt. Quatre acylcarnitines sont augmentées dans le déficit en MCAD : l'hexanoyl- (C_6), l'octanoyl- (C_8), la decenoyl- ($C_{10:1}$) et la decanoylcarnitine (C_{10}). Comme il a été vu dans le Chapitre 2, l'octanoylcarnitine est l'acylcarnitine la plus augmentée, ce qui en fait un marqueur principal. Le consensus en France est de doser uniquement le C_8 puis en cas de résultat anormal, de retester le C_8 en dosant également le C_{10} , afin de calculer le rapport C_8/C_{10} . Les facteurs pouvant donner des faux positifs sont le portage à l'état hétérozygote de la mutation c.985A>G, le traitement par valproate ou par triglycérides à chaîne moyenne, la prématurité ou un faible poids à la naissance. A l'inverse, parmi les causes de faux négatifs, on peut retrouver la carence en carnitine ou le prélèvement tardif, au-delà du 8^e jour de vie, il est donc impératif de ne pas retarder le prélèvement du buvard (30,142,143).

D'autres paramètres peuvent également être pris en compte comme les ratios entre acylcarnitines : C_8/C_0 , C_8/C_{10} , C_8/C_2 ou C_8/C_{12} . Les ratios sont moins sensibles aux facteurs de variabilité : par exemple le rapport C_8/C_{10} reste élevé même à distance de la naissance. Il s'agit d'un indicateur intéressant pour les prélèvements de contrôle. Par ailleurs, les rapports sont des outils utiles pour différencier les formes modérées des formes sévères (76,86,95).

Après avoir choisi les marqueurs, il faut déterminer des seuils de positivité. L'enjeu est majeur car les faux négatifs sont à proscrire tandis que les faux positifs doivent être limités afin d'éviter un stress inutile et nuisible pour les parents. Les seuils du C_8 selon les pays peuvent varier de 0,3 à 1,5 $\mu\text{mol/L}$ avec généralement des seuils plutôt situés entre 0,5 et 1,0 μM . En France, en premier lieu, le seuil est établi à 0,2 $\mu\text{mol/L}$.

Les taux élevés de C_8 (>10 $\mu\text{mol/L}$) ne sont généralement retrouvés que lorsque l'activité enzymatique est inférieure à 2% chez les patients homozygotes c.985A>G. Les hétérozygotes composites ayant la mutation c.985A>G sont les 2^e plus élevés (médiane 4,9-8,6 $\mu\text{mol/L}$ avec une étendue de 3-37 $\mu\text{mol/L}$). Les hétérozygotes composites c.985A>G / c.199T>C ont des concentrations moyennes basses (1,2-4,9 $\mu\text{mol/L}$) et les patients sans la mutation c.985A>G ont les concentrations les plus basses (95,128,144,145). Une étude multicentrique réalisée aux Etats-Unis a montré qu'il n'y a pas de différence significative de la concentration du C_8 à J3 entre les garçons et les filles, ni entre les nouveau-nés en alimentation maternelle exclusive et les nouveau-nés dont l'alimentation comportait du lait artificiel, de la

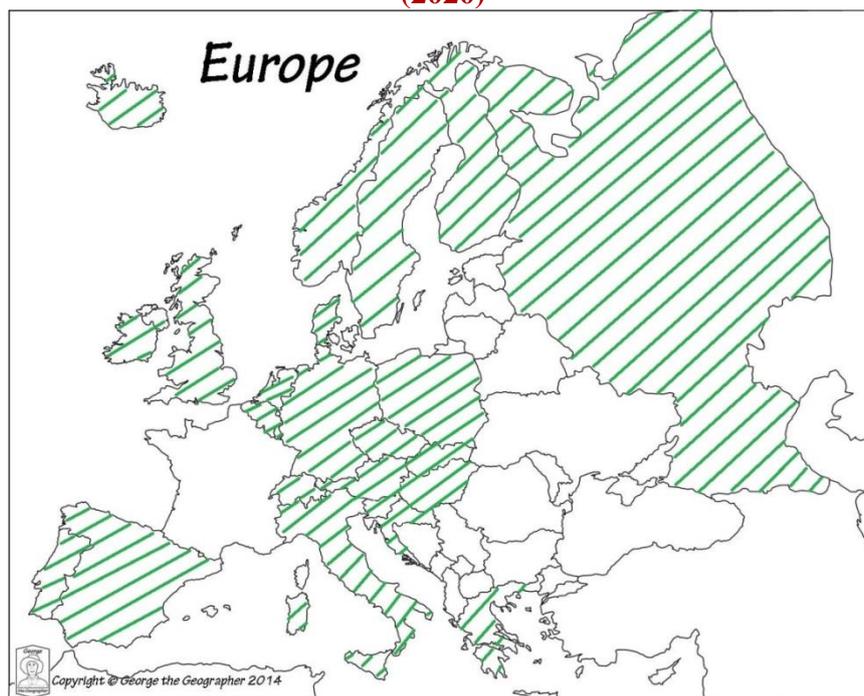
nutrition parentérale ou des intralipides. Une concentration significativement plus élevée de C_8 était retrouvée chez les sujets qui ont présenté des symptômes néonataux (146).

4.3. Dépistage néonatal du déficit en MCAD dans d'autres pays

Le dépistage néonatal du déficit en MCAD n'est pas une nouveauté. Plusieurs pays se sont dotés de spectromètres de masse en tandem afin de réaliser ce dépistage depuis les années 1990s, nous permettant d'avoir un certain recul sur sa mise en place et sur son intérêt. La **Figure 20** montre les pays d'Europe ayant déjà mis en place ce dépistage en début 2020 et notamment le retard de la France vis-à-vis de l'Europe dans ce domaine.

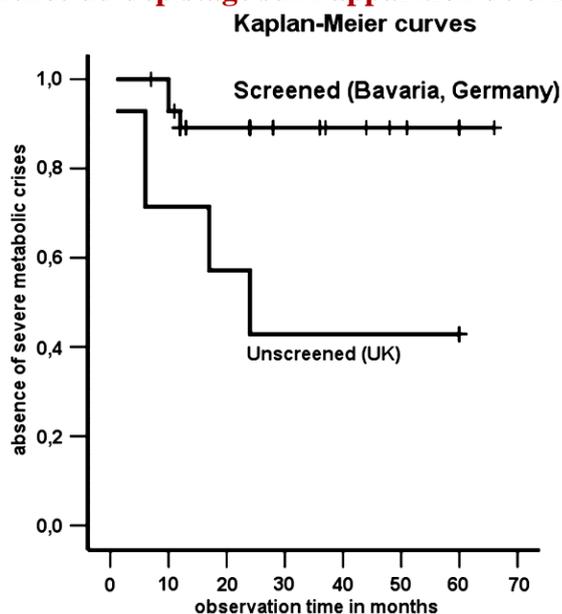
Le retour d'expérience dans ces pays met en évidence une bonne spécificité et une robustesse de l'analyse. De plus, de nombreuses études médico-économiques ont déjà été réalisées dans ces pays, démontrant un effet bénéfique et économiquement rentable avec une réelle incidence sur la diminution d'apparition des crises métaboliques et de décès (voir **Figure 21**).

Figure 20 : Carte des pays d'Europe réalisant le dépistage néonatal du déficit en MCAD (2020)



Les pays rayés réalisent le dépistage néonatal du déficit en MCAD en début 2020.

Figure 21 : Incidence du dépistage sur l'apparition de crises métaboliques



Cette courbe de Kaplan-Meier met en évidence une meilleure survie à 60 mois chez des patients dépistés versus les patients non dépistés. D'après Nennstiel-Ratzel et al, 2005 (130).

Il persiste tout de même des cas de décès malgré le dépistage : ils sont liés à des décompensations métaboliques qui ont eu lieu avant le retour des résultats du dépistage ou lorsque le diagnostic était posé, les premiers signes de décompensation n'ont pas été reconnus et traités à temps (120,121,130,131,122–129). Dans une cohorte de 111 bébés dépistés et diagnostiqués aux Etats-Unis, un taux de mortalité de 3,5% était retrouvé (119). Dans une étude réalisée par Ahrens-Nicklas et al (107) sur des nouveau-nés dépistés en Pennsylvanie, 23,9% des 46 nouveau-nés qui ont été dépistés puis diagnostiqués avec un déficit en MCAD ont présenté des signes de décompensation métabolique et 8,7% sont décédés ou ont eu un épisode d'arrêt cardiaque avant ou en même temps que l'obtention du résultat du dépistage. Les nouveau-nés qui étaient symptomatiques étaient tous homozygotes pour la mutation c.985A>G et allaités au lait maternel (3,107,145,147,148). Les données sur la morbidité à long terme restent insuffisantes.

Dans le **Tableau 2** sont résumés les résultats du dépistage néonatal dans d'autres pays. Toutes ces publications déclarent ne pas avoir de faux négatif en se basant sur le suivi à plus ou moins long terme des enfants dépistés.

Tableau 2 : Résultat du dépistage néonatal du déficit en MCAD

Pays	Prélèvement	Seuil C8 (µmol/L)	Autres seuils	Tests de confirmation	Incidence	VPP*
Pays-Bas (149)	72-168h	≥0,5		- Profil acylcarnitines sur plasma et/ou buvard - Chromatographie des acides organiques urinaires - Activité enzymatique sur leucocytes ou lymphocytes - Génétique (séquençage)	1/8 750	75%
Pays-Bas (142)	96-168h	≥0,3		- Chromatographie des acides organiques urinaires - Profil des acylcarnitines sur buvard - Activité enzymatique sur leucocytes (<50%) - Génétique (séquençage)	1/6 600	50%
Australie (144)	48-72h	≥1,0	C8/C10>1	- Chromatographie des acides organiques urinaires - Profil des acylcarnitines plasmatique - Génétique (recherche c.985A>G)	1/17 435	57%
Australie (150)	72-144h	≥0,8 (alerte) ≥1 (action)		- Chromatographie des acides organiques urinaires - Profil des acylcarnitines sur buvard - Génétique (recherche c.985A>G) - β-oxydation sur fibroblastes	1/25 059	48%
Etats-Unis (151)	24-72h	>0,5		- Génétique (recherche c.985A>G puis séquençage)	1/18 400	20%
Etats-Unis (131)	24-120h	>0,5		C ₈ > 0,5 = demande d'un buvard de contrôle C ₈ > 0,8 = évaluation par un médecin métabolicien - Chromatographie des acides organiques urinaires - Profil des acylcarnitines plasmatique - Génétique (séquençage)	1/15 200	42%
Canada (152)	24-48h	>0,38		- Profil des acylcarnitines sur buvard	1/12 100	58%
Allemagne (153)	72-168h	>0,32	C6 > 0,21 C10:1 > 0,28 C10 > 0,48 C8/C2 > 0,02 C8/C10 > 1,6 C8/C12 > 1,6	- Activité enzymatique sur fibroblastes ou lymphocytes - Génétique - Epreuve de charge en phénylpropionate - Chromatographie des acides organiques urinaires	1/15 600	25,8%
Australie (123)	48-72h	≥1,0	C8/C10 > 1	- Profil des acylcarnitines plasmatiques - Chromatographie des acides organiques urinaires - Génétique (recherche c.985A>G)	1/19 167	42%

*VPP : valeur prédictive positive

4.4. La mise en place en France

La mise en place du dépistage du déficit en MCAD a été une longue bataille. Enclenchée par les recommandations de l'HAS en 2011, il faudra attendre 2018 avec la réorganisation du dépistage et l'allocation d'un budget de 3 millions d'euros pour l'achat des spectromètres de masse pour que le mouvement s'accélère. Le choix et l'acquisition de ces appareils se sont déroulés entre le dernier trimestre de 2019 et début 2020 et sont détaillés dans la Partie 2, chapitre 1. La volonté du Ministère des Solidarités et de la Santé était la mise en place rapide du dépistage du déficit en MCAD dès le premier trimestre 2020. Au vu de la pandémie COVID-19 qui a touché la France au printemps 2020 entravant les projets de mise en place, la date de mise en routine a été décalée au troisième trimestre 2020.

4.4.1. Techniques de confirmation diagnostique

La mise en place du dépistage néonatal du déficit en MCAD implique un bilan complémentaire de confirmation diagnostique à effectuer dès l'obtention d'un résultat positif sur le buvard du dépistage néonatal avec un profil des acylcarnitines plasmatique et une chromatographie des acides organiques urinaires. L'interprétation du profil des acylcarnitines doit prendre en compte la potentielle normalisation du C₈ à distance de la naissance et en dehors d'un épisode métabolique. De plus, il faut noter que la sensibilité de la chromatographie des acides organiques urinaires est faible notamment lorsque la concentration de C₈ initiale est inférieure à 15 µmol/L. Une confirmation par dosage de l'activité enzymatique et par la biologie moléculaire peut être réalisée (103).

En outre des tests de confirmation, une étude réalisée en 2018 au Canada met en évidence l'intérêt du dosage des acylglycines sur papier buvard comme test de deuxième intention afin d'accroître la spécificité du dépistage. Sur 3 patients atteints du déficit en MCAD, l'hexanoylglycine, la subérylglycine et l'octanoylglycine étaient systématiquement augmentées. La robustesse d'une étude sur 3 patients est bien sûr insuffisante, il reste cependant intéressant de suivre les avancées dans cette piste (85).

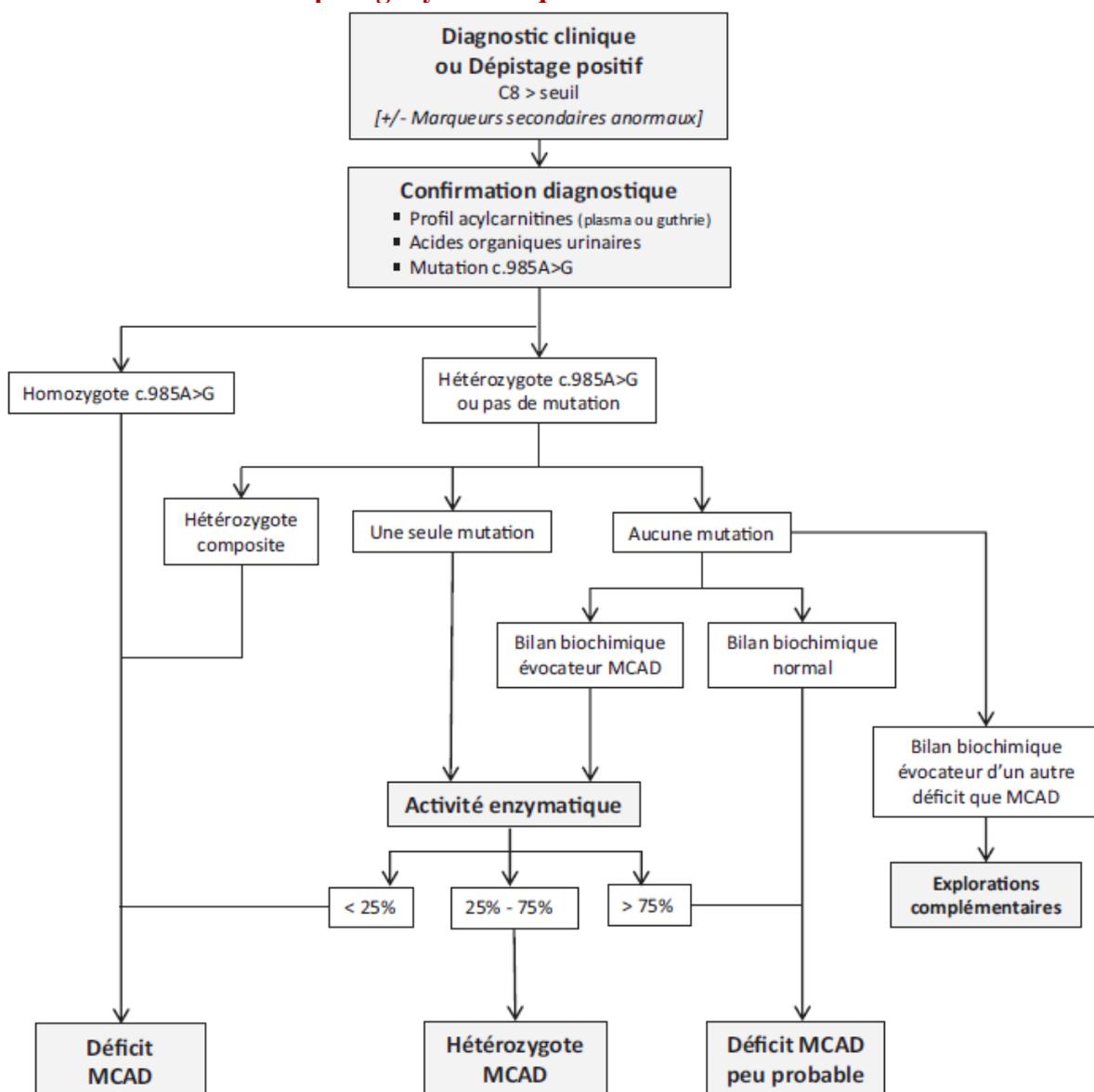
Au niveau génétique, 2 approches peuvent être appliquées :

- Soit la recherche monogénique ciblée chez les patients d'origine européenne du nord :
 - o c.985A>G (p.Lys329Glu)
 - o c.199T>C (p.Tyr67His)
- Soit la réalisation d'un panel multigénique incluant le gène *ACADM* ou par une approche génomique avec un séquençage d'exome (77).

Le diagnostic génétique ciblé est plus simple et moins coûteux mais n'est pas exhaustif. Selon Maier et al., si le diagnostic en Allemagne ne comprenait que le génotypage des 2 mutations fréquentes c.985A>G et c.199T>C, seuls 58% des cas de déficit en MCAD seraient mis en évidence (94).

En France, l'algorithme de confirmation diagnostique est encore en discussion par la filière G2M – Maladies Héritaires du Métabolisme. Il pourrait être basé sur l'analyse des marqueurs biochimiques (profil des acylcarnitines plasmatiques et acides organiques urinaires) ainsi que la recherche de la mutation c.985A>G. Un profil typique ainsi qu'une homozygotie de la mutation permettrait de confirmer le diagnostic (4).

Figure 22 : Algorithme du diagnostic du déficit en MCAD en France proposé en 2012, avant l'introduction du dépistage systématique



D'après Feillet et al., 2012 (4)

4.4.2. Prise en charge

La mise en place du dépistage du déficit en MCAD seule ne suffit pas, il est impératif qu'en aval il y ait une prise en charge adaptée par un médecin référent pour cette pathologie. Il existe un consensus français rédigé sous l'égide de la Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme (SFEIM) en 2012 concernant la confirmation diagnostique et la prise en charge (4). En premier lieu, dès l'obtention du résultat positif du dépistage, l'enfant et les parents doivent être rapidement convoqués afin de les informer sur la maladie et sur les mesures préventives et de surveillance à mettre en place dans l'immédiat. Par ailleurs, un document expliquant la maladie doit être remis aux parents, leur permettant d'avoir un accès priorisé aux urgences. A l'occasion de cette première consultation, les prélèvements pour la confirmation diagnostique sont recueillis. Si le diagnostic est confirmé, un certificat de la maladie avec les conduites à tenir doit être ajouté au carnet de santé, afin d'informer tout professionnel de santé en contact avec l'enfant. Par la suite, au fur et à mesure de la croissance de l'enfant, le temps de jeûne acceptable peut devenir progressivement plus souple (60,103,148).

Ces patients doivent avoir un suivi et posséder une lettre d'information sur eux à tout moment. La difficulté à ce niveau est de faire comprendre la potentielle gravité d'une décompensation à un patient qui n'aura probablement jamais vécu d'épisode métabolique.

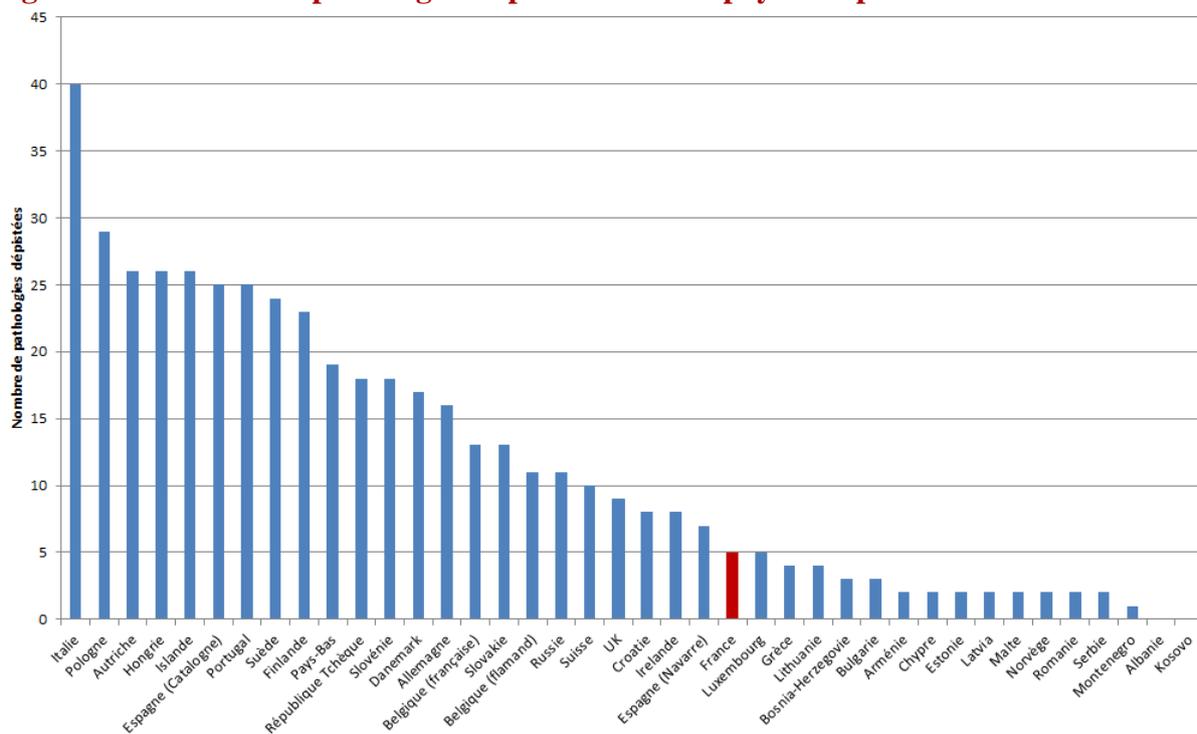
A l'heure actuelle, il manque encore beaucoup d'information sur les situations à risque que peuvent encourir les adolescents et adultes atteints du déficit en MCAD comme les sports de compétition, la perte de poids, la chirurgie, la grossesse ou la consommation d'alcool et de drogues. Dans le cadre de la prévention du jeûne, les patients déficitaires en MCAD ont plutôt tendance à être en surpoids, d'où une potentielle volonté de perdre du poids qui doit être accompagnée d'un suivi médical. Lors de la grossesse, il existe un risque de décompensation car le fœtus va physiologiquement consommer plus de glucose et ainsi faire diminuer la tolérance au jeûne (49,63).

4.5. Perspectives

Depuis le développement de la spectrométrie de masse en tandem dans les années 1990s, le nombre de maladies métaboliques potentiellement dépistables a vu une croissance phénoménale. En effet, grâce à cette technique, une pastille de sang permet de dépister de manière simultanée plus de 30 maladies métaboliques touchant différentes voies métaboliques : les acidoaminopathies, les aciduries organiques, les anomalies de la β -oxydation des AG et les maladies de surcharge lysosomales. En Europe, de nombreux pays ont déjà adopté la MS/MS.

La **Figure 23** montre la place de la France dans le classement du nombre de pathologies dépistées dans les pays européens.

Figure 23 : Nombre de pathologies dépistées dans les pays européens en 2020



Informations recueillies sur les sites de dépistage néonatal de chaque pays et de l'ISNS (International Society for Neonatal Screening).

Il faut cependant garder en tête que même si technologiquement les possibilités sont nombreuses, il est important de respecter les critères de l'ANAES car il n'y a pas forcément d'intérêt à tout dépister. Par ailleurs, le plan national Maladies rares 3 (2018-2022) préconise de diminuer l'errance diagnostic en augmentant le dépistage précoce de maladies rares. C'est pourquoi la HAS a réalisé une revue des maladies affectant le métabolisme intermédiaire : il en est ressorti une recommandation en février 2020 proposant l'ajout de 7 maladies supplémentaires au dépistage néonatal (1,139,140,154).

Figure 24 : Résultat de l'évaluation des maladies métaboliques : maladies proposées pour être intégrées au programme national de DNN

Maladies	Aminoacidopathies	Aciduries organiques	Déficits de bêta-oxydation
Proposées	HCY Homocystinurie MSUD Leucinose TYR1 Tyrosinémie type 1	GA-1 Acidurie glutarique de type 1 IVA Acidurie isovalérique	LCHAD déficit en déshydrogénase des hydroxyacyl-CoA de chaîne longue CUD déficit en captation de carnitine
Non proposées à réévaluer	CIT1 Citrullinémie type 1 OTC Ornithine transcarbamylase	PA Acidurie propionique MMA Ac. méthylmalonique	VLCAD déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à très longues chaînes
Non proposées	ASA Acidurie argininosuccinique ARG Argininémie	3MCC Méthylcrotonyl glycinurie HMG Ac. hydroxyméthylglutarique MCD Holocarboxylase Synthétase BKT β -cétotiolase	SCAD déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne courte CPT1 déficit en carnitine palmitoyl transférase I CPT2 déficit en carnitine palmitoyl transférase II CACT déficit en carnitine-acylcarnitine translocase MTP déficit en protéine trifonctionnelle mitochondriale MADD Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases

D'après la HAS, 2020 (139)

Partie 2 : Données expérimentales

Dans le contexte de l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD, l'objectif de ce travail était de mettre en place ce dépistage au laboratoire de Dépistage Néonatal du CHUGA. Cela a commencé par le choix du spectromètre de masse, son acquisition et son installation puis la mise au point et la vérification de méthode. L'intérêt de la MS/MS étant la possibilité d'analyses multiplex, sa mise en place s'est accompagnée du transfert de méthode du dosage de la phénylalanine (pour le dépistage de la phénylcétonurie) sur MS/MS. La vérification de méthode a donc porté sur les dosages d'octanoylcarnitine, de décanoylcarnitine, de phénylalanine et de tyrosine (dont l'intérêt, comme la décanoylcarnitine, est le calcul du ratio phénylalanine / tyrosine).

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Le dépistage néonatal étant un programme national, la procédure de choix des spectromètres de masse et des réactifs a été centralisée par le RESAH (Réseau des Acheteurs Hospitaliers) à la demande du Ministère des Solidarités et de la Santé. La Commission Nationale de Biologie du DNN a rédigé le cahier des charges afin que le RESAH puisse lancer un appel d'offre composé de 2 lots en août 2019 sous forme d'un accord-cadre (155) :

- **Lot n°1 – Spectromètre de masse** : un accord-cadre multi-attribué
- **Lot n°2 – Réactif** : un accord-cadre mono-attribué

1.1. Matériels

1.1.1. Lot n°1 : Choix du spectromètre de masse

Le choix du lot n°1 a été réalisé en 2 étapes : après une première sélection par le RESAH, puis présentation des différents fournisseurs et des différentes gammes proposées par les délégués commerciaux, la décision finale a été prise par chaque CRDN dans les marchés subséquents en fonction de leurs besoins spécifiques.

Cinq fournisseurs ont répondu à l'appel d'offre du RESAH en proposant une ou plusieurs gammes de MS/MS. Les appareils proposés en première intention pour le DNN étaient : Triple Quad™ 4500 (Sciex), LCMS-8045 (Shimadzu), QSight® 225 MD Mass spectrometer screening system (PerkinElmer), Xevo® TQD (Waters) et TSQ Fortis™ (ThermoFisher).

Le CRDN de la région Auvergne-Rhône-Alpes étant composé de 2 laboratoires (HCL et CHUGA), le choix a été réalisé en concertation entre les 2 CHU. En effet, l'utilisation d'un même appareil permet, en cas de panne, à chaque antenne d'agir comme backup pour l'autre. Les biologistes, ingénieurs et personnel du département biomédical des 2 CHU ont travaillé en collaboration pour rédiger un cahier des charges qui prenait en compte les aspects suivants :

- **La performance technique** : L'appareil doit avoir une sensibilité satisfaisante par rapport aux seuils du dépistage tout en étant robuste face à une utilisation quotidienne importante.
- **La formation à l'utilisation du spectromètre** : La formation doit permettre aux techniciens et biologistes d'acquérir une maîtrise du fonctionnement de l'appareil afin de pouvoir analyser les échantillons, gérer les problématiques rencontrées au quotidien et réaliser les maintenances préventives. Une 2^e formation permettant d'approfondir la maîtrise de l'instrument nous a semblé importante pour une utilisation optimisée.
- **La qualité du service après-vente** : Comme tout appareil, un spectromètre de masse doit être soumis à une maintenance régulière, le fournisseur doit donc prévoir un calendrier de maintenance régulier et adapté à l'utilisation de l'appareil. En cas de panne, une hotline (de préférence francophone) doit être disponible pour intervenir au plus vite.
- **Le prix** : Le coût total d'un équipement comprend non seulement le prix de l'appareil, mais aussi les contrats de maintenance et les garanties.

Au regard de ce cahier des charges, les 2 laboratoires de la région Auvergne-Rhône-Alpes ont retenu lors de la réunion du 8 janvier 2020 le Xevo® TQD de la société Waters avec son logiciel d'exploitation MassLynx™ et son module spécifique au dépistage néonatal IonLynx™, présenté dans la **Figure 25**. Le processus de sélection est détaillé dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Chronologie de l'acquisition de la MS/MS pour le CHUGA

Dates	Événement	Échéances
07/08/2019	Appel d'offre du RESAH	16/09/2019
18/10/2019	Diffusion des réponses des fournisseurs à l'appel d'offre du RESAH	
22/11/2019	Présentation des fournisseurs aux CHU de Lyon et Grenoble (biologistes, ingénieurs, service biomédical, responsable des achats) <ul style="list-style-type: none">• Chromsystems• Sciex• Waters• Shimadzu• ThermoFisher	
	Rédaction du cahier des clauses spécifiques (CCS) du marché subséquent	29/11/2019
06/01/2020	Réponses des fournisseurs au CCS	
08/01/2020	Réunion avec Lyon : analyse des offres, notes techniques des fournisseurs	
	Notation des offres	13/01/2020
13/02/2020	Choix du fournisseur notifié par le RESAH pour la région Auvergne-Rhône-Alpes : Xevo® TQD de la société Waters	
03/03/2020	Livraison et installation de la MS/MS	
06/03/2020	Première réunion pour la gestion des flux informatiques avec la cellule informatique du laboratoire	
16/03 – 10/05/20	Confinement liée à la pandémie COVID-19 et plan blanc des CHU interdisant la présence de sociétés extérieures (hors interventions urgentes)	
11/05/2020	Formation Waters Formation au paramétrage de la MS/MS et la maintenance des pièces	
25-29/05/2020	Formation Chromsystems Paramétrage de la MS/MS avec le kit réactif	
16-18/06/2020	Formation Waters et finalisation des flux informatiques en amont (convertisseur) et en aval (IonLynx)	

Figure 25 : Xevo® TDQ de Waters



1. ACQUITY I-Class Binary Solvent Manager ; 2. ACQUITY Sample Manager ; 3. Column Manager ; 4. Xevo® TQD, IVD ; 5. Logiciel MassLynx™ IVD ; 6. ACQUITY Sample Organizer

Pour tous les fournisseurs proposés, il a été constaté l'absence d'un logiciel de retraitement adapté à la validation technique du dépistage néonatal. Le logiciel nécessaire à l'exploitation des données devrait permettre le transfert de données du puncher au spectromètre, puis du spectromètre au LIMS (Laboratory Information Management Systems), la gestion des contrôles internes de qualité (CIQ) et la validation technique pathologie par pathologie. Le logiciel devrait également réaliser une sauvegarde des données avec une traçabilité de toutes les actions exécutées. Des solutions sous formes de « Middleware » nous ont donc été proposées ultérieurement :

- **NeoAMAC® de Biomanéo** : Ce module a été spécialement conçu par la société Biomanéo dans le cadre de l'appel d'offre. Biomanéo est une entreprise ayant déjà de l'expérience dans le domaine du dépistage avec le logiciel Neoscreening, dédié au dépistage de la drépanocytose. La version actuelle, à l'heure de la rédaction de cette thèse, ne permet cependant pas une gestion optimisée des CIQ avec notamment l'utilisation d'une moyenne mobile à la place d'une moyenne fixe, dont les limites sont le risque de dissimulation d'une dérive.
- **ISS-AIH (Integrated Software Solutions – Analytical Instrument Hub) de Spectra 2000** : Ce logiciel anglais, déjà commercialisé dans de nombreux pays anglophones,

répond à nos exigences citées plus haut, mais ne propose actuellement ni interface ni service après-vente en français.

- **Specimen Gate de Perkin Elmer** : Ce logiciel est également déjà largement commercialisé, mais n'a malheureusement pas été proposé en collaboration avec un spectromètre de masse autre que ceux de Perkin Elmer.

Lors de l'investissement initial pour l'achat de la MS/MS, il a été décidé de différer l'achat du « Middleware ». Pour le dépistage du déficit en MCAD et de la PCU, la gestion des données avec IonLynx et des CIQ avec Unity Real Time (URT) de Biorad (décrit dans le chapitre 3 : Discussion) a été considérée suffisante. La cellule informatique du CHUGA a par ailleurs proposé une solution de gestion des fichiers de données pour permettre la sélection des données à transférer sur Dépistar.

1.1.2. Choix réactif

Un seul kit réactif a été retenu par le RESAH pour toute la France : le kit *MassChrom*® Acides aminés et acylcarnitines sur sang séché (sans dérivation) de Chromsystems (156). Ce kit permet de réaliser le dosage multiplex semi-quantitatif des acides aminés et des acylcarnitines sur taches de sang séché sans butylation. Des étalons internes avec marquage isotopique permettent de réaliser la quantification des analytes. Chromsystems a su se montrer compétitif tant au niveau du prix proposé qu'au niveau du service fourni : le « petit matériel » de laboratoire (une centrifugeuse, un agitateur de plaque et une thermoscelleuse) a été proposé en location sans surcoût, ainsi que la garantie d'utilisation d'un lot unique de réactifs sur toute la France pendant un an.

1.2. Méthode

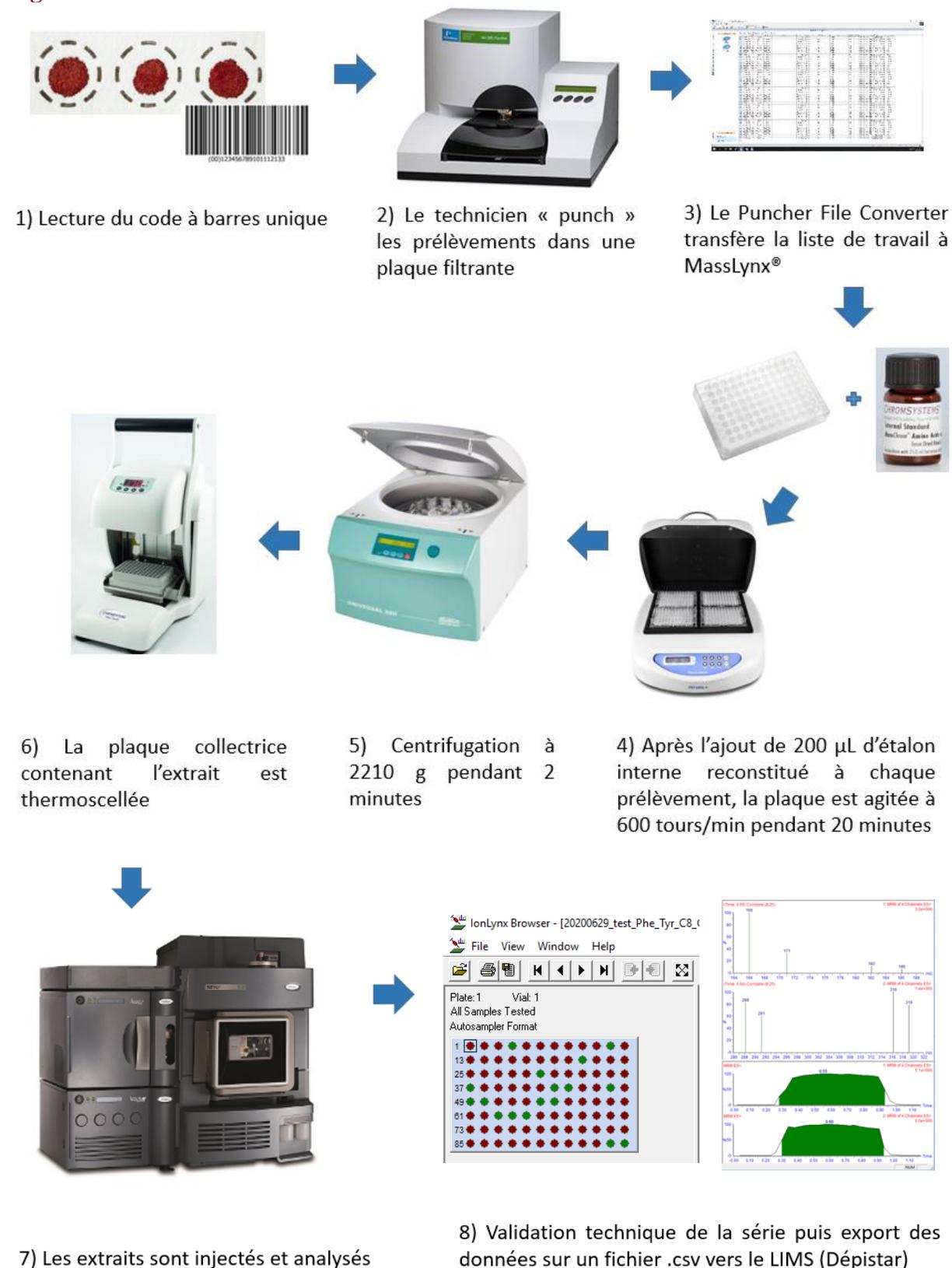
Le kit Chromsystems propose l'extraction d'acylcarnitines et d'acides aminés des taches de sang séché par un tampon d'extraction contenant de l'étalon interne marqué. Un système de plaque filtrante apposée sur une plaque collectrice permet la séparation de l'extrait et la pastille. Cet extrait est ensuite analysé par MS/MS.

1.2.1. Mode opératoire

Les pastilles de sang séché de 3,2 mm de diamètre sont déposées sur une plaque filtrante de 96 puits. Elles sont incubées dans 200 µL de tampon d'extraction contenant l'étalon interne sous agitation à 600 tours/min à température ambiante pendant 20 minutes. La plaque filtrante est superposée sur une plaque collectrice afin qu'après centrifugation pendant 2 minutes à

2210 g, les extraits se retrouvent dans la plaque collectrice. Une thermoscelleuse permet de sceller la plaque avec un film perçable. Le spectromètre injecte 10 μ L de chaque extrait et réalise un run de 1,7 minutes par extrait. Le processus est présenté dans la **Figure 26**.

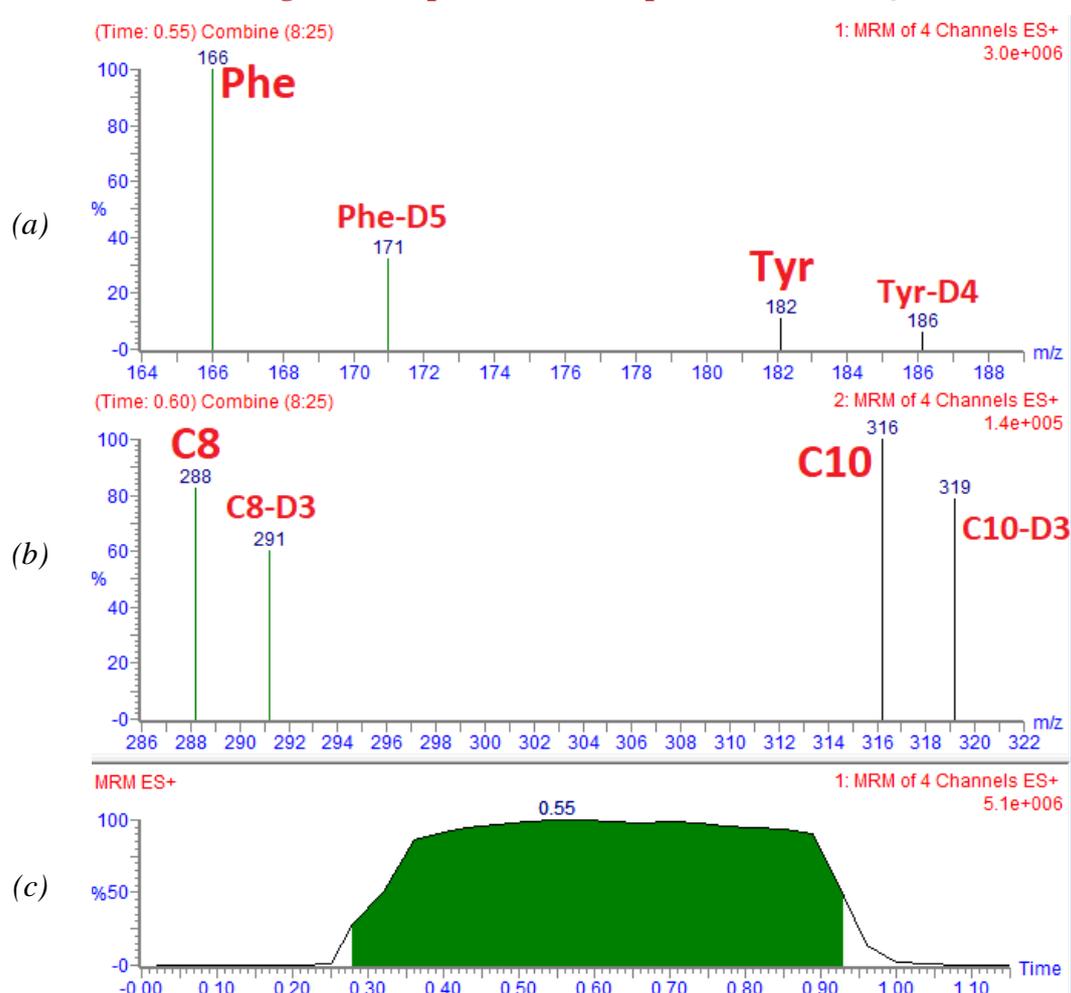
Figure 26. Déroulement de la méthode



1.2.2. Validation technique

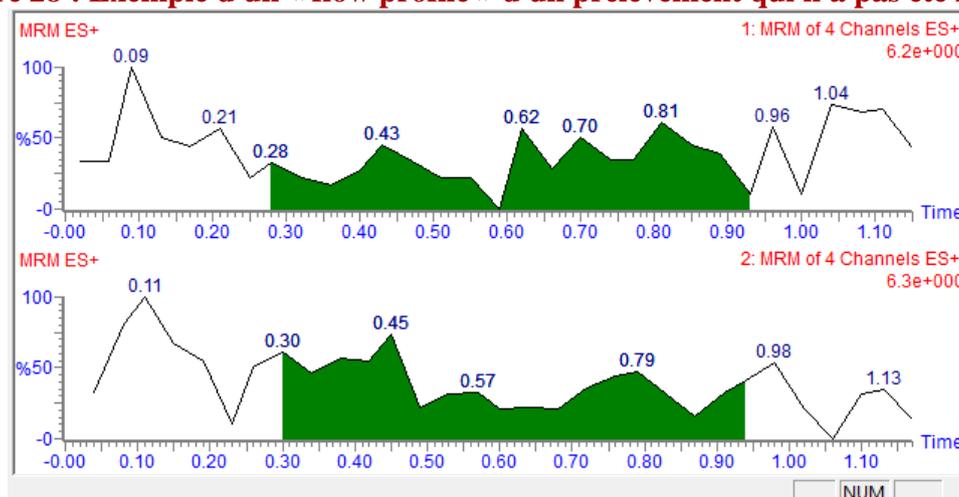
Les « flow profile » de chaque prélèvement doivent être vérifiés un à un. La **Figure 27** montre un exemple de CIQ avec les spectres de masse correspondant aux acides aminés, aux acylcarnitines et leurs étalons internes. L'aspect du « flow profile » optimisé est en plateau. S'il n'a pas cet aspect en plateau, cela indique un potentiel blocage ou un échantillon non présent. La **Figure 28** en est un exemple. La **Figure 29** dessine le « flow profile » d'un prélèvement lorsque le flux n'est pas optimisé.

Figure 27 : Spectre et « flow profile » d'un CIQ



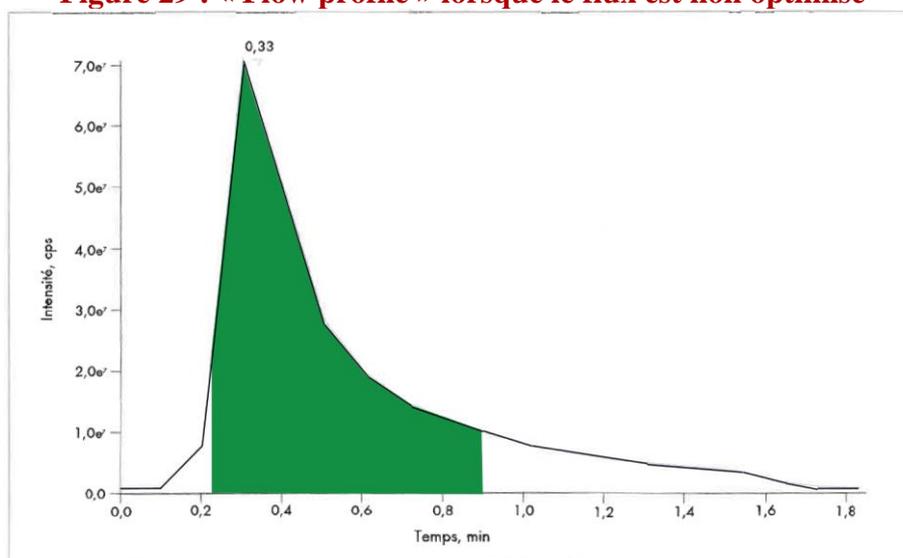
Sur les graphiques (a) et (b), les spectres de masse peuvent être visualisés avec le rapport m/z en abscisses et l'intensité du signal en ordonnées. Sur le graphique (c), le « flow profile » est représenté avec le temps en abscisses et l'intensité du signal en ordonnées.

Figure 28 : Exemple d'un « flow profile » d'un prélèvement qui n'a pas été injecté



Sur ces deux « flow profile », le signal ne dépasse pas la ligne de base. Le prélèvement n'a pas été injecté.

Figure 29 : « Flow profile » lorsque le flux est non optimisé



Ce « flow profile » ne se présente pas sous forme de plateau mais sous forme de pic car le débit n'est pas optimisé.

1.2.3. Accréditation de la méthode

Dans le cadre d'une démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) selon les normes NF EN ISO 15189, le SH REF 02 (Révision 6) du COFRAC précise que « Chaque examen de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologique réalisé par méthode quantitative ou qualitative doit être vérifié/validé ». La vérification/validation de méthode permet de vérifier les performances d'une méthode analytique sur site. En effet, même si le fournisseur a validé les performances de sa méthode, les conditions de travail dans un LBM sont différentes que celles de cette validation initiale. Elles peuvent différer par un changement de lots de réactifs, de calibrants, des conditions ambiantes locales, des conditions de stockage

des réactifs, de la qualité de l'eau ou des compétences de l'utilisateur. La vérification de méthode est un outil de maîtrise de la fiabilité des résultats. Elle s'inscrit dans la triade de qualification d'une méthode qui inclut :

- La **qualification d'installation** correspondant à la vérification par le fournisseur de l'installation d'un équipement grâce à des tests de conformité.
- La **qualification opérationnelle** comprend la vérification du fournisseur du bon fonctionnement de l'équipement en accord avec les besoins analytiques du laboratoire, notamment via une formation de l'équipe.
- La **qualification des performances** est effectuée par la vérification/validation de méthode réalisée par le laboratoire.

Selon le SH REF 08 (Révision 06), la demande d'accréditation peut être réalisée selon des portées différentes en fonction de la méthode analytique. La portée flexible standard (A) concerne les examens réalisés avec une méthode reconnue et nécessite seulement une vérification de méthode. Elle permet au LBM de changer d'équipement ou de trousse réactifs tout en maintenant son accréditation, dès lors que le principe technique général reste le même. La portée flexible étendue (B) concerne les méthodes adaptées voire développées par le LBM qui doit alors réaliser une validation de méthode. Le **Tableau 4** résume les différentes performances à évaluer en fonction de la portée d'accréditation et de la nature du résultat (quantitatif ou qualitatif).

Nous utilisons ici une méthode reconnue avec un mode d'emploi de DM-DIV (Dispositif médical de diagnostic *in vitro*) marqué CE (conformité européenne) au titre de la directive 98/79/CE et dont les performances ont déjà été vérifiées par Chromsystems sur le Xevo® TQD de Waters, il convient donc de réaliser une vérification de méthode en portée flexible de type A. Les vérifications de méthode pour le dépistage de la PCU et du déficit en MCAD ont été divisées en un sous-processus par analyte : un sous-processus pour la phénylalanine, la tyrosine, le C₈ et le C₁₀. Cette vérification a été réalisée avec l'aide du Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale (Document SH GTA 04 – Révision 01). Par ailleurs, des essais supplémentaires à ce qui est exigé dans la portée A ont été réalisés pour permettre une maîtrise plus globale de la méthode par le laboratoire.

Tableau 4 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison de méthode	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure	Bibliographie	/	Essai	/
Interférences	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalles de référence	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude de la méthode ou du système analytique.				

Selon NATA note n°17 – juin 2012

1.2.4. Analyse des risques

Un élément important d'une vérification ou validation de méthode est la gestion des risques. En effet, selon le paragraphe §4.14.6 de la norme NF EN ISO 15189, le laboratoire doit tout mettre en œuvre pour réduire et/ou éliminer les risques potentiels identifiés pouvant avoir un impact sur les résultats des examens dans la mesure où il existe un risque pour la sécurité des patients. Cela passe par l'identification des risques encourus à chaque étape du processus : le pré-analytique, l'analytique et le post-analytique dont les conséquences peuvent être des résultats erronés ou trop tardifs avec retard de prise en charge. Une fois identifiés, le laboratoire peut mettre en place des mesures de maîtrise de ces risques. Les outils que nous avons utilisés pour l'analyse de risque sont les suivants :

- **Méthode des 5M** : Les risques peuvent être classés dans les 5 catégories suivantes.
 - Matière : les consommables (les réactifs), la matière première (l'échantillon)
 - Milieu : le lieu de travail
 - Matériel : les équipements, l'outillage, les pièces de rechange
 - Méthode : les procédures, le flux d'information
 - Main d'œuvre : les ressources humaines, les qualifications du personnel

- **AMDEC** (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité) : la méthode AMDEC permet de prioriser les actions de maîtrise des risques en fonction de leur criticité. La criticité est déterminée grâce au calcul suivant :

$$C \text{ (criticité)} = G \text{ (gravité)} \times F \text{ (fréquence)} \times D \text{ (probabilité de non-détection)}$$

1.2.2. Évaluation des performances

1.2.2.1. Répétabilité

La répétabilité permet de déterminer la fiabilité de la méthode sur un même échantillon dans des conditions similaires : le même opérateur, le même lot de réactif, le même instrument et le même étalonnage dans un délai le plus court possible. La moyenne (m) et l'écart-type (σ) permettent de calculer le coefficient de variation (CV). Le CV limite initialement recommandé par la Commission Technique AFDPHE est de 15% (il sera probablement réévalué par la Commission Biologie).

Le calcul du CV est réalisé grâce à l'équation suivante: $CV = \frac{\sigma}{m} \times 100$

1.2.2.2. Reproductibilité intra-laboratoire / fidélité intermédiaire :

La fidélité intermédiaire est déterminée par l'analyse d'un même échantillon en changeant au moins une des conditions suivantes : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs ou les étalonnages. Elle permet d'établir la robustesse de la méthode soumise à des conditions changeantes. Le CV limite recommandé par la Commission Technique AFDPHE est de 20%.

1.2.2.3. Exactitude

L'exactitude permet de vérifier l'étroitesse de l'accord entre la valeur obtenue par le laboratoire et la valeur « vraie » d'une mesure établie par la participation de plusieurs autres laboratoires. La moyenne des participants est considérée comme la cible attendue. Lorsque cela est possible, il convient également de vérifier l'exactitude au sein d'un groupe de pairs (laboratoires utilisant la même technique). Les évaluations externes de la qualité (EEQ) permettent d'apprécier l'exactitude.

La formule de l'inexactitude est :

$$\text{Inexactitude (\%)} = \frac{(x-v) \times 100}{v} \quad (x : \text{valeur trouvée par le LBM} ; v : \text{valeur cible})$$

1.2.2.4. Sensibilité et spécificité analytique

La sensibilité et la spécificité sont utiles pour les tests dichotomiques qualitatifs, avec une réponse de type oui / non. Notre méthode nous permet de rendre un résultat quantitatif,

mais dans le cadre du dépistage, l'interprétation est dichotomique de type pathologique / non pathologique. Il reste donc intéressant d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la méthode, mais cela ne sera possible qu'à posteriori de la mise en place du dépistage avec l'évaluation des faux positifs et des faux négatifs.

1.2.2.5. Incertitudes

Selon le paragraphe §5.6.2 de la norme NF EN ISO 15189 : « Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, les calibrants, les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée, l'équipement utilisé, les conditions expérimentales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateurs ».

Le calcul de cette incertitude permet d'avoir une compréhension des limites analytiques d'un processus analytique et donc de pouvoir apporter une aide à l'interprétation au clinicien, notamment autour du seuil décisionnel. Une démarche de suivi de l'incertitude de mesure permet au laboratoire de réfléchir sur les potentiels facteurs susceptibles d'influencer la mesure et apporter une maîtrise de ces facteurs.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour l'évaluation de l'incertitude de mesure, elles sont décrites dans le document SH GTA 14 (Révision 00) du COFRAC :

- La méthode « GUM » reposant sur l'identification des composantes d'incertitudes, leur modélisation et leur quantification
- La méthode « Intra-laboratoire (CIQ + Matériaux de Référence) » basée sur l'utilisation des données de fidélité intermédiaire et de justesse
- La méthode « CIQ/EEQ » utilisant les données des CIQ et EEQ
- La méthode « CIQ + Étalon fournisseur » prend en compte en plus de la fidélité intermédiaire les données fournies par l'étalon du système analytique.

L'utilisation au laboratoire de CIQ et d'EEQ rend propice l'utilisation de la 3^e méthode : la méthode « CIQ/EEQ » dont la formule de calcul est la suivante :

$$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$$

$u^2(CIQ)$: représente la variance de l'ensemble du (CIQ) ;
 $u^2(EEQ)$: variance liée à la justesse (biais).

1.2.2.6. Étendue de mesure

La limite de détection (LOD) est le plus faible signal mesurable qui peut être différencié d'un blanc de réaction. La limite de quantification (LOQ) est la plus faible valeur mesurée que l'on peut rendre avec un niveau de fiabilité acceptable et avec une incertitude connue. La limite de linéarité objective le seuil supérieur du domaine de mesure. Dans le cadre de l'accréditation en portée A, l'étendue de mesure n'a pas besoin d'être déterminée par des essais sur site car Chromsystems a déjà établi les limites de quantification et de linéarité spécifiquement sur Xevo® TQD. Afin d'avoir un maximum d'information sur site, nous avons tout de même calculé ces limites basses (LOD, LOQ) par l'analyse de 30 buvards vierges dont l'écart-type (σ) a été déterminée. La LOD et LOQ ont été déterminées avec les formules suivantes :

$$\text{LOD} = 3 \times \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma$$

1.2.2.7. Interférences et spécificité analytique

Dans les matrices complexes comme le plasma ou le sang total, des substances interférentes (l'hémoglobine, les triglycérides, la bilirubine, les médicaments, etc) peuvent modifier le signal du mesurande. Dans le cadre d'une accréditation en portée A, l'étude bibliographique des interférences a été réalisée.

1.2.2.8. Contamination (bibliographie + essai sur site)

L'étude de contamination inter-échantillon a été réalisée en injectant consécutivement 3 CIQ niveau haut (H1, H2, H3, de moyenne mH) puis 3 buvards vierges (B1, B2, B3). Cette séquence est répétée 5 fois permettant d'obtenir une moyenne des B1 (mB1) et des B3 (mB3). La contamination est ensuite calculée avec la formule suivante :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(mB1 - mB3)}{(mH - mB3)} \times 100$$

1.2.2.9. Robustesse et stabilité des réactifs

La robustesse d'une méthode analytique indique sa capacité à ne pas être influencée par des variations faibles de certains paramètres retrouvés dans les conditions normales d'utilisation. Il peut s'agir par exemple de la température d'incubation, l'effet de bords sur microplaques ou la composition d'une phase mobile.

La stabilité des réactifs, dans le cadre d'un DM-DIV, est analysée par le fournisseur de réactifs. Elle inclut la température et durée de conservation avant/après ouverture et la conservation sur l'analyseur. Dans le cadre d'une vérification de méthode en portée A, la robustesse et la stabilité des réactifs ne sont pas évaluées par le LBM.

1.2.2.10. Intervalle de référence et/ou valeurs seuils

Les seuils décisionnels du dépistage néonatal sont décidés au niveau national. La Commission Biologique l'a défini à 0,2 µmol/L. Le tableau suivant présente quelques exemples de valeurs seuils d'autres pays réalisant le dépistage du déficit en MCAD.

Tableau 5 : Seuils d'action dans d'autres pays

Pays (source)	Seuil du C8	Pays (source)	Seuil du C8
Pays-Bas (127)	0,50 µmol/L	Australie (150)	1,0 µmol/L
Canada (152)	0,38 µmol/L	Angleterre (157)	0,40 µmol/L
USA (131)	0,50 µmol/L	Chine (158)	0,30 µmol/L
Allemagne (67)	0,30 µmol/L	Italie (159)	0,23 µmol/L
Espagne (160)	0,52 µmol/L	Emirates arabes unis (161)	0,40 µmol/L
Danemark (162)	0,50 µmol/L	Japon (163)	0,30 µmol/L

1.2.2.11. Déclaration d'aptitude

A la fin de la vérification/validation de méthode, une personne compétente et habilitée doit valider l'acceptation de la méthode en signant la déclaration d'aptitude avec une conclusion argumentée à partir des limites d'acceptation définies au préalable.

Chapitre 2 : Résultats de la vérification de méthode

2.1. SH FORM 43 pour le dépistage néonatal du déficit en MCAD

UM « Laboratoire de dépistage néonatal »

Site : Institut de Biologie et Pathologie, R+2

Portée : A B

Examen : routine spécialisé

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Dosage de l'octanoylcarnitine (C8) et de décanoylcarnitine (C10) à partir d'une tache de sang séché sur buvard pour le dépistage néonatal du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD)
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/>

DESCRIPTION DU SOUS-PROCESSUS	
Dosage de l'octanoylcarnitine (C8)	Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Étendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Dosage de la décanoylcarnitine (C10)	Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Étendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

SOUS-PROCESSUS 1 : Dosage de l'octanoylcarnitine (C8)Portée A ; Portée B **DESCRIPTION DE LA METHODE**

Analyte / Mesurande :	Octanoylcarnitine (C8)
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse en tandem
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Buvar CE IVD Perkin Elmer Le Perkin Elmer 226 sample collection device intègre le papier filtre Ahlstrom 226 qui répond aux exigences de la norme EN ISO 13485.
Prétraitement de l'échantillon :	Punch d'un diamètre de 3,2 mm, éviter les bords extérieurs des taches de sang. Extraction selon les recommandations du fournisseur.
Unités :	µmol/L
Critères d'interprétation :	Seuil d'action : 0,2 µmol/L
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Puncher Wallac Spectromètre de masse Xevo® TQD de Waters®
Référence du réactif :	MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised), réf 57000/F/FR
Matériau d'étalonnage (références) :	Etalon interne avec marquage isotopique (Réf : 57004/FR)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Etalon interne avec marquage isotopique : C8-Carnitine-D3 Transfert de masse en MRM : 291 > 85 Concentration du lot 4619 dans 200 µL d'extrait : 1,3 µM

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Fanny Zhao, Julien Leva
Procédure de validation/mode opératoire :	QBAQANA.PRO.004 : Vérification/validation des performances des méthodes analytiques
Procédure de gestion de la portée flexible :	GBAQANA.PRO.008 : Gestion de la portée flexible d'accréditation
Période d'étude :	Du : 15/06/2020 au 31/07/20
Date de 1^{ère} utilisation :	Dernier trimestre 2020 (mise en route de l'automate en routine)

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)							
SM	Points critiques	Fréquence	Gravité	Déteabilité	Échelle de criticité¹	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	2	4	1	8	Formation et du personnel	Charte d'identitovigilance au CHU de Grenoble Alpes (IDENT.MAQ.001) Vérification d'identité par le secrétariat du CRDN (habilitation : BIGMMH.FOR.032). Gestion des prélèvements au laboratoire uniquement à partir des codes à barres
	Préparation du patient	2	2	1	4	Information des patients et préleveurs	Guide AFDPHE pour les professionnels accessibles via le catalogue des analyses et distribué par le CRDN. Flyer « J3 l'âge du dépistage » distribué à chaque famille.
	Type de contenants	1	2	1	2	Formation des préleveurs	Guide AFDPHE pour les professionnels accessibles via le catalogue des analyses et distribué par le CRDN.
	Nature et volume de l'échantillon	5	2	1	10	Contrôle à réception	
	Délai et température avant traitement analytique	4	2	1	8	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	Transport par voie postale (enveloppe T : envoi médical urgent) sauf maternité locale (pneumatique). Vérification de la date limite d'utilisation des buvards à la réception. Vérification de la saturation en sang des buvards à l'enregistrement et avant le punch afin d'éviter les quantités insuffisantes et les surcharges (cf Document BIGMMH.FTE.014 « Non-conformité des buvards du dépistage néonatal »). Surveillance mensuelle des délais d'acheminement.

	Prétraitement : centrifugation	NA	NA	NA	NA	Conditions de centrifugation, ...	NA
	Interférences	2	2	1	4	Formation des préleveurs Contrôle à réception	Guide AFDPHE pour les professionnels accessibles via le catalogue des analyses et distribué par le CRDN.
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	1	1	2	2	Conditions de conservation pré-analytique : température ambiante, à l'abri du soleil direct	Prélèvements envoyés dans des enveloppes à l'abri du soleil direct. Les échantillons sont punchés dès leur arrivée au laboratoire.
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	1	2	1	2	Métrologie des enceintes	Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (GBAQGRI.PRO.011).
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	2	2	1	4	Plage de température : +15 à +28°C. Variation <2°C par 1,5 heure. Plage d'humidité comprise entre 20% et 80%. Altitude inférieure à 2000m.	Pièce thermostatée (suivi des températures) : enregistrements des conditions environnementales. Habilitation du personnel et mode opératoire : les CIQ et étalons internes doivent être amenés à température ambiante (+19-+25°C) avant de techniquer (BIGMMH.MOP.068). Suivi des exigences d'humidité et de température des CIQ avec des indicateurs colorés.
Matériel (équipements)	Qualité de l'eau	1	1	1	1	NA	Utilisation d'eau spécifique à la spectrométrie de masse.
	Surveillance des dérives	2	2	1	4	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	Maintenance préventive annuelle du fournisseur Maintenance hebdomadaire (voir traçabilité des maintenances) (BIGMMH.MOP.067)
	Contamination	1	4	2	8	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Maintenance préventive de la MS/MS hebdomadaire avec changement de filtre et lavage du bloc de cône d'échantillonnage. Essai sur site (voir vérification de méthode)
	Informatique embarquée	2	4	1	8	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, ...	Enregistrements des jeux d'essai

Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	1	2	1	2	Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures) La phase mobile et le liquide de rinçage sont à température ambiante. Les étalons internes et CIQ sont à <-18°C. L'étalon interne reconstitué est à +2-+8°C	Procédure de gestion des enceintes thermiques au LBM (GBAQGRI.PRO.011)
	Gestion des stocks	1	2	1	2	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison) : Réception des commandes à la réception décentralisée du R+2 de l'IBP (GEC.REC-MOP-001)
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	1	2	1	2	Métrie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrie (BIGMMH.FOR.039) Instructions de reconstitution de la fiche technique fournisseur. Habilitation du personnel.
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	N A	N A	N A	N A	Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences. Sensibilité, spécificité	BIGMMH.MOP.068 : Dépistage néonatal PCU et MCAD par MSMS Essais sur site pour la limite de détection et de quantification : domaine de mesure satisfaisant. Choix de CIQ proche de la valeur seuil.
	Causes d'incertitude de mesure	2	3	1	6	Calcul des incertitudes de mesure annuel	Suivi régulier des CIQ et EEQ. Incertain de mesure prise en compte dans le choix de la valeur de retest.
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	1	4	4		Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation	Enregistrements des compétences du personnel Secrétariat (BIGMMH FDH-004 : habilitation des secrétaires) Traçabilité de l'occupation des postes de travail Habilitation du personnel : procédure en cours Organisation du travail (BIGMMH.PRO.022)

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE
Sous-processus 1 : Dosage de l'octanoylcarnitine (C8)

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :
 Contrôles internes de qualité *MassCheck*®, niveau 1 et 2, N° lot 4519

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µm	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	30	0,558	0,029	5,51	4,6% (0,301 µM)	15%	Conforme
CIQ 2	30	2,143	0,111	5,20			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité, réalisée le 15/06/20 par J. Leva, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la répétabilité retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µm	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	9	0,512	0,039	7,58	5,2% (0,301 µM)	20%	Conforme
CIQ 2	9	2,036	0,103	5,05			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire, réalisée du 15/06/20 au 28/07/2020, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la fidélité intermédiaire retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Méthode automatisée.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Absence de contrôle de qualité externalisé.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)							
10 buvards distribués par le CDC en 2019 et 2020							
Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillon	Valeur labo en μM	Cible groupe de pairs	Cible toutes techniques	Biais (%) / groupe de pairs	Z-score / groupe de pairs	Biais (%) / toutes techniques	Conclusion
2010601	0,04	0,04	0,01	7,5	0,15	330	Conforme
2010602	2,03	1,84	2,01	10,1	0,55	1	Conforme
2010603	0,06	0,06	0,01	-5,0	-0,15	470	Conforme
2010604	0,04	0,04	0,01	2,5	0,05	310	Conforme
2010605	0,06	0,07	0,06	-14,3	-0,50	0	Conforme
31961	0,04	0,04	0,02	-12,5	-0,50	75	Conforme
31962	0,04	0,04	0,01	-12,5	-0,50	250	Conforme
31963	19,78	20,53	24,42	-3,7	-0,20	-19	Conforme
31964	0,04	0,06	0,01	-36,7	-0,73	280	Conforme
31965	0,05	0,06	0,01	-23,3	-0,47	360	Conforme

Argumentaire de la conclusion : Le biais limite recommandé par le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE 2014 est de 20%. L'exactitude est conforme au groupe de pairs (les 2 dernières valeurs ont un biais > 20% mais un z-score acceptable < 2 ; ce sont des résultats proches de la limite de quantification).

Le biais important retrouvé lors de la comparaison « toutes techniques » est lié à des concentrations inférieures à la limite de quantification. L'interprétation clinique n'est pas modifiée.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE			
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)			
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>			
Pays (référence)	Seuil C8	Valeur prédictive positive (VPP)	Valeur prédictive négative (VPN)
Pays-Bas (Touw et al, 2012)	$\geq 0,5 \mu\text{mol/L}$	75%	NA
Pays-Bas (Derks et al, 2008)	$\geq 0,3 \mu\text{mol/L}$	50%	0%
Australie (Waddell et al, 2005)	$\geq 1,0 \mu\text{mol/L}$	57%	NA
Australie (Carpenter et al, 2001)	$\geq 0,8 \mu\text{mol/L}$ (alerte) $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ (action)	48%	NA
Etats-Unis (Zytkovicz et al, 2001)	$> 0,5 \mu\text{mol/L}$	20%	NA
Etats-Unis (Hsu et al, 2008)	$> 0,5 \mu\text{mol/L}$	42%	NA
Canada (Horvath et al, 2008)	$> 0,38 \mu\text{mol/L}$	58%	0%
Allemagne (Schulze et al, 2003)	$> 0,32 \mu\text{mol/L}$	25,8%	0%
Australie (Wilcken et al, 2007)	$\geq 1,0 \mu\text{mol/L}$	42%	0% (suivi sur 2 ans)
Royaume-Uni (Oerton et al, 2011)	$\geq 0,4 \mu\text{mol/L}$ (alerte) $\geq 0,5 \mu\text{mol/L}$ (action)	77%	0% (suivi sur 2 ans)

Argumentaire de la conclusion : La VPP pour le seuil de C8 retenu en France de 0,2 µmol/L n'est pas connue, cependant cette étude bibliographique permet d'avoir une estimation de la VPP et VPN du dosage de C8 en MS/MS dans d'autres pays avec d'autres seuils. La VPN est à interpréter avec réserve car ces études ne sont pas suffisamment longues pour conclure sur le nombre de vrais-négatifs.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode « CIQ + EEQ » $u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$	SH GTA 14
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : 0,5 µmol/L	u(C) = 0,028 µmol/L	Pas d'exigences chiffrées données par le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal.
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : 2,0 µmol/L	u(C) = 0,690 µmol/L	

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : L'incertitude de mesure est l'outil permettant au labo de déterminer le seuil d'alerte (seuil de retest). Il sera à réévaluer lorsque plus de données d'EEQ seront disponibles.

Lors du passage en routine, le seuil de retest arbitraire est fixé à 0,15 µM (pour un seuil d'action à 0,2 µM). Si l'incertitude calculée ici est confirmée, le seuil de retest pourrait être de 0,17 µM.

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection (essai sur site)	0,02 µmol/L

Argumentaire de la conclusion : Voir Étendue de mesure.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>

Argumentaire de la conclusion : Absence de méthode précédente, cependant le profil des acylcarnitines plasmatiques en semi-quantitatif est réalisé au CHUGA en MS/MS (sur API 5500QT). Nous avons donc pu comparer le résultat de C8 plasmatique d'un patient atteint du déficit en MCAD avec le C8 mesuré sur Xevo® TQD) à partir de sang total déposé sur buvard. Le biais n'est pas interprétable au vu des matrices d'analyse différentes, mais les valeurs obtenues avec les 2 méthodes restent toute deux dans le domaine pathologique avec un ratio C8/C10 calculé comparable.

	Résultat API 5500QT	Résultat Xevo TQD	Biais (%)
C8	34,3 µmol/L	23,2 µmol/L	-32
Ratio C8/C10	8,6	7,4	17

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
	Données bibliographiques : fiche technique du fournisseur	Essais sur site (03/07/20, J Leva)
Limite de détection :	NA	0,02 µmol/L
Limite de quantification :	0,010 µmol/L	0,05 µmol/L
Limite supérieure de linéarité :	25,0 µmol/L	Non réalisée en l'absence d'échantillons très concentrés. En routine, la limite du fournisseur sera utilisée.

Argumentaire de la conclusion : Les limite de quantification et de linéarité sur Xevo® TQD sont fournies par Chromsystems. L'essai sur site a consisté à doser le C8 sur 35 buvards vierges dont l'écart-type (ET) a permis de calculer la limite de détection (LOD = 3*ET) et de quantification (LOQ = 10*ET). La limite de quantification déterminée sur site est similaire à la limite de quantification donnée pas le fournisseur.

INTERFERENCES (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Augmentation des acylcarnitines à chaîne longues donc ne concerne par le C8
Turbidité	NA
Bilirubine, ictère	NA
Lié à la MS/MS	Système d'injection sale : nettoyer le système avec du méthanol ou injecter 10 fois la phase mobile
Additifs	« Les additifs présents dans les récipients en matières plastiques (plaques de 96 puits, feuilles adhésives) utilisés lors de la préparation des échantillons peuvent fortement interférer avec certaines acylcarnitines et contribuer à des résultats faussement positifs. En conséquence, tous les réactifs et récipients contenus dans ce kit ont été testés de manière à pouvoir garantir des analyses sans interférences. » Notice technique Chromsystems.

CONTAMINATION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essai sur site de la contamination inter-échantillon avec analyse de 3 CIQ élevés (H1, H2, H3 de moyenne mH) puis 3 blancs (B1, B2, B3), répété 5 fois. Contamination = $\frac{(mB1 - mB3)}{(mH) - mB3} * 100$ Contamination = -0,02%
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

Argumentaire de la conclusion : Absence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>			
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Marges de tolérance précisées par le fournisseur Chromsystems : <ul style="list-style-type: none"> - Température d'extraction : 20-30°C - Durée d'incubation : 18-30 min - Vitesse d'agitation : 500-700 tours/min ; orbite : 2mm - Vitesse de centrifugation : 2200 – 3000 g 		
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ... Données de la fiche technique du fournisseur Chromsystems :	Réactif	Température	Durée
	Phase mobile	+18-+30°C	1 an après la date d'ouverture
	Étalon interne	Flacon : < -18°C	1 an après la date d'ouverture
		Reconstitué : +2-+8°C	3 semaines à l'abri de la lumière, hermétiquement fermé.
	Solution de rinçage	+18-+30°C	1 an après la date d'ouverture
	Tampon d'extraction	+18-+30°C	1 an après la date d'ouverture
Contrôle de sang séché sur papier buvard	<-18°C	1 an après la date d'ouverture	

Argumentaire de la conclusion : La stabilité des réactifs est donnée par la notice fournisseur Chromsystems.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>
Seuil d'action : 0,2 µmol/L

Argumentaire de la conclusion : Recommandation de la Commission Nationale de Biologie du 10 juillet 2020

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .././....
Autorisée par : Signature

SOUS-PROCESSUS 2 : Dosage de la décanoylcarnitine (C10)Portée A ; Portée B **DESCRIPTION DE LA METHODE**

Analyte / Mesurande :	Decanoylcarnitine (C10)
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse en tandem
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Buvarde CE IVD Perkin Elmer Le Perkin Elmer 226 sample collection device intègre le papier filtre Ahlstrom 226 qui répond aux exigences de la norme EN ISO 13485.
Prétraitement de l'échantillon :	Punch d'un diamètre de 3,2 mm, éviter les bords extérieurs des tâches de sang. Extraction selon les recommandations du fournisseur.
Unités :	µmol/L
Critères d'interprétation :	NA (non interprété)
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Puncher Wallac Spectromètre de masse Xevo® TQD de Waters®
Référence du réactif :	MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised), réf 57000/F/FR
Matériau d'étalonnage (références) :	Etalon interne avec marquage isotopique (Réf : 57004/FR)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Etalon interne avec marquage isotopique : C10-Carnitine-D3 Transfert de masse en MRM : 319 > 85 Concentration du lot 4619 dans 200 µL d'extrait : 1,35 µM

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Fanny Zhao, Julien Leva
Procédure de validation/mode opératoire :	QBAQANA.PRO.004 : Vérification/validation des performances des méthodes analytiques
Procédure de gestion de la portée flexible :	GBAQANA.PRO.008 : Gestion de la portée flexible d'accréditation
Période d'étude :	Du : 15/06/2020 au 31/07/20
Date de 1^{ère} utilisation :	Dernier trimestre 2020 (mise en route de l'automate en routine)

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE
Sous-processus 2 : Dosage de la décanoylcarnitine (C10)

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :
 Contrôles internes de qualité *MassCheck*®, niveau 1 et 2, N° lot 4519

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	30	0,52	0,03	6,2	4,4% (0,452 µM)	15%	Conforme
CIQ 2	30	1,96	0,11	5,7			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité, réalisée le 15/06/20 par J. Leva, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la répétabilité retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	9	0,47	0,037	7,77	5,0% (0,452 µM)	20%	Conforme
CIQ 2	9	1,87	0,085	4,54			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire, réalisée du 15/06/20 au 28/07/2020, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la fidélité intermédiaire retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Méthode automatisée.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Absence de contrôle de qualité externalisé.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)							
10 buvards distribués par le CDC en 2019 et 2020							
Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillon	Valeur labo en µM	Cible groupe de pairs	Cible toutes techniques	Biais (%) / groupe de pairs	Z-score	Biais (%) / toutes techniques	Conclusion
2010601	0,03	0,03	0,01	6,7	0,10	220	Conforme
2010602	1,19	1,18	1,36	0,7	0,03	-13	Conforme
2010603	0,03	0,04	0,01	-15,0	-0,30	240	Conforme
2010604	0,03	0,03	0,01	-6,67	-0,20	180	Conforme
2010605	0,07	0,07	0,07	-4,3	-0,10	-4	Conforme
31961	0,02	0,02	0,01	10,0	0,20	120	Conforme
31962	0,02	0,03	0,01	-46,7	-0,70	60	Conforme
31963	1,45	1,64	1,95	-11,7	-0,64	-26	Conforme
31964	0,02	0,03	0,01	-50,0	-1,50	50	Conforme
31965	0,05	0,15	0,01	-68,0	-2,55	380	Non conforme

Argumentaire de la conclusion : Le biais limite acceptable selon le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE 2014 est de 20%. Trois EEQ ont un biais supérieur à 20%, dont deux ont un z-score < 2 et sont donc acceptables. Le dernier EEQ est non conforme. Le C₁₀ n'étant pas le marqueur principal pour le dépistage du déficit en MCAD, cette déviation est à surveiller mais n'est pas bloquante pour la vérification de méthode.

Comme pour le C₈, le biais avec la cible « toutes techniques » est important sur des valeurs inférieures à la limite de quantification et est cliniquement non significative.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>

Argumentaire de la conclusion : La spécificité n'a pas été quantifiée, mais aucune interférence n'est signalée par Chromsystems. La sensibilité est non applicable car il n'y a pas de seuils pour le C₁₀.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :		
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode « CIQ + EEQ » $u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$	SH GTA 14
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : 0,5 µmol/L	U(C) = 0,043 µmol/L	Pas d'exigences chiffrées données par le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal.
Quantification de l'incertitude (niveau 2) : 2,0 µmol/L	U(C) = 0,205 µmol/L	

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : Le C₁₀ ne s'interprète pas seul, mais avec le C₈.

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection (essai sur site)	0,02 µmol/L

Argumentaire de la conclusion : Voir Étendue de mesure.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
--	--

Argumentaire de la conclusion : Absence de méthode précédente, cependant comme pour le C8, nous avons donc pu comparer le résultat du C10 plasmatique d'un patient atteint du déficit en MCAD avec le C10 mesuré sur Xevo® TQD à partir de sang total déposé sur buvard. Le biais n'est pas interprétable car nous n'analysons pas dans la même matrice, mais nous retrouvons des valeurs pathologiques avec les 2 méthodes.

	Résultat API 5500	Résultat Xevo® TQD	Biais (%)
C10	4,66 µmol/L	2,70 µmol/L	-42

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
	Données bibliographiques : fiche technique du fournisseur	Essais sur site (03/07/20, J Leva)
Limite de détection :	NA	0,02 µmol/L
Limite de quantification :	0,030 µmol/L	0,06 µmol/L
Limite supérieure de linéarité :	22,5 µmol/L	NA

Argumentaire de la conclusion : Les limites de quantification et de linéarité sur Xevo® TQD sont fournies par Chromsystems. L'essai sur site a consisté à doser le C10 sur 35 buvards vierges dont l'écart-type (ET) a permis de calculer la limite de détection (LOD = 3*ET) et de quantification (LOQ = 10*ET). La limite de quantification déterminée sur site est similaire à la limite de quantification donnée par le fournisseur.

INTERFERENCES (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	Augmentation des acylcarnitines à chaîne longues donc ne concerne pas le C10
Turbidité	NA
Bilirubine, ictère	NA
Lié à la MS/MS	Système d'injection sale : nettoyer le système avec du méthanol ou injecter 10 fois la phase mobile
Additifs	« Les additifs présents dans les récipients en matières plastiques (plaques de 96 puits, feuilles adhésives) utilisés lors de la préparation des échantillons peuvent fortement interférer avec certaines acylcarnitines et contribuer à des résultats faussement positifs. En conséquence, tous les réactifs et récipients contenus dans ce kit ont été testés de manière à pouvoir garantir des analyses sans interférences. » Notice technique Chromsystems.

Argumentaire de la conclusion : Le sang total sur buvard est un prélèvement de nature hémolysé. La présence de chaînes longues constante n'interfère pas avec le dosage de C10.

CONTAMINATION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essai sur site de la contamination inter-échantillon avec analyse de 3 CIQ élevés (H1, H2, H3 de moyenne mH) puis 3 blancs (B1, B2, B3), répété 5 fois. Contamination = $\frac{(mB1-mB3)}{(mH)-mB3} * 100$ Contamination = -0,04%
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

Argumentaire de la conclusion : Absence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Voir Sous-processus 1
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Voir Sous-processus 1

Argumentaire de la conclusion : Voir Sous-processus 1.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>

Argumentaire de la conclusion : Le C10 est utilisé pour calculer le ratio C8/C10. A ce titre, il n'y a pas besoin d'intervalles de référence pour le C10.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du ../../.... Autorisée par : Signature

2.2. SH FORM 43 pour le dépistage néonatal de la phénylcétonurie

UM « Laboratoire de dépistage néonatal »

Site : Institut de Biologie et Pathologie, R+2

Portée : A B

Examen : routine spécialisé

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Dosage de phénylalanine et de tyrosine à partir d'une tache de sang séché sur buvard dans le cadre du dépistage néonatal de la phénylcétonurie
Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/>

DESCRIPTION DU SOUS-PROCESSUS	
Dosage de la phénylalanine (Phe)	Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Étendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Dosage de la tyrosine (Tyr)	Modalités de vérification/validation : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Étendue de mesure <input type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

SOUS-PROCESSUS 1 : Dosage de phénylalanine (Phe)Portée A ; Portée B **DESCRIPTION DE LA METHODE**

Analyte / Mesurande :	Phénylalanine
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse en tandem
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Buvarde CE IVD Perkin Elmer Le Perkin Elmer 226 sample collection device intègre le papier filtre Ahlstrom 226 qui répond aux exigences de la norme EN ISO 13485.
Prétraitement de l'échantillon :	Punch d'un diamètre de 3,2 mm, éviter les bords extérieurs des tâches de sang. Extraction selon les recommandations du fournisseur.
Unités :	µmol/L
Critères d'interprétation :	Seuil d'alerte: 80 µmol/L Seuil d'action : 100 µmol/L
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Puncher Wallac Spectromètre de masse Xevo® TQD de Waters®
Référence du réactif :	MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised), réf 57000/F/FR
Matériau d'étalonnage (références) :	Etalon interne avec marquage isotopique (Réf : 57004/FR)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Etalon interne avec marquage isotopique : Phénylalanine-D5 Transfert de masse en MRM : 171 > 125 Concentration du lot 4619 dans 200 µL d'extrait : 192 µM

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Fanny Zhao, Julien Leva
Procédure de validation/mode opératoire :	QBAQANA.PRO.004 : Vérification/validation des performances des méthodes analytiques
Procédure de gestion de la portée flexible :	GBAQANA.PRO.008 : Gestion de la portée flexible d'accréditation
Période d'étude :	Du : 15/06/2020 au 31/07/20
Date de 1^{ère} utilisation :	Septembre 2020 (mise en route de l'automate en routine)

MAITRISE DES RISQUES

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

Voir Analyse de risque pour le dépistage du déficit en MCAD

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE
Sous-processus 1 : Dosage de la phénylalanine

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :
 Contrôles internes de qualité *MassCheck*®, niveau 1 et 2, N° lot 4519

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	30	290,3	11,91	4,10	3,0% (184 µM)	15%	Conforme
CIQ 2	30	575,0	23,85	4,15			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE 2014

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité, réalisée le 15/06/20 par J. Leva, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la répétabilité retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	9	264,2	14,27	5,40	4,8% (184 µM)	20%	Conforme
CIQ 2	9	552,2	27,04	4,90			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE 2014

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire, réalisée du 15/06/20 au 28/07/2020, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la fidélité intermédiaire retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Méthode automatisée.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Absence de contrôle de qualité externalisé.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)Newborn Screening Quality Assurance Program (NSQAP) distribué par le CDC
2019 Quarter 4Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Echantillons	Valeur labo en µM	Cible groupe de paires	Cible toutes techniques	Biais (%) / groupe de paires	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite*	Conclusion
41951	42,05	49,1	50,5	-14,4	-16,7	20%	Conforme
41952	42,2	48,6	51,9	-13,2	-18,7		Conforme
41953	56,06	59,0	62,7	-5,0	-10,6		Conforme
41954	53,22	59,7	62,7	-10,9	-12,3		Conforme
41955	44,08	51,1	50,5	-13,7	-12,7		Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal 2014

Argumentaire de la conclusion : Les biais entre les valeurs retrouvées par le laboratoire et les cibles des EEQ sont conformes aux exigences du Guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal. Le biais retrouvé est systématiquement négatif (résultats systématiquement inférieurs aux résultats attendus). Cette évaluation est à compléter avec des EEQ de niveaux différents.

A noter que des points de gamme de la marque Biorad (Quantase™ Neonatal Phenylalanine & Total Galactose Screening, lot 64095725, utilisé en méthode enzymatique) ont également été analysés en MS/MS. Le biais était alors systématiquement positif par rapport à la cible. Il serait intéressant de connaître l'origine de cette cible (moyenne sur un ou plusieurs sites en méthode enzymatique ? moyenne de plusieurs techniques différentes ?).

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

Argumentaire de la conclusion : La spécificité n'a pas été quantifiée, mais aucune interférence significative n'est signalée par Chromsystems (voir Interférences). La sensibilité est déterminée par le seuil d'action défini au niveau national.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode « CIQ + EEQ » $u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$	SH GTA 14
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : 100 µmol/L	U(C) = 10,4 µmol/L	Pas d'exigences chiffrées données par le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal.
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	En attente d'EEQ niveau 2	

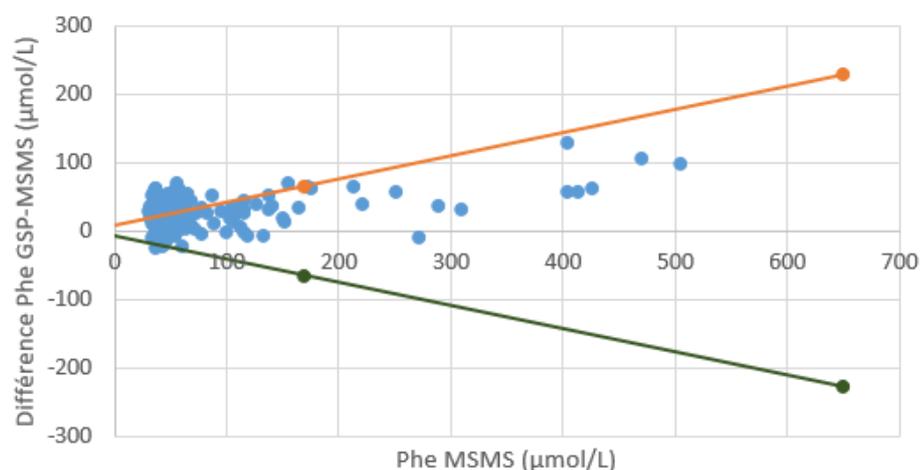
Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : L'incertitude de mesure est l'outil permettant au labo de déterminer le seuil d'alerte (seuil de retest). Le seuil d'alerte actuel de 80 µmol/L sera réévalué après les premiers mois de fonctionnement, après obtention de plus de données d'EEQ et de fidélité intermédiaire des CIQ.

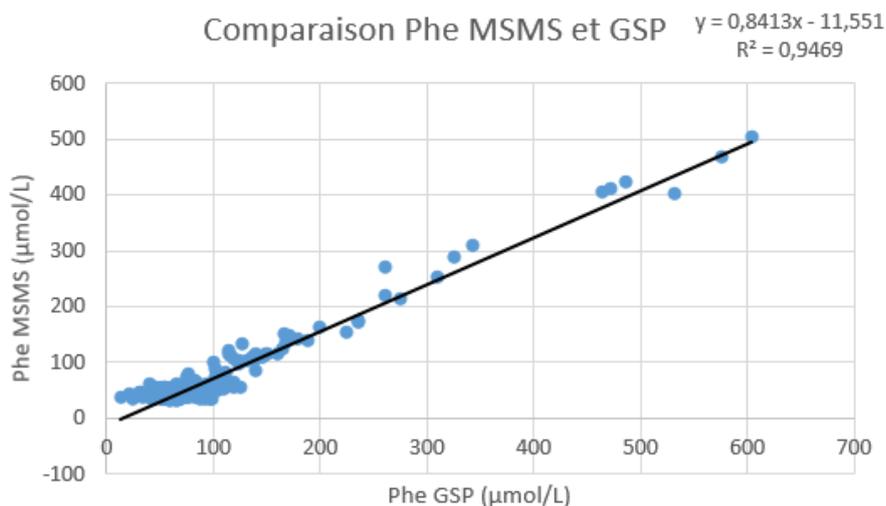
LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection (essai sur site)	0,7 µmol/L

Argumentaire de la conclusion : Voir Étendue de mesure.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Kit NeoPhe sur GSP®, méthode enzymatique
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	GSP® de PerkinElmer
Nombre de mesures :	290
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	20 à 500 µmol/L
Équation de la droite de régression :	$y = 0,8405x - 12,171$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	<p>La limite de suivi nous montre que les valeurs en GSP sont plus élevées qu'en MS/MS. Elle met également en évidence de nombreux déviants dans la zone < 100 µmol/L n'ayant pas d'impact clinique car étant inférieurs au seuil d'action.</p> <p>Un déviant est retrouvé à 155 µmol/L en MS/MS (225 µmol/L sur GSP), probablement lié à l'erreur aléatoire. A ces concentrations, cet échantillon aurait bénéficié d'un retest.</p>

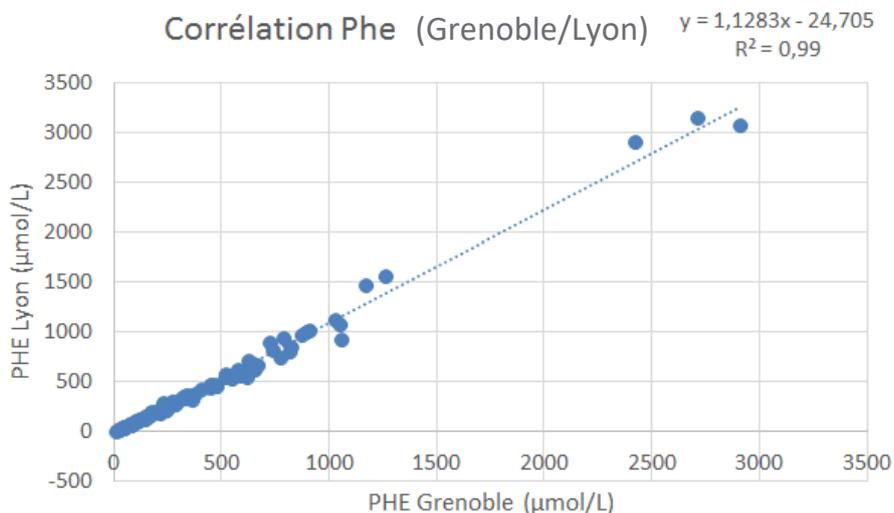
Limite de suivi

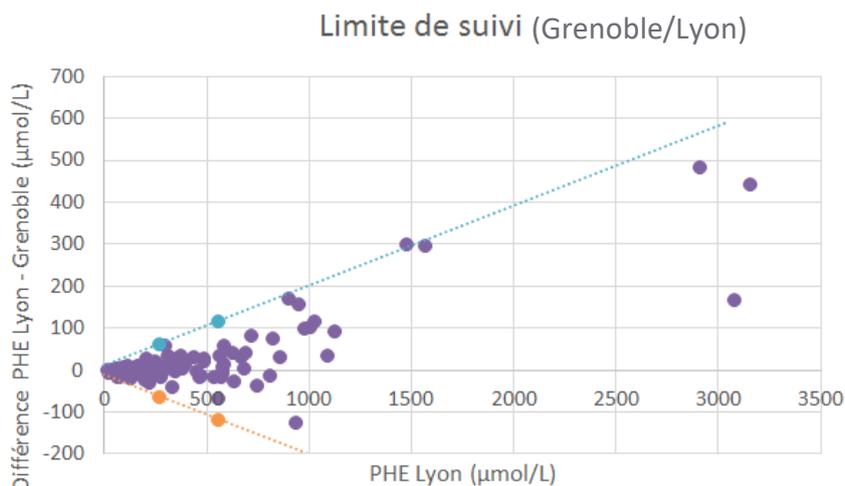




Argumentaire de la conclusion : Les résultats entre GSP et MS/MS sont comparables dans un contexte de dépistage (les valeurs inférieures à la valeur seuil restent inférieures au seuil avec les 2 méthodes). Néanmoins les concentrations obtenues en MS/MS sont inférieures à celles issues de la méthode enzymatique (la droite de corrélation met en évidence un biais de 11 $\mu\text{mol/L}$ et une pente de corrélation de 0,82 au lieu de 1), ce qui impose une vigilance importante pour les suivis de patients lors du transfert de méthode.

Une comparaison de méthodes a été réalisée avec le laboratoire de DNN des HCL (Centre de Biologie et pathologie Est, Service des maladies héréditaires du métabolisme, CHU Lyon) sur 100 buvards de suivi de PCU. Pour rappel, ce laboratoire est équipé du même appareil de spectrométrie de masse et utilise les mêmes réactifs commerciaux.





Argumentaire de la conclusion : Un déviant est retrouvé à 1500 µmol/L. Les déviants au-delà du seuil de 100 µmol/L seraient soumis à un contrôle en routine au dépistage. Par ailleurs, les suivis PCU sont habituellement analysés en double, or ils ont été analysés en simple dans le cadre de cette comparaison de méthodes au vu du nombre de prélèvements. Cette comparaison est conforme à nos exigences.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
	Données bibliographiques : fiche technique du fournisseur	Essais sur site (03/07/20, J Leva)
Limite de détection :	NA	0,7 µmol/L
Limite de quantification :	4,69 µmol/L	2,4 µmol/L
Limite supérieure de linéarité :	2500 µmol/L	Non réalisée en l'absence d'échantillons très concentrés. En routine, la limite du fournisseur sera utilisée.

Argumentaire de la conclusion : Les limites de quantification et de linéarité sur Xevo® TQD sont fournies par Chromsystems. L'essai sur site a consisté à doser la Phe sur 35 buvards vierges et l'écart-type (ET) a permis de calculer la limite de détection (LOD = 3*ET) et de quantification (LOQ = 10*ET). La limite de quantification déterminée sur site est similaire à la limite de quantification donnée par le fournisseur.

INTERFERENCES (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	NA
Turbidité	NA
Bilirubine, ictère	NA

Lié à la MS/MS	Système d'injection sale : nettoyer le système avec du méthanol ou injecter 10 fois la phase mobile
Méthionine sulfoxyde	« La méthionine sulfoxyde est un produit d'oxydation de la méthionine. La concentration normale de méthionine chez les nouveau-nés est de 20 µmol/L environ. Les concentrations de méthionine sulfone devraient donc s'établir au maximum à l'intérieur de cette zone. La zone pathologique pour la tyrosine et la phénylalanine est de 100 à 300 µmol/L environ. La méthionine sulfone ne devrait donc pas contribuer à des concentrations faussement élevées lors des dosages en routine ». Notice technique Chromsystems.

CONTAMINATION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essai sur site de la contamination inter-échantillon avec analyse de 3 CIQ élevés (H1, H2, H3 de moyenne mH) puis 3 blancs (B1, B2, B3), répété 5 fois. Contamination = $\frac{(mB1-mB3)}{(mH)-mB3} * 100$ Contamination = 0,05%
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

Argumentaire de la conclusion : Absence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>
--

Argumentaire de la conclusion : Voir SH FORM 43 pour le déficit en MCAD.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>
Seuil d'action : 100 µmol/L

Argumentaire de la conclusion : Recommandation de la Commission Nationale de Biologie du 10 juillet 2020

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du ../../....
Autorisée par : Signature

SOUS-PROCESSUS 2 : Dosage de la tyrosinePortée A ; Portée B (à justifier)**DESCRIPTION DE LA METHODE**

Analyte / Mesurande :	Tyrosine
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse en tandem
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Buvarde CE IVD Perkin Elmer Le Perkin Elmer 226 sample collection device intègre le papier filtre Ahlstrom 226 qui répond aux exigences de la norme EN ISO 13485.
Prétraitement de l'échantillon :	Punch d'un diamètre de 3,2 mm, éviter les bords extérieurs des taches de sang. Extraction selon les recommandations du fournisseur.
Unités :	µmol/L
Critères d'interprétation :	NA (non interprété)
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Puncher Wallac Spectromètre de masse Xevo® TQD de Waters®
Référence du réactif :	MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised), réf 57000/F/FR
Matériau d'étalonnage (références) :	Etalon interne avec marquage isotopique (Réf : 57004/FR)
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Etalon interne avec marquage isotopique : Tyrosine-D4 Transfert de masse en MRM : 186 > 140 Concentration du lot 4619 dans 200 µL d'extrait : 322 µmol/L

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Fanny Zhao, Julien Leva
Procédure de validation/mode opératoire :	QBAQANA.PRO.004 : Vérification/validation des performances des méthodes analytiques
Procédure de gestion de la portée flexible :	GBAQANA.PRO.008 : Gestion de la portée flexible d'accréditation
Période d'étude :	Du : 15/06/2020 au 31/07/20
Date de 1^{ère} utilisation :	Septembre 2020 (mise en route de l'automate en routine)

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE
Sous-processus 2 : Dosage de la tyrosine (Tyr)

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :
 Contrôles internes de qualité *MassCheck*®, niveau 1 et 2, N° lot 4519

REPETABILITE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	30	257,2	10,47	4,07	4,1% (319 µM)	15%	Conforme
CIQ 2	30	571,9	21,52	3,76			Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La répétabilité, réalisée le 15/06/20 par J. Leva, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la répétabilité retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne en µM	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire*	Conclusion
CIQ 1	9	241,1	12,16	5,04	5,3% (319 µM)	20%	Conforme
CIQ 2	9	554,0	20,10	3,63			Conforme

*Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE, 2014

Argumentaire de la conclusion : La fidélité intermédiaire, réalisée du 15/06/20 au 28/07/2020, est conforme selon le guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal de l'AFDPHE et similaire à la fidélité intermédiaire retrouvée par le fournisseur sur le même automate.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS
 Applicable ; non applicable

Argumentaire de la conclusion : Méthode automatisée.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Absence de contrôle de qualité externalisé.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)Newborn Screening Quality Assurance Program (NSQAP) distribué par le CDC
2019 Quarter 4Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs

Echantillons	Valeur labo en μM	Cible groupe de pairs	Cible toutes techniques	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toutes techniques	Biais (%) limite	Conclusion
41951	60,24	62,8	62,9	-4,1	-4,2	20%	Conforme
41952	59,62	62,7	64,7	-4,9	-7,9		Conforme
41953	947,1	880,9	900	7,5	5,2		Conforme
41954	59,85	66,1	62,7	-9,5	-4,5		Conforme
41955	53,36	53,6	51,5	-0,4	3,6		Conforme

* Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal 2014

Argumentaire de la conclusion : Les biais entre les valeurs retrouvées par le laboratoire et les cibles des EEQ sont conformes aux exigences du Guide d'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE
 Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Non applicable car il n'y a pas de seuil pour la tyrosine.

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

	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Méthode « CIQ + EEQ) $u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$	SH GTA 14
Quantification de l'incertitude (niveau 1) : 100 $\mu\text{mol/L}$	$U(C) = 6,1 \mu\text{mol/L}$	Pas d'exigences chiffrées données par le Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal.
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	En attente d'EEQ niveau 2	

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : La tyrosine ne s'interprète pas toute seule mais avec la phénylalanine.

LIMITE DE DETECTION

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)

Applicable ; non applicable Limite de détection (essai sur site) | 1,1 $\mu\text{mol/L}$

Argumentaire de la conclusion : Voir Étendue de mesure.

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : Absence de méthode précédente.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		
	Données bibliographiques : fiche technique du fournisseur	Essais sur site (03/07/20, J Leva)
Limite de détection :	NA	1,1 µmol/L
Limite de quantification :	2,73 µmol/L	3,6 µmol/L
Limite supérieure de linéarité :	2500 µmol/L	NA

Argumentaire de la conclusion : Les limites de quantification inférieure et de linéarité sur le spectromètre de masse Waters® Xevo TQD sont fournies par le fournisseur. L'essai sur site a consisté à doser la Tyr sur 35 buvards vierges dont l'écart-type (ET) a permis de calculer la limite de détection (LOD = 3*ET) et de quantification (LOQ = 10*ET). La limite de quantification déterminée sur site est similaire à la limite de quantification donnée pas le fournisseur.

INTERFERENCES (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	NA
Turbidité	NA
Bilirubine, ictère	NA
Lié à la MS/MS	Système d'injection sale : nettoyer le système avec du méthanol ou injecter 10 fois la phase mobile
Méthionine sulfoxyde	« La méthionine sulfoxyde est un produit d'oxydation de la méthionine. La concentration normale de méthionine chez les nouveau-nés est de 20 µmol/L environ. Les concentrations de méthionine sulfone devraient donc s'établir au maximum à l'intérieur de cette zone. La zone pathologique pour la tyrosine et la phénylalanine est de 100 à 300 µmol/L environ. La méthionine sulfone ne devrait donc pas contribuer à des concentrations faussement élevées lors des dosages en routine ». Notice technique Chromsystems.
Nutrition parentérale	« Chez les patients ayant une nutrition parentérale, pour lesquels la tyrosine a été remplacée par l'acétyltyrosine, la concentration de tyrosine peut se trouver réduite. Bien que la concentration de phénylalanine soit normale, le rapport Phe/Tyr peut dès lors augmenter ». Notice technique Chromsystems.

CONTAMINATION (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essai sur site de la contamination inter-échantillon avec analyse de 3 CIQ élevés (H1, H2, H3 de moyenne mH) puis 3 blancs (B1, B2, B3), répété 5 fois. Contamination = $\frac{(mB1-mB3)}{(mH)-mB3} * 100$ Contamination = 0,06%
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

Argumentaire de la conclusion : Absence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>
--

Argumentaire de la conclusion : Voir SH FORM 43 pour le déficit en MCAD

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>

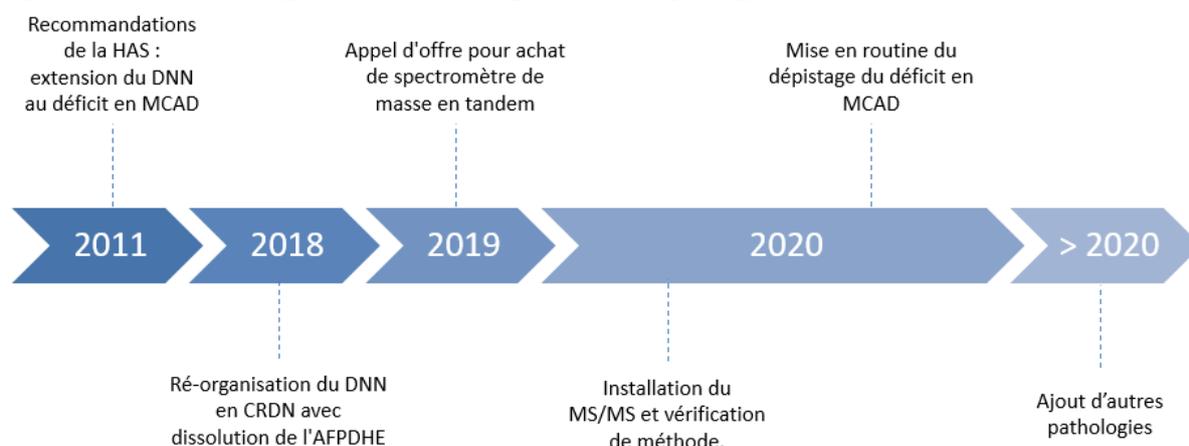
Argumentaire de la conclusion : La tyrosine est utilisée pour calculer le ratio Phe/Tyr. A ce titre, il n'y a pas besoin d'intervalles de référence pour la tyrosine.

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .././.... Autorisée par : Signature

Chapitre 3 : Discussion

L'objectif de ce travail était de mettre en place le dépistage néonatal du déficit en MCAD dès son début : de l'acquisition du spectromètre de masse à la vérification de méthode sur site. La chronologie des événements est résumée dans la **Figure 30** ci-dessous :

Figure 30 : Chronologie de la mise en place du dépistage néonatal du déficit en MCAD



Avant même la vérification de méthode, la mise en place de la MS/MS a requis le paramétrage de la MS/MS par les sociétés Waters et Chromsystems, puis des flux de données en pré-analytique et en post-analytique (la transmission des données d'une part entre les punchers et MassLynx et d'autre part entre IonLynx et Dépistar). L'habilitation du personnel à la manipulation de la MS/MS a pu également être réalisée en parallèle de la vérification de méthode.

3.1. Résultats de la vérification de méthode

3.1.1. Essais sur site : dépistage du déficit en MCAD

Les divers essais de vérification de méthode réalisés sur site ont montré que les dosages de C₈ et C₁₀ sont répétables, reproductibles et fiables sans contamination inter-échantillons. Dans le contexte d'un dosage où la valeur seuil est très basse et proche de la limite de quantification (limite de quantification du C₈ déterminée à 0,07 µmol/L pour un seuil de 0,2 µmol/L), la vérification de l'absence de contamination inter-échantillons est primordiale.

L'étendue de mesure a pu être testée pour confirmer la concordance avec les données du fournisseur. L'exactitude, qui nous assure de rendre un résultat le plus proche possible de la valeur vraie, était conforme pour le C₈ et globalement conforme pour le C₁₀, à l'exception d'un déviant, qui est à surveiller mais n'est pas bloquant étant donné son rôle secondaire vis-à-vis du C₈.

Le calcul de l'incertitude de mesure est essentiel, car il permet de déterminer la « zone grise » autour du seuil d'action. Si cette incertitude n'est pas prise en compte, le risque encouru est de rendre un résultat faussement normal. Pour maîtriser ce risque, comme pour toutes les autres analyses de dépistage néonatal, il convient de déterminer un seuil d'alerte en prenant en compte l'incertitude de mesure. Pour la mise en route du dépistage du déficit en MCAD, la Commission Biologie propose aux laboratoires de dépistage néonatal d'établir un seuil d'alerte par défaut à 0,15 $\mu\text{mol/L}$. Au vu d'un premier calcul d'incertitude du C_8 , évalué à $0,502 \pm 0,027 \mu\text{mol/L}$, ce seuil d'alerte pourra être réévalué.

3.1.2. Essais sur site : dépistage de la phénylcétonurie

L'évaluation du dosage de la phénylalanine et de la tyrosine a également démontré la répétabilité, la reproductibilité et la fiabilité de la méthode, sans contamination inter-échantillons. La comparaison de méthode avec la méthode utilisée précédemment, le kit GSP® Neonatal Phenylalanine, a démontré une bonne corrélation entre les deux méthodes mais avec un biais : les valeurs de phénylalanine en MS/MS sont systématiquement inférieures aux valeurs obtenues par méthode enzymatique (écart en moyenne de 11 $\mu\text{mol/L}$). Ceci est en accord avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature (164) et avec les résultats d'EEQ, où lorsque l'on compare les groupes de pairs, il existe un biais lié à la technique par rapport à d'autres méthodes de dosage de la phénylalanine. Le changement de seuil d'action, de 180 $\mu\text{mol/L}$ à 100 $\mu\text{mol/L}$, au niveau national prend en compte cet écart. Notre exactitude met cependant en évidence que notre méthode analytique rend des valeurs basses même au sein du groupe de pairs, tout en restant conforme. Ce biais est à surveiller.

Tout équipement utilisé en backup doit être soumis à des tests de comparaison à l'équipement de routine. Dans ce cadre, une comparaison de méthode a été réalisée entre les CHU Grenoble-Alpes et HCL de Lyon sur 100 prélèvements de patients atteints de PCU. L'intérêt de ces buvards utilisés pour le suivi des patients diagnostiqués avec une phénylcétonurie est la grande variabilité de concentrations de phénylalanine, allant de valeurs physiologiques à des valeurs très élevées jusqu'à 3000 $\mu\text{mol/L}$. Les résultats de phénylalanine étaient comparables entre les 2 centres. Des déviants sont retrouvés dans les valeurs faibles inférieures au seuil d'action de 100 $\mu\text{mol/L}$. Un déviant est retrouvé avec une phénylalanine à 1470 $\mu\text{mol/L}$ à Lyon et à 1168 $\mu\text{mol/L}$ à Grenoble, soit un écart de 302 $\mu\text{mol/L}$. Les déviants au-delà de ce seuil de 100 $\mu\text{mol/L}$ seraient soumis à un contrôle en double lors de la routine au dépistage. Par ailleurs, les suivis PCU sont habituellement analysés en double, or ils ont été

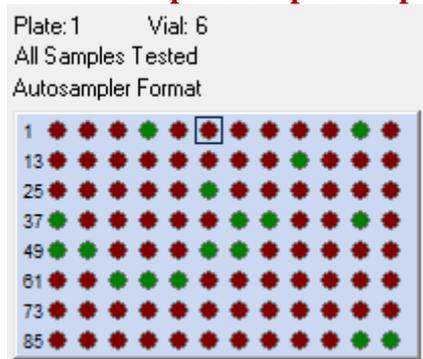
analysés en simple dans le cadre de cette comparaison de méthode au vu du nombre de prélèvements.

Une telle comparaison est nécessaire pour le C₈ et C₁₀, mais l'absence de prélèvements adaptés (portant sur une gamme étendue de valeurs de C₈ et de C₁₀) ne permet pour l'instant pas de comparaison optimisée.

3.2. Gestion post-analytique

Après la vérification de méthode, la mise en place d'une analyse dans un LBM doit être accompagnée d'une gestion post-analytique des résultats, qui passe notamment par la validation technique : la série est validée par la vérification de la conformité des CIQ et chaque prélèvement doit avoir un « flow profile » correct. Le logiciel IonLynx donne un aperçu de ces 2 éléments via un plan de plaque. Les points verts correspondent soit à un CIQ dont les résultats sont compris dans les cibles soit à un patient dont tous les analytes sont normaux. Un point rouge signale un CIQ hors borne ou un patient dont au moins un analyte est au-delà du seuil d'alerte.

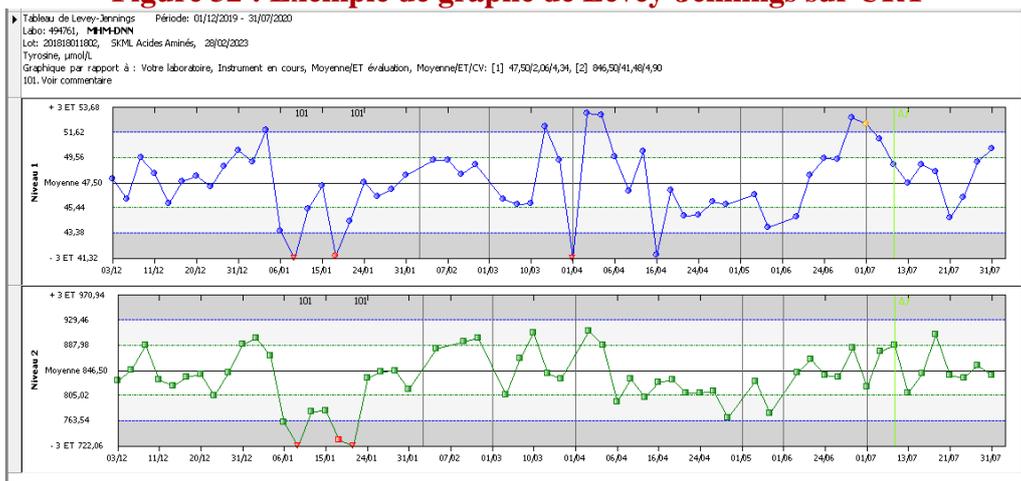
Figure 31 : Exemple d'un plan de plaques



Sur ce plan de plaques de 96 puits, des CIQ se trouvent en position 3, 4, 49, 50, 95 et 96. Le CIQ en position 3 est rouge car au moins 1 analyte n'est pas dans sa cible. Les autres points rouges correspondent à des patients ayant un dosage de phénylalanine au-dessus du seuil d'action car ce sont des suivis de PCU.

Les données de CIQ seront gérées sur Unity Real Time® (URT) de Biorad. Ce logiciel déjà utilisé sur l'ensemble de l'Institut de Biologie et Pathologie (IBP) du CHUGA pour la gestion de données des CIQ a de nombreuses fonctionnalités intéressantes. Il permet de paramétrer les règles de Westgard adaptées à la méthode, de visualiser les CIQ sur des graphes de Levey-Jennings et de suivre des indicateurs qualité comme la fidélité intermédiaire sur une période donnée, le taux de rejets de CIQ, etc.

Figure 32 : Exemple de graphe de Levey-Jennings sur URT



Une des grandes problématiques dans la gestion post-analytiques des résultats avec la mise en place de la MS/MS est la nécessité de pouvoir valider les résultats de patients analyte par analyte. En effet, nous avons vu que l'analyse de chaque prélèvement permet de quantifier la phénylalanine, la tyrosine, le C₈ et le C₁₀. Le nombre d'analyte analysé ne fera qu'augmenter avec l'extension du dépistage. Or le logiciel IonLynx n'a pas de module de gestion des résultats par analyte. Les résultats sont rendus sous forme de fichier .csv comprenant tous les dosages. Il est possible de modifier manuellement ce fichier en supprimant les colonnes que l'on ne souhaite pas valider, il s'agit cependant d'un processus manuel à risque d'erreur, nous obligeant à manipuler les valeurs brutes des résultats et donc inconcevable pour le dépistage néonatal. Lorsque prochainement un nombre plus important de pathologies sera dépisté par MS/MS, la gestion des résultats sur un fichier excel sera d'autant plus hasardeuse. Actuellement, la Direction des Services Numériques du CHUGA propose un outil de transmission des résultats, Cloverleaf, permettant la sélection des résultats à transmettre à Dépistar, répondant ainsi aux attentes du laboratoire.

3.3. Mise en place du dépistage néonatal du déficit en MCAD et de la phénylcétonurie en MS/MS

En dehors de son aspect technique, la mise en place de la MS/MS impose une nouvelle organisation de travail au sein du laboratoire et pour les cliniciens. L'ajout du dépistage du déficit en MCAD doit être communiqué aux personnels de santé susceptible de réaliser le prélèvement de J3 afin qu'ils puissent informer les parents sur l'intérêt du dépistage dans son intégralité. Le dépliant « J3, l'âge du dépistage » remis aux parents doit également être mis à jour.

Pour le laboratoire, il faut redéfinir les fiches de poste des techniciens et des secrétaires du CRDN et mettre à jour la documentation dans le système de gestion documentaire du

laboratoire avec le mode opératoire, la procédure de maintenance du spectromètre de masse et les nouveaux arbres décisionnels comportant les seuils de retest et les seuils d'action (voir **Annexe 5** et **6**). Une fiche de traçabilité adaptée doit être créée pour gérer la traçabilité quotidienne de la validation technique. Du côté informatique, le logiciel de gestion du dépistage, Dépistar, a été mis à jour afin de permettre l'import des résultats de MassLynx et leur validation. Enfin, la qualification du personnel doit être vérifiée au travers sa participation aux formations de Waters et de Chromsystems, la lecture des documents et l'habilitation à la réalisation de la technique. Des jeux d'essais informatiques doivent être effectués afin de vérifier les connexions informatiques.

Enfin, il faut mettre en place une organisation avec les pédiatres qui permette la prise en charge rapide des nouveau-nés ayant des résultats anormaux avec instauration immédiate d'un régime adapté, la réalisation des analyses de confirmation diagnostique puis le suivi des patients diagnostiqués.

Le changement de méthode de dosage de la phénylalanine doit également impérativement être communiqué aux médecins qui gèrent le suivi des enfants et adultes atteints. La comparaison de méthodes entre la MS/MS et la méthode précédente de dosage enzymatique sur GSP® de PerkinElmer a mis en évidence un biais systématique entre les 2 méthodes, avec des valeurs de phénylalanine plus basses en MS/MS que par méthode enzymatique (voir SH FORM 43 – Comparaison de méthode). Il est donc indispensable pour les patients suivis au laboratoire du CHUGA que les médecins et diététiciens soient informés de ces variations lors du transfert de méthode.

3.4. Amélioration continue

Les seuils et algorithmes établis par la Commission Biologie pour le dépistage néonatal du déficit en MCAD sont déterminés grâce à des données bibliographiques obtenues d'autres pays. Ils doivent être à terme adaptés à la population et au système de santé français. Cela peut s'appuyer en grande partie sur l'amélioration continue. En effet, la vérification de méthode est un outil qualité important mais statique. Il permet de vérifier qu'une méthode est conforme au moment de l'évaluation. Dans une démarche d'amélioration continue, un suivi d'indicateurs est mis en place afin de vérifier qu'il n'y ait pas de dérive dans le temps. Il s'agit notamment de ré-évaluer à intervalle régulier la fidélité intermédiaire des CIQ, l'exactitude des EEQ et l'incertitude de mesure. L'introduction prochaine d'EEQ d'Asqualab pour remplacer les CNQ (contrôle national de qualité) de l'ANSM sera un outil en plus pour réaliser le suivi des indicateurs au niveau national. Par ailleurs, l'utilisation d'un seul lot réactif sur tout le territoire facilitera les comparaisons inter-sites et les suivis de réactovigilance. D'autres indicateurs

peuvent être suivis comme le délai de rendu de résultats qui peut avoir un impact important sur la prise en charge de ces nouveau-nés.

Au niveau national, une évaluation de la sensibilité, de la spécificité, la VPP et la VPN de la technique devra être réalisée. La mise en route du dépistage permettra en effet d'accumuler beaucoup plus de données concernant les faux positifs et les faux négatifs. Ces informations permettront, si besoin, de réévaluer le seuil d'action.

Au final, la mise en place de ce dépistage va être une action importante de santé publique prévenant les effets délétères d'une maladie traitable, et surement accroître notre compréhension du déficit en MCAD. Elle permettra également à la France de reprendre une place plus éminente dans le dépistage néonatal européen.

Conclusion

Le dépistage néonatal est une action de prévention du plan national de santé publique en France, permettant depuis plus de 40 ans de détecter certaines maladies rares mais graves chez des nouveau-nés asymptomatiques afin de les prendre en charge avant l'apparition de symptômes. Actuellement, la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la drépanocytose et la mucoviscidose sont dépistées chez les nouveau-nés au 3^e jour de vie par des méthodes variées comme par exemple la fluorimétrie, la biologie moléculaire, l'HPLC, l'électrophorèse capillaire de zone et la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Depuis les années 1990s, la spectrométrie de masse en tandem a été implémentée dans de nombreux pays, permettant de dépister sur un seul prélèvement jusqu'à 30 pathologies simultanément. La HAS a recommandé en 2011 l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD par MS/MS en France. Dans ce contexte, une réorganisation totale du système, avec l'abandon du modèle associatif et l'intégration de l'activité au sein des CHU, a été nécessaire pour que les laboratoires de dépistage néonatal puissent se doter en spectromètres de masse en 2020.

Le déficit en MCAD, anomalie de la bêta-oxydation des acides gras la plus fréquente, provoque des épisodes de décompensation sous forme d'hypoglycémie non-cétoïque, de léthargie, de coma voire de décès, déclenchés par le jeûne prolongé, l'exercice physique et les maladies intercurrentes. Ces crises peuvent être évitées par la mise en place de règles hygiéno-diététiques, notamment l'éviction du jeûne. Le dépistage néonatal de cette maladie est donc un outil particulièrement intéressant pour détecter les patients atteints avant toute décompensation.

Dans le cadre de la mise en place de ce dépistage en France et des exigences de qualité requis des laboratoires de biologie médicale par l'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010, nous avons mis en place le dosage multiplex d'octanoylcarnitine, de décanoylcarnitine (pour le dépistage du déficit en MCAD), de phénylalanine et de tyrosine (pour le dépistage de la phénylcétonurie) avec le kit MassChrom® de Chromsystems sur le système analytique Waters® Xevo® TQD. Nous avons ensuite procédé à une vérification de méthode au laboratoire du CHU Grenoble-Alpes. Suite aux essais de répétabilité, de fidélité intermédiaire, de contamination inter-échantillons, d'étendue de mesure et d'exactitude, la performance de la technique a bien été démontrée conforme à nos attentes et aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. L'analyse des risques a permis de maîtriser toutes les étapes du pré-analytique au post-analytique. Par ailleurs, ces résultats ont pu être corrélés à ceux du laboratoire du CHU de Lyon (HCL) où les essais de vérification de méthode ont également démontré la fiabilité de la

méthode. Enfin, l'étude bibliographique nous a confortés sur la sensibilité et la spécificité de ce dosage.

Le démarrage du dépistage néonatal du déficit en MCAD, initialement prévu au premier trimestre 2020, a dû être décalé au troisième trimestre 2020 devant le contexte pandémique de la COVID-19. Néanmoins, le laboratoire du CHU Grenoble-Alpes est désormais prêt pour proposer cet examen de biologie médicale à tous les nouveau-nés des 6 départements concernés. La prochaine étape sera l'extension du dépistage néonatal à d'autres erreurs innées du métabolisme intermédiaire traitables et dépistables par MS/MS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 24/09/20

LE DOYEN


Michel SEVE
Président de la Fédération
des Pharmaciens
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

LE DIRECTEUR DE THESE :

C. Corne



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :

B. CHOVELON



Annexe 1. Dépliant J3 l'âge du dépistage

Édition 2017



Madame, Monsieur,

Dès les premiers jours suivant la naissance de votre bébé, la maternité va vous proposer de lui faire des tests dans le cadre du programme national de dépistage. Celui-ci existe depuis 1975 et concerne tous les nouveau-nés.

Ces tests de dépistage permettent de repérer les enfants atteints de certaines maladies graves, souvent d'origine génétique : phénylcétonurie, hypothyroïdie congénitale, hyperplasie congénitale des surrénales, mucoviscidose, drépanocytose.

Les résultats de ce dépistage sont très positifs. Plus de 28 millions de bébés ont été testés. Ceux qui étaient malades ont été repérés et traités dès leurs premières semaines de vie et ont pu ainsi se développer normalement.

Le Président de l'AFDPHE*

*L'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) est chargée par les pouvoirs publics de mettre en œuvre le dépistage néonatal systématique. Le programme est entièrement financé par l'Assurance Maladie.

QUEL INTÉRÊT DE DÉPISTER TRÈS TÔT CERTAINES MALADIES ?

Les tests de dépistage permettent de détecter certaines maladies qui ne sont pas visibles à la naissance, mais peuvent avoir des conséquences sérieuses chez les enfants atteints et retarder leur développement s'ils ne sont pas traités très rapidement.

Sans test de dépistage, l'enfant risque de ne pas être reconnu comme pouvant être malade et traité en temps utile.

POURQUOI UN TEST CHEZ TOUS LES NOUVEAU-NÉS ?

Rien ne permettant de prévoir un risque particulier, tous les bébés doivent être testés. Les maladies actuellement dépistées sont rares ; elles ne touchent qu'un enfant sur plusieurs milliers. La probabilité que votre bébé en soit atteint est donc extrêmement faible. Ces tests ne présentent aucun danger.

QUAND SONT RÉALISÉS LES TESTS ?

Dans les trois à quatre jours qui suivent la naissance, votre enfant aura un prélèvement de sang. L'ensemble des tests est réalisé sur quelques gouttes de sang prélevées par piqûre au talon et recueillies sur une bandelette de papier buvard.

LA PHÉNYLCÉTONURIE (PCU)

est due à l'accumulation, dans l'organisme de la **phénylalanine**, un des composants des aliments que nous mangeons chaque jour.

Le test de Guthrie permet de détecter dans le sang du bébé malade une augmentation de la phénylalanine qui empêche le cerveau de se développer normalement.

Un régime pauvre en aliments naturellement riches en phénylalanine (viandes, poissons, lait, œufs...), commencé dans les premières semaines de vie et poursuivi pendant les premières années, permet un bon développement et une croissance normale des enfants atteints.

Le dépistage de cette maladie est fait en France systématiquement depuis 1967. Les plus âgés des malades dépistés sont tous devenus des adultes normaux. Leur scolarité et leur intégration sociale ont été celles des autres enfants.

Fréquence : environ 1/16.000 bébés



L'hypothyroïdie congénitale

est due à une sécrétion insuffisante d'une hormone, la thyroxine, normalement produite par la glande thyroïde. Elle est indispensable à la croissance et au bon développement cérébral du bébé.

Quand la thyroxine est insuffisamment sécrétée, la glande hypophysaire produit en excès de la TSH. C'est cette TSH qui est dosée par le test de dépistage.

Le traitement consiste à administrer de la thyroxine, par voie orale, tous les jours, pendant toute la vie.

Grâce à la mise en place du dépistage depuis 1978, les 7.000 bébés hypothyroïdiens dépistés par ce programme ont tous un développement physique et intellectuel normal.

Fréquence : environ 1/3.500 bébés

L'hyperplasie congénitale des surrénales

est liée à une production anormale des hormones produites par les glandes surrénales.

Cela a pour conséquence un défaut de sécrétion de cortisone et, dans un certain nombre de cas, des hormones qui retiennent le sel et l'eau dans l'organisme, ainsi qu'une production excessive des hormones masculinisantes d'où des accidents graves de déshydratation, des anomalies de la croissance staturale...

Le test de dépistage repose sur le dosage de la 17OHP, marqueur de ces anomalies. Il a été mis en place depuis 1995.

Le traitement par hormones surrénaliennes permet une bonne croissance et un développement normal des enfants atteints. Il doit être poursuivi à vie.

Fréquence : environ 1/18.000 bébés



LA DRÉPANOCYTOSE

est liée à la présence d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S. Comme d'autres anomalies de l'hémoglobine, elle est fréquente dans les départements d'Outre-mer et en Afrique Noire.

La drépanocytose est responsable de crises douloureuses, d'accidents anémiques aigus et d'infections particulièrement graves, surtout avant l'âge de 2 à 3 ans.

Le test de dépistage consiste à étudier l'hémoglobine. Il est fait chez tous les bébés nés dans les DOM-TOM. En métropole, il n'est pratiqué que chez les nouveau-nés issus de parents originaires des pays à risque.

L'éducation des parents, l'administration régulière d'antibiotiques et les vaccinations contre les infections permettent de prévenir en grande partie les accidents qui ponctuent les premières années de vie des malades.



LA MUCOVISCIDOSE

engendre des troubles nutritionnels et une atteinte pulmonaire progressive qui fait la gravité de l'affection.

Le diagnostic clinique est souvent tardif, ce qui est préjudiciable pour le malade.

Un test de dépistage par dosage de la trypsine permet de repérer les nouveau-nés suspects. Son interprétation peut nécessiter une étude du gène de la mucoviscidose par biologie moléculaire.

Une prise en charge précoce des malades permet de réduire la fréquence des manifestations cliniques, d'assurer une meilleure qualité de vie, dans l'attente d'un traitement spécifique conduisant à la guérison.

Fréquence : environ 1/4.000 bébés

LA MUCOVISCIDOSE



LES CINQ TROUBLES DÉPISTÉS

Annexe 2. Critères ANAES d'évaluation *a priori* d'un programme de dépistage (2004)

- **La maladie**
 - 1. Les répercussions de la maladie sur l'individu et la société doivent avoir été mesurées (en termes de morbidité/mortalité, d'impact socio-économique).
 - 2. L'épidémiologie et l'histoire naturelle de la maladie doivent être suffisamment connues (y compris le développement de la maladie du stade latent au stade déclaré).
 - 3. Toutes les interventions de prévention primaire coût-efficaces doivent, autant que possible, avoir été mises en œuvre.
- **Le test**
 - 4. Un test de dépistage simple à mettre en œuvre, fiable, reproductible et valide doit être disponible.
 - 5. Le test doit être acceptable par la population.
- **Le diagnostic**
 - 6. Un accord est nécessaire dans la communauté scientifique sur les investigations diagnostiques à poursuivre chez les personnes dont le test est positif et sur les choix disponibles pour ces individus.
- **L'intervention**
 - 7. Une intervention doit être efficace pour les patients identifiés précocement, avec la preuve que l'intervention plus précoce apporte de meilleurs résultats que l'intervention plus tardive.
 - 8. Une politique consensuelle et fondée sur les preuves d'identification des individus susceptibles de bénéficier de l'intervention est nécessaire, ainsi que des interventions adaptées susceptibles d'être dispensées.
- **L'efficacité et la sécurité du programme de dépistage**
 - 9. L'efficacité du programme de dépistage sur la réduction de la mortalité ou la morbidité doit être prouvée par des essais contrôlés randomisés de haute qualité, ou faire l'objet d'un consensus international.
 - 10. Les avantages du programme de dépistage doivent dépasser les inconvénients (causés par le test, les procédures diagnostiques et les interventions).
- **L'évaluation médico-économique du dépistage**

- 11. Le dépistage organisé se justifie lorsqu'il offre un rapport coût-efficacité avantageux relativement à une situation de référence (absence de dépistage ou dépistage individuel) et au regard de ce que le financeur est disposé à payer pour privilégier cette intervention de santé.
- **L'organisation du dépistage**
 - 12. Il doit y avoir un plan de gestion et de contrôle du programme de dépistage et un ensemble de standards d'assurance qualité reconnus par la communauté médicale.
 - 13. Une dotation adéquate en personnel et en équipements pour la pratique du test, le diagnostic, le traitement et la gestion de programme doit être disponible avant le commencement du programme de dépistage.
 - 14. Toutes les autres possibilités pour gérer la maladie doivent avoir été considérées (par exemple, amélioration de la prise en charge globale).
 - 15. Il faut assurer la continuité d'action dans la recherche des cas et non la considérer comme une opération exécutée « une fois pour toutes ».
 - 16. Afin d'assurer la participation optimale de la population cible, la meilleure information possible devrait être largement diffusée. Des programmes de sensibilisation devraient être organisés à la fois pour la population cible et les professionnels de la santé.
 - 17. Le manque d'information sur les aspects positifs et négatifs du dépistage est inacceptable sur le plan éthique et constitue une atteinte à l'autonomie de l'individu.
 - 18. Si un dépistage peut être systématiquement proposé, afin de garantir l'équité dans l'accès à celui-ci, les individus doivent rester libres d'accepter ou de refuser le test. Le consentement doit être obtenu après information sur les avantages et inconvénients du dépistage.
- **Le suivi et l'évaluation du programme de dépistage**
 - 19. Les critères et les indicateurs d'évaluation doivent être validés, en nombre limité, et choisis dès l'étape d'évaluation a priori sur la base des résultats de l'étude bibliographique ou de l'avis motivé d'experts.

Annexe 3. Arrêté du 22 février 2018

JORF n°0049 du 28 février 2018

texte n° 18

Arrêté du 22 février 2018 relatif à l'organisation du programme national de dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale

NOR: SSAP1805225A

ELI: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/texte>

La ministre des solidarités et de la santé et le ministre de l'action et des comptes publics,
Vu le [code de la santé publique](#), notamment ses articles L. 1411-6, R. 1131-4, R. 1131-21 et R. 1131-22 ;
Vu le [code de la sécurité sociale](#), notamment ses articles L. 161-40 et R. 160-8 ;
Vu l'avis de l'Agence de biomédecine en date du 11 janvier 2018 ;
Vu l'avis de la Haute Autorité de santé en date du 31 janvier 2018,
Arrêtent :

Article 1

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_1

Le dépistage néonatal recourant à des examens de biologie médicale constitue un programme de santé national au sens de l'[article L. 1411-6 du code de la santé publique](#).

Ce dépistage a pour objectif la prévention secondaire de maladies à forte morbi-mortalité, dont les manifestations et complications surviennent dès les premiers jours ou les premières semaines de vie et peuvent être prévenues ou minimisées par un traitement adapté si ce dernier est débuté très précocement.

Article 2

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_2

Les examens de biologie médicale du programme de dépistage néonatal sont réalisés sur un échantillon de sang total prélevé sur le brévier au plus tôt 48 heures après la naissance, au mieux à 72 heures.

Article 3

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_3

La réalisation du dépistage néonatal est proposée à titre gratuit pour tous les nouveau-nés.

Article 4

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_4

Le programme de dépistage néonatal est mis en œuvre dans chaque région par le centre régional de dépistage néonatal dont les missions sont définies par le cahier des charges qui figure à l'annexe 1.

Article 5

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_5

Lorsque les examens de biologie médicale nécessaires au dépistage néonatal ne peuvent, pour tout ou partie, être réalisés par le centre régional de dépistage néonatal, ils peuvent être réalisés par un centre régional relevant d'un autre ressort territorial. Une convention est signée à cet effet dans les conditions fixées par le cahier des charges qui figure à l'annexe 1.

Article 6

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_6

Les indicateurs de suivi de la réalisation du dépistage néonatal et de ses résultats sont définis en annexe 2.

Article 7

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_7

Le programme de dépistage néonatal concerne la liste des maladies ci-dessous :

Pour l'ensemble des nouveau-nés :

- la phénylcétonurie ;
- l'hypothyroïdie congénitale ;
- la mucoviscidose.

Pour les nouveau-nés nés à partir de trente-deux semaines d'aménorrhée :

- l'hyperplasie congénitale des surrénales ;

Pour les nouveau-nés présentant un risque particulier de développer la maladie :

- la drépanocytose.

Le dépistage de la phénylcétonurie s'effectue selon les modalités techniques définies en annexe 3.

Le dépistage de l'hypothyroïdie congénitale s'effectue selon les modalités techniques définies en annexe 4.

Le dépistage de la mucoviscidose s'effectue selon les modalités techniques définies en annexe 5.

Le dépistage de l'hyperplasie congénitale des surrénales s'effectue selon les modalités techniques définies en annexe 6.

Le dépistage de la drépanocytose s'effectue selon les modalités techniques définies en annexe 7.

Article 8

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_8

L'arrêté du 22 janvier 2010 fixant la liste des maladies donnant lieu à un dépistage néonatal est abrogé.

Article 9

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_9

Le présent arrêté entre en vigueur le 1er mars 2018.

Article 10

ELI: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/2/22/SSAP1805225A/jo/article_10

Le directeur général de la santé et la directrice de la sécurité sociale sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Annexe 4. Extrait de la notice technique Chromsystems

5.2 Reconstitution de l'étalon interne

L'étalon interne (n° de commande : 57004/FR) est utilisé en tant que calibrateur pour chacun des échantillons. Il s'agit d'une solution de concentration connue avec marquage isotopique. Après reconstitution, l'étalon interne est ajouté en quantités définies à chaque échantillon et est soumis au même mode opératoire.

Avant la préparation des échantillons, reconstituez l'étalon interne (n° de commande 57004/FR) avec 50 ml de tampon d'extraction. Procédez de la manière suivante :

1. Pipeter 5 ml de tampon d'extraction (n° de commande 57008) dans le flacon d'étalon interne
2. Laisser reconstituer pendant 5 minutes à une température comprise entre +20 et +25 °C en agitant plusieurs fois le flacon
3. Transférer le contenu du flacon dans un ballon jaugé de 50 ml
4. Rincer 2 fois le flacon d'étalon interne avec 5 ml de tampon d'extraction et transférer le contenu dans le ballon jaugé
5. Remplir le ballon jaugé avec le tampon d'extraction jusqu'à 50 ml et mélanger bien

Éviter la lumière directe du soleil. Les valeurs de concentration des paramètres dans l'étalon interne varient en fonction des lots. Les valeurs individuelles sont indiquées sur la notice accompagnant chaque étalon interne.

Conservation de l'étalon interne après reconstitution :

L'étalon interne dilué dans le tampon d'extraction peut être conservé de la manière suivante :

Tableau 5 : Conservation de l'étalon interne après reconstitution

Température de stockage	Durée de conservation	Autres conditions de stockage
+2 à +8 °C	3 semaines	protégé de la lumière, hermétiquement fermé

5.5 Préparation des échantillons avec plaque filtrante de 96 puits

Remarques

- Lors de la préparation des échantillons, veiller à n'utiliser que les réactifs, plaques et couvercles fournis par le fabricant. Toute modification du mode opératoire est susceptible de modifier les caractéristiques du kit de réactifs.
- Si des feuilles adhésives perçables (n° de commande 55013) sont utilisés pour l'injection, il est recommandé d'utiliser un injecteur automatique réfrigéré, afin de minimiser l'évaporation des échantillons.
- Des contrôles de qualité doivent être intégrés à chaque série d'analyses afin de valider la précision et l'exactitude des mesures.

1. Découpage de l'échantillon :

Positionner la plaque filtrante de 96 puits (REF 57057) sur une plaque de 96 puits à fond en V (REF 57010). Découper une pastille de sang séché de 3,2 mm de diamètre dans le papier buvard et la déposer dans la plaque filtrante de 96 puits.

2. Extraction :

Ajouter à chaque échantillon 200 µl de l'étalon interne reconstitué (cf. chapitre 5.2). Refermer la plaque filtrante de 96 puits avec une feuille adhésive pour plaques de 96 puits (n° de commande 55011) et agiter les plaques juxtaposées durant 20 minutes à +20 à +25 °C et à 600 tours/min.

3. Centrifugation :

Ôter la feuille adhésive de la plaque filtrante de 96 puits. Centrifuger le surnageant durant 2 minutes à 3000 x g dans la plaque de 96 puits à fond en V. Ôter la plaque filtrante de 96 puits et recouvrir la plaque de 96 puits avec une feuille adhésive perçable (n° de commande 55013) ou une feuille adhésive thermoscellable (n° de commande 57014).

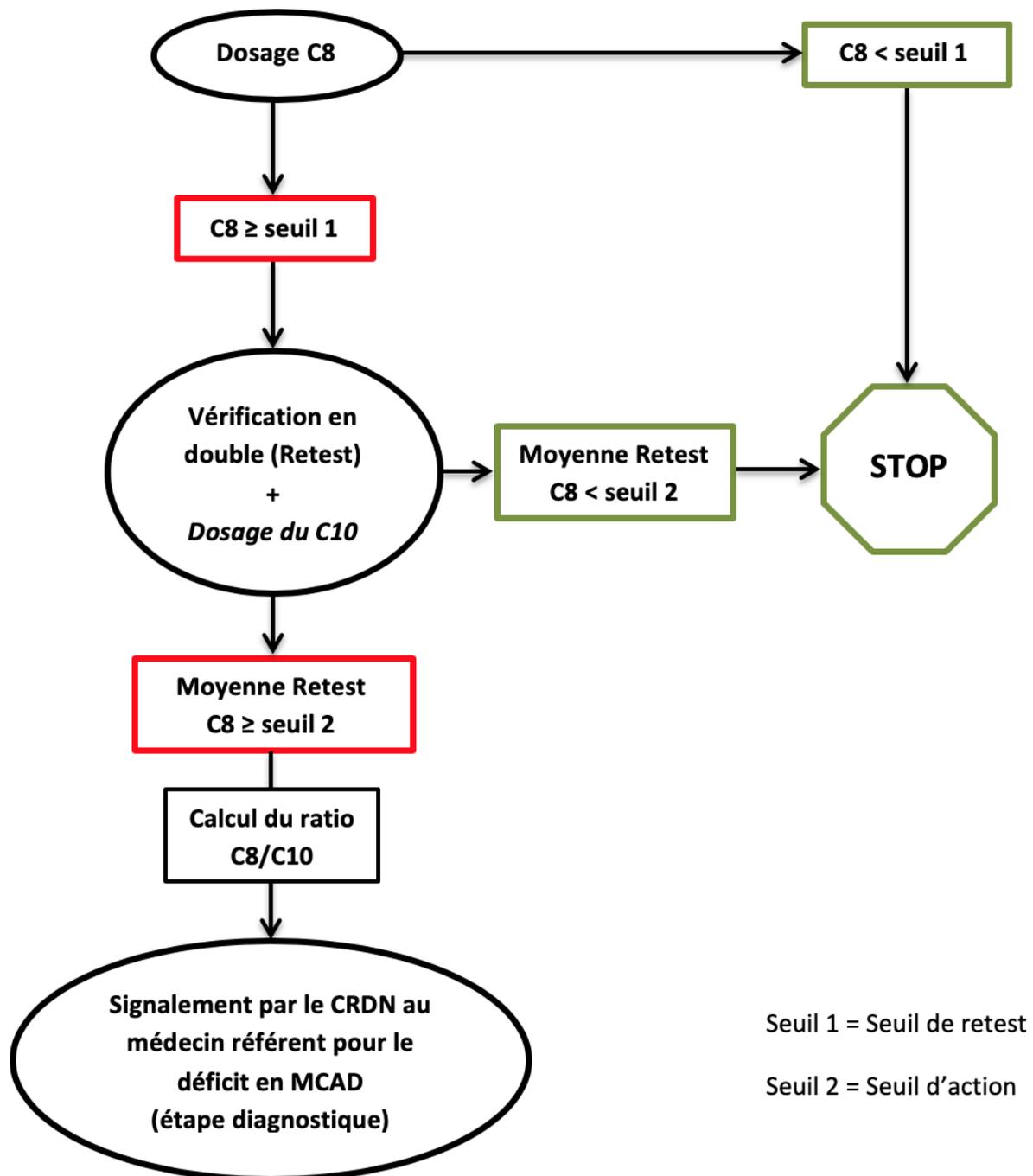
4. Injection :

Injecter ≤ 10 µl d'éluat dans le système LC-MS/MS.

Paramètres de l'instrument :

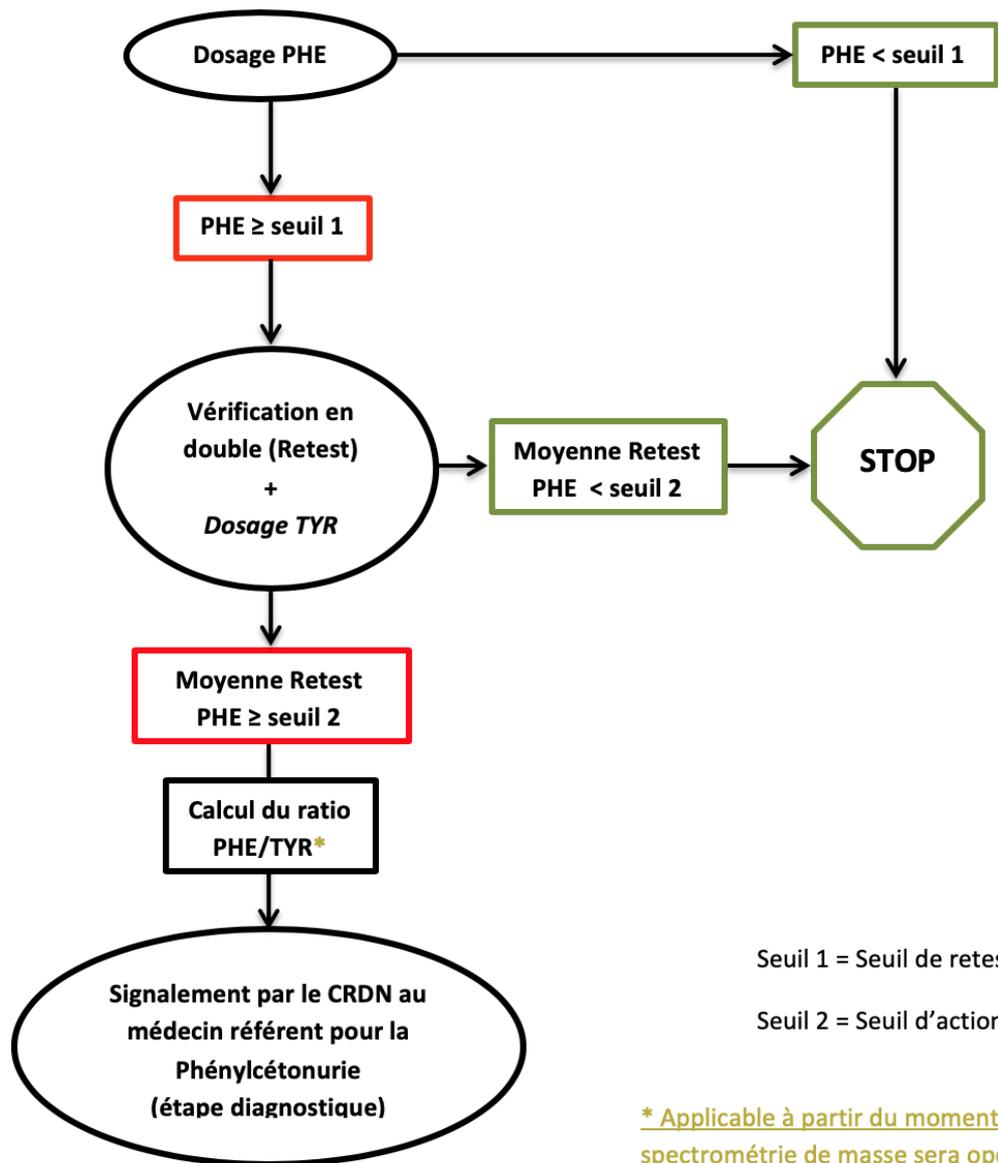
- Volume d'injection : 10 µL
- Durée de l'analyse : 1,7 minutes
- Gradient de débit : 20-600 µL/min
- Liquide de rinçage de l'aiguille pour l'injecteur : solution de rinçage

Annexe 5. Arbre décisionnel pour la démarche de dépistage néonatal du déficit en MCAD



Commission Biologique, 2020

Annexe 6. Arbre décisionnel pour la démarche de dépistage néonatal de la phénylcétonurie



Commission Biologique, 2020

Bibliographie

1. Corne C, Faure P. Le dépistage néonatal en France : approche biologique. *Rev Francoph des Lab*. 2018 Mar;2018(500):30–5.
2. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, Rupp K, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Jul 3;35(4):603–11.
3. Ziadeh R, Hoffman EP, Finegold DN, Hoop RC, Brackett JC, Strauss AW, et al. Medium chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. *Pediatr Res*. 1995 May;37(5):675–8.
4. Feillet F, Ogier H, Cheillan D, Aquaviva C, Labarthe F, Baruteau J, et al. Déficit en acyl-CoA-déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) : consensus français pour le dépistage, le diagnostic, et la prise en charge. *Arch Pédiatrie*. 2012 Feb;19(2):184–93.
5. Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis*. 2010 Oct;33(5):469–77.
6. Vishwanath VA. Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review. *Ann Neurosci*. 2016 Mar;23(1):51–5.
7. Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Hall CL, Corkey BE, Yang W, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Children with Non-Ketotic Hypoglycemia and Low Carnitine Levels. *Pediatr Res*. 1983 Nov;17(11):877–84.
8. de Lonlay P, Djouadi F, Bonnefont J., Saudubray J., Bastin J. La β -oxydation mitochondriale des acides gras : une voie métabolique essentielle du fonctionnement musculaire. *Arch Pédiatrie*. 2002 May 1;9:175–8.
9. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J*. 1992 Dec;6(15):3379–86.
10. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(10):2422–35.
11. EATON S, BARTLETT KB, POURFARZAM M. Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J*. 1996 Dec 1;320(2):345–57.
12. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006 Dec 1;1763(12):1413–26.
13. Janeiro P, Jotta R, Ramos R, Florindo C, Ventura F V., Vilarinho L, et al. Follow-up of fatty acid β -oxidation disorders in expanded newborn screening era. *Eur J Pediatr*. 2019 Mar 7;178(3):387–94.
14. Thangavelu S. Fatty Acid Oxidation disorders. *Indian J Pract Pediatr*. 2010 Apr;12(2):181–3.
15. Wajner M, Amaral AU. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep*. 2015 Nov 20;36(1):e00281.
16. Gartner V, McGuire PJ, Lee PR. Child Neurology: Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Neurology*. 2015 Jul 28;85(4):e37–40.

17. Gregersen N, Lauritzen R, Rasmussen K. Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria. *Clin Chim Acta*. 1976 Aug 2;70(3):417–25.
18. Gregersen N, Rosleff F, Kølvråa S, Hobolth N, Rasmussen K, Lauritzen R. Non-ketotic C6-C10-dicarboxylic aciduria: biochemical investigations of two cases. *Clin Chim Acta*. 1980 Mar 28;102(2–3):179–89.
19. Kølvråa S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. In vitro fibroblast studies in a patient with C6-C10-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 1982 Nov 24;126(1):53–67.
20. Howat AJ, Bennett MJ, Variend S, Shaw L. Deficiency of medium chain fatty acylcoenzyme A dehydrogenase presenting as the sudden infant death syndrome. *BMJ*. 1984 Mar 31;288(6422):976–976.
21. Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Kinnebrew P. Recognition of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in asymptomatic siblings of children dying of sudden infant death or Reye-like syndromes. *J Pediatr*. 1986 Jan 1;108(1):13–8.
22. Tanaka K, Yokota I, Coates PM, Strauss AW, Kelly DP, Zhang Z, et al. Mutations in the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene. *Hum Mutat*. 1992;1(4):271–9.
23. Gregersen N, Blakemore AIF, Winter V, Andresen B, Kølvråa S, Bolund L, et al. Specific diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in dried blood spots by a polymerase chain reaction (PCR) assay detecting a point-mutation (G985) in the MCAD gene. *Clin Chim Acta*. 1991 Nov;203(1):23–34.
24. Kelly DP, Whelan AJ, Ogden ML, Alpers R, Zhang ZF, Bellus G, et al. Molecular characterization of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci*. 1990 Dec 1;87(23):9236–40.
25. Matsubara Y, Narisawa K, Miyabayashi S, Tada K, Coates PM, Bachmann C, et al. Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 31;171(1):498–505.
26. Yokota I, Tanaka K, Coates P, Ugarte M, Ding J-H, Roe C, et al. Mutations in medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lancet (London, England)*. 1990 Sep 22;336(8717):748–9.
27. Bennett MJ, Allison F, Lowther GW, Gray RG, Johnston DI, Fitzsimmons JS, et al. Prenatal diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Prenat Diagn*. 1987 Feb;7(2):135–41.
28. Gregersen N, Winter V, Jensen PK, Holmskov A, Kølvråa S, Andresen BS, et al. Prenatal diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in a family with a previous fatal case of sudden unexpected death in childhood. *Prenat Diagn*. 1995 Jan;15(1):82–6.
29. Sermon K, Henderix P, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, Vanderfaeillie A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency [Internet]. Vol. 6, *Molecular Human Reproduction*. 2000.
30. Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 1997 Nov;43(11):2106–13.
31. Haute Autorité de Santé - Évaluation de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs

- erreurs innées du métabolisme par spectrométrie de masse en tandem. 1er volet: déficit en MCAD [Internet].
32. Matsubara Y, Narisawa K, Tada K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *Eur J Pediatr*. 1992 Mar;151(3):154–9.
 33. Iafolla AK, Thompson RJ, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr*. 1994 Mar;124(3):409–15.
 34. Grosse SD, Khoury MJ, Greene CL, Crider KS, Pollitt RJ. The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: an update. *Genet Med*. 2006 Apr;8(4):205–12.
 35. Merritt JL, Chang IJ. Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency [Internet]. GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 1993.
 36. Rhead WJ. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective. *J Inher Metab Dis*. 2006 Apr;29(2–3):370–7.
 37. Yokota I, Coates PM, Hale DE, Rinaldo P, Tanaka K. Molecular Survey of a Prevalent Mutation, 985A-to-G Transition, and Identification of Five Infrequent Mutations in the Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Gene in 55 Patients with MCAD Deficiency [Internet]. Vol. 49, *Am. J. Hum. Genet*. 1991.
 38. Kelly DP, Gordon JI, Alpers R, Strauss AW. The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1989 Nov 15;264(32):18921–5.
 39. Kim JJP, Wang M, Paschke R. Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 15;90(16):7523–7.
 40. Gregersen N, Winter V, Curtis D, Deufel T, Mack M, Hendrickx J, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency: The Prevalent Mutation G985 (K304E) Is Subject to a Strong Founder Effect from Northwestern Europe. *Hum Hered*. 1993;43(6):342–50.
 41. Storstein Andresen B, Dobrowolski SF, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, Udvari S, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Mutations Identified by MS/MS-Based Prospective Screening of Newborns Differ from Those Observed in Patients with Clinical Symptoms: Identification and Characterization of a New, Prevalent Mutation That Results i [Internet]. Vol. 68, *Am. J. Hum. Genet*. 2001.
 42. Jank JM, Maier EM, Reiß DD, Haslbeck M, Kemter KF, Truger MS, et al. The Domain-Specific and Temperature-Dependent Protein Misfolding Phenotype of Variant Medium-Chain acyl-CoA Dehydrogenase. Janecke AR, editor. *PLoS One*. 2014 Apr 9;9(4):e93852.
 43. Maier EM, Gersting SW, Kemter KF, Jank JM, Reindl M, Messing DD, et al. Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening. *Hum Mol Genet*. 2009 May 1;18(9):1612–23.
 44. Gregersen N, Bross P, Andresen BS. Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships. *Eur J Biochem*. 2004 Feb;271(3):470–82.
 45. Bross P, Andresen BS, Winter V, Kräutle F, Jensen TG, Nandy A, et al. Co-overexpression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of E. coli-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the

- prevalent disease-causing K304E mutation. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Oct 20;1182(3):264–74.
46. Gregersen N, Andresen BS, Bross P. Prevalent mutations in fatty acid oxidation disorders: diagnostic considerations. *Eur J Pediatr*. 2000 Dec;159 Suppl:S213-8.
 47. Touma EH, Charpentier C. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 1992 Jan 1;67(1):142–5.
 48. Wilcken B, Hammond J, Silink M. Morbidity and mortality in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 1994 May 1;70(5):410–2.
 49. Schatz UA, Ensenauer R. The clinical manifestation of MCAD deficiency: challenges towards adulthood in the screened population. *J Inherit Metab Dis*. 2010 Oct 8;33(5):513–20.
 50. Duran M, Hofkamp M, Rhead WJ, Saudubray JM, Wadman SK. Sudden child death and “healthy” affected family members with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*. 1986 Dec;78(6):1052–7.
 51. de Assis DR, Ribeiro CAJ, Rosa RB, Schuck PF, Dalcin KB, Vargas CR, et al. Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro. *Neurochem Res*. 2003 Aug;28(8):1255–63.
 52. Reis de Assis D, Maria R de C, Borba Rosa R, Schuck PF, Ribeiro CAJ, da Costa Ferreira G, et al. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Res*. 2004 Dec 24;1030(1):141–51.
 53. de Assis DR, Maria RC, Ferreira GC, Schuck PF, Latini A, Dutra-Filho CS, et al. Na⁺, K⁺ ATPase activity is markedly reduced by cis-4-decenoic acid in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Exp Neurol*. 2006 Jan;197(1):143–9.
 54. Schuck PF, Ceolato PC, Ferreira GC, Tonin A, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, et al. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. *Free Radic Res*. 2007 Nov 7;41(11):1261–72.
 55. Schuck PF, Ferreira G da C, Tonin AM, Viegas CM, Busanello ENB, Moura AP, et al. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res*. 2009 Nov 3;1296:117–26.
 56. Trauner DA. Regional Cerebral Na⁺+K⁺ ATPase Activity following Octanoate Administration. *Pediatr Res*. 1980 Jun;14(6):844–5.
 57. Scaini G, Simon KR, Tonin AM, Busanello ENB, Moura AP, Ferreira GC, et al. Toxicity of octanoate and decanoate in rat peripheral tissues: evidence of bioenergetic dysfunction and oxidative damage induction in liver and skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*. 2012 Feb 21;361(1–2):329–35.
 58. Amaral AU, Cecatto C, Da Silva JC, Wajner A, Wajner M. Mechanistic Bases of Neurotoxicity Provoked by Fatty Acids Accumulating in MCAD and LCHAD Deficiencies. *J inborn errors Metab Screen*. 2017;5:1–7.
 59. Lang TF. Adult presentations of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD). *J Inherit Metab Dis*. 2009 Dec 11;32(6):675–83.
 60. Feillet F, Steinmann G, Vianey-Saban C, de Chillou C, Sadoul N, Lefebvre E, et al. Adult presentation of MCAD deficiency revealed by coma and severe arrhythmias. *Intensive Care*

Med. 2003 Sep 1;29(9):1594–7.

61. Wilcken B, Carpenter KH, Hammond J. Neonatal symptoms in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 1993 Sep 1;69(3 Spec No):292–4.
62. Treem WR, Witzleben CA, Piccoli DA, Stanley CA, Hale DE, Coates PM, et al. Medium-chain and long-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: clinical, pathologic and ultrastructural differentiation from Reye's syndrome. *Hepatology*. 6(6):1270–8.
63. Derks TGJ, Reijngoud D-J, Waterham HR, Gerver W-JM, van den Berg MP, Sauer PJJ, et al. The natural history of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical presentation and outcome. *J Pediatr*. 2006 May;148(5):665–70.
64. Joy P, Black C, Rocca A, Haas M, Wilcken B. Neuropsychological functioning in children with medium chain acyl coenzyme a dehydrogenase deficiency (MCADD): the impact of early diagnosis and screening on outcome. *Child Neuropsychol*. 2009 Jan 29;15(1):8–20.
65. Ruitenbeek W, Poels PJ, Turnbull DM, Garavaglia B, Chalmers RA, Taylor RW, et al. Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 Feb 1;58(2):209–14.
66. Santos L, Patterson A, Moreea SM, Lippiatt CM, Walter J, Henderson M. Acute liver failure in pregnancy associated with maternal MCAD deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2007 Feb 20;30(1):103–103.
67. Ficicioglu C, Soler-Alfonso C, Bennett M. Screening for medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: current perspectives. *Res Reports Neonatol*. 2016 Jan 18;6:1.
68. Raymond K, Bale AE, Barnes CA, Rinaldo P. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: sudden and unexpected death of a 45 year old woman. *Genet Med*. 1999 Oct;1(6):293–4.
69. Yang B-Z, Ding J-H, Zhou C, Dimachkie MM, Sweetman L, Dasouki MJ, et al. Identification of a Novel Mutation in Patients with Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Mol Genet Metab*. 2000 Mar;69(3):259–62.
70. Patel JS, Leonard J V. Ketonuria and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1995;18(1):98–9.
71. Mayatepek E, Koch HG, Hoffmann GF. Hyperuricaemia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1997 Nov;20(6):842–3.
72. Davidson-Mundt A, Luder AS, Greene CL. Hyperuricemia in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*. 1992 Mar;120(3):444–6.
73. Olpin SE. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2004;70(3):293–308.
74. Duran M, Mitchell G, de Klerk JBC, de Jager JP, Hofkamp M, Bruinvis L, et al. Octanoic acidemia and octanoylcarnitine excretion with dicarboxylic aciduria due to defective oxidation of medium-chain fatty acids. *J Pediatr*. 1985 Sep;107(3):397–404.
75. Van Hove JLK, Zhang W, Kahler SG, Roe CR, Chen Y-T, Terada N, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency: Diagnosis by Acylcarnitine Analysis in Blood [Internet]. Vol. 52, *Am. J. Hum. Genet*. 1993.
76. Smith EH, Thomas C, McHugh D, Gavrillov D, Raymond K, Rinaldo P, et al. Allelic diversity

- in MCAD deficiency: The biochemical classification of 54 variants identified during 5years of ACADM sequencing. *Mol Genet Metab.* 2010 Jul;100(3):241–50.
77. Matern D, Rinaldo P. Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency [Internet]. GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 1993.
 78. Vianey-Liaud C, Divry P, Gregersen N, Mathieu M. The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 1987;10 Suppl 1:159–200.
 79. Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, et al. Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. *J Pediatr.* 1998 Jun;132(6):924–33.
 80. Gregersen N, Kølvrå S, Rasmussen K, Mortensen PB, Divry P, David M, et al. General (medium-chain) acyl-CoA dehydrogenase deficiency (non-ketotic dicarboxylic aciduria): quantitative urinary excretion pattern of 23 biologically significant organic acids in three cases. *Clin Chim Acta.* 1983 Aug 15;132(2):181–91.
 81. Duran M, De Klerk JB, Wadman SK, Bruinvis L, Ketting D. The differential diagnosis of dicarboxylic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 1984;7 Suppl 1:48–51.
 82. Tserng KY, Jin SJ, Kerr DS, Hoppel CL. Abnormal urinary excretion of unsaturated dicarboxylic acids in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Lipid Res.* 1990 May;31(5):763–71.
 83. Rinaldo P, O’Shea JJ, Coates PM, Hale DE, Stanley CA, Tanaka K. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *N Engl J Med.* 1988 Nov 17;319(20):1308–13.
 84. Rinaldo P, O’Shea JJ, Welch RD, Tanaka K. Diagnosis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by stable isotope dilution analysis of urinary acylglycines: retrospective and prospective studies, and comparison of its accuracy to acylcarnitine identification by FAB/mass spectrometry. *Prog Clin Biol Res.* 1990;321:411–8.
 85. Fisher L, Davies C, Al-Dirbashi OY, ten Brink HJ, Chakraborty P, Lepage N. A novel method for quantitation of acylglycines in human dried blood spots by UPLC-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2018 Apr;54:131–8.
 86. Okun JG, Kölker S, Schulze A, Kohlmüller D, Olgemöller K, Lindner M, et al. A method for quantitative acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using unlabelled palmitic acid: diagnosis of fatty acid oxidation disorders and differentiation between biochemical phenotypes of MCAD deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Oct 10;1584(2–3):91–8.
 87. Bouvier D, Vianey-Saban C, Ruet S, Acquaviva C. Development of a Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Measurement of Medium- and Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Activity in Fibroblasts. In: *JIMD reports.* 2016. p. 71–8.
 88. Wanders RJA, Ruiten JPN, IJLst L, Waterham HR, Houten SM. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Oct 20;33(5):479–94.
 89. Boles RG, Boesel C, Rinaldo P. Sudden death beyond SIDS. *Pediatr Pathol Lab Med.* 16(4):691–3.
 90. Zschocke J, Schulze A, Lindner M, Fiesel S, Olgemöller K, Hoffmann GF, et al. Molecular and functional characterisation of mild MCAD deficiency. *Hum Genet.* 2001 May;108(5):404–8.
 91. Haute Autorité de Santé. Prise en charge en cas de mort inattendue du nourrisson (moins de 2

- ans) [Internet]. 2007.
92. Acadm[gene] - ClinVar - NCBI [Internet].
 93. Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RKJ, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects—remaining challenges. *J Inher Metab Dis*. 2008 Oct 7;31(5):643–57.
 94. Maier EM, Liebl B, Röschinger W, Nennstiel-Ratzel U, Fingerhut R, Olgemöller B, et al. Population spectrum of *ACADM* genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Mutat*. 2005 May;25(5):443–52.
 95. ter Veld F, Mueller M, Kramer S, Haussmann U, Herebian D, Mayatepek E, et al. A novel tandem mass spectrometry method for rapid confirmation of medium- and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns. Malaga G, editor. *PLoS One*. 2009 Jul 30;4(7):e6449.
 96. Andresen BS, Dobrowolski SF, O'Reilly L, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Mutations Identified by MS/MS-Based Prospective Screening of Newborns Differ from Those Observed in Patients with Clinical Symptoms: Identification and Characterization of a New, Prevalent Mutation That Results i. *Am J Hum Genet*. 2001 Jun 1;68(6):1408–18.
 97. Sturm M, Herebian D, Mueller M, Laryea MD, Spiekerkoetter U. Functional Effects of Different Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Genotypes and Identification of Asymptomatic Variants. Ellis SR, editor. *PLoS One*. 2012 Sep 17;7(9):e45110.
 98. O'Reilly L, Bross P, Corydon TJ, Olpin SE, Hansen J, Kenney JM, et al. The Y42H mutation in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, which is prevalent in babies identified by MS/MS-based newborn screening, is temperature sensitive. *Eur J Biochem*. 2004 Oct 28;271(20):4053–63.
 99. Matsubara Y, Narisawa K, Tada K, Ikeda H, Yao YQ, Danks DM, et al. Prevalence of K329E mutation in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene determined from Guthrie cards. *Lancet (London, England)*. 1991 Aug 31;338(8766):552–3.
 100. Ensenuer R, Winters JL, Parton PA, Kronn DF, Kim J-W, Matern D, et al. Genotypic differences of MCAD deficiency in the Asian population: novel genotype and clinical symptoms preceding newborn screening notification. *Genet Med*. 7(5):339–43.
 101. Fromenty B, Mansouri A, Bonnefont J-P, Courtois F, Munnich A, Rabier D, et al. Most cases of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency escape detection in France. *Hum Genet*. 1996 Mar;97(3):367–8.
 102. Wang SS, Fernhoff PM, Harnnon WH, Khoury MJ. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Human genome epidemiology review. *Genet Med*. 1999 Dec;1(7):332–9.
 103. Leonard J V, Dezateux C. Newborn screening for medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 2009 Mar 1;94(3):235–8.
 104. Derks TGJ, van Spronsen FJ, Rake JP, van der Hilst CS, Span MM, Smit GPA. Safe and unsafe duration of fasting for children with MCAD deficiency. *Eur J Pediatr*. 2007 Jan 21;166(1):5–11.
 105. Walter JH. Tolerance to fast: rational and practical evaluation in children with hypoketonaemia. *J Inher Metab Dis*. 2009 Apr 4;32(2):214–7.

106. Touw CML, Smit GPA, Niezen-Koning KE, Bosgraaf-de Boer C, Gerding A, Reijngoud D-J, et al. In vitro and in vivo consequences of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase genotypes. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Mar 20;8(1):43.
107. Ahrens-Nicklas RC, Pyle LC, Ficicioglu C. Morbidity and mortality among exclusively breastfed neonates with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Genet Med*. 2016 Dec 5;18(12):1315–9.
108. Morris AA, Leonard J V. Early recognition of metabolic decompensation. *Arch Dis Child*. 1997 Jun;76(6):555–6.
109. Kim CS, Roe CR, Ambrose WW. L-Carnitine prevents mitochondrial damage induced by octanoic acid in the rat choroid plexus. *Brain Res*. 1990 Dec;536(1–2):335–8.
110. Huidekoper HH, Schneider J, Westphal T, Vaz FM, Duran M, Wijburg FA. Prolonged moderate-intensity exercise without and with L-carnitine supplementation in patients with MCAD deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2006 Oct 2;29(5):631–6.
111. Lee PJ, Harrison EL, Jones MG, Jones S, Leonard J V., Chalmers RA. L-Carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: A pilot study. *J Inher Metab Dis*. 2005 Apr;28(2):141–52.
112. Treem WR, Stanley CA, Goodman SI. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: metabolic effects and therapeutic efficacy of long-term L-carnitine supplementation. *J Inher Metab Dis*. 1989;12(2):112–9.
113. Stanley CA, Berry GT, Bennett MJ, Willi SM, Treem WR, Hale DE. Renal Handling of Carnitine in Secondary Carnitine Deficiency Disorders. *Pediatr Res*. 1993 Jul;34(1):89–96.
114. Lucas TG, Henriques BJ, Rodrigues J V., Bross P, Gregersen N, Gomes CM. Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2011 Dec;1812(12):1658–63.
115. Duran M, Cleutjens CB, Ketting D, Dorland L, de Klerk JB, van Sprang FJ, et al. Diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in lymphocytes and liver by a gas chromatographic method: the effect of oral riboflavin supplementation. *Pediatr Res*. 1992 Jan;31(1):39–42.
116. Derks TGJ, Touw CML, Ribas GS, Biancini GB, Vanzin CS, Negretto G, et al. Experimental evidence for protein oxidative damage and altered antioxidant defense in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2014 Sep 13;37(5):783–9.
117. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact*. 2006 Oct 27;163(1–2):94–112.
118. Pollitt RJ, Leonard J V. Prospective surveillance study of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the UK. *Arch Dis Child*. 1998 Aug 1;79(2):116–9.
119. Feuchtbaum L, Yang J, Currier R. Follow-up status during the first 5 years of life for metabolic disorders on the federal Recommended Uniform Screening Panel. *Genet Med*. 2018 Aug 7;20(8):831–9.
120. Pollitt R, Green A, McCabe C, Cooper N, Leonard J, Nicholl J, et al. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome [Internet]. *Health Technol Assess*. 1997. p. 1(7):i-iv; 1–202.

121. Pandor A, Eastham J, Chilcott J, Paisley S, Beverley C. Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care*. 2006;22(3):321–6.
122. van der Hilst CS, Derks TGJ, Reijngoud D-J, Smit GPA, TenVergert EM. Cost-effectiveness of neonatal screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the homogeneous population of The Netherlands. *J Pediatr*. 2007 Aug;151(2):115–20, 120.e1-3.
123. Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Chaplin M, Black C, et al. Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. *Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):37–42.
124. Lindner M, Gramer G, Haege G, Fang-Hoffmann J, Schwab KO, Tacke U, et al. Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases - Report of 10 years from South-West Germany *. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):44.
125. Catarzi S, Caciotti A, Thusberg J, Tonin R, Malvagia S, la Marca G, et al. Medium-Chain Acyl-CoA Deficiency: Outlines from Newborn Screening, *In Silico* Predictions, and Molecular Studies. *Sci World J*. 2013;2013:1–8.
126. Tal G, Pitt J, Morrisy S, Tzanakos N, Boneh A. An audit of newborn screening procedure: impact on infants presenting clinically before results are available. *Mol Genet Metab*. 2015 Mar;114(3):403–8.
127. Jager EA, Kuijpers MM, Bosch AM, Mulder MF, Rubio-Gozalbo ME, Visser G, et al. A Nationwide Retrospective Observational Study Of Population Newborn Screening For Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency In The Netherlands. *J Inherit Metab Dis*. 2019 Apr 23;jimd.12102.
128. Tran K, Banerjee S, Li H, Noorani HZ, Mensinkai S, Dooley K. Clinical efficacy and cost-effectiveness of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2007 Feb;40(3–4):235–41.
129. Venditti LN, Venditti CP, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM, Glick H, et al. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry for Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: A Cost-Effectiveness Analysis. *Pediatrics*. 2003 Nov;112(5):1005–15.
130. Nennstiel-Ratzel U, Arenz S, Maier EM, Knerr I, Baumkötter J, Röschinger W, et al. Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening. *Mol Genet Metab*. 2005 Jun;85(2):157–9.
131. Hsu H-W, Zytkevich TH, Comeau AM, Strauss AW, Marsden D, Shih VE, et al. Spectrum of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Detected by Newborn Screening. *Pediatrics*. 2008 May 1;121(5):e1108–14.
132. Dhondt JL, Farriaux JP. [The wonderful history of neonatal screening]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000;58(3):267–76.
133. Hirtz C, Lehmann S. Le prélèvement sanguin sur papier buvard : Une révolution de la biologie médicale en marche ? *Ann Biol Clin (Paris)*. 2015 Jan 1;73(1):25–37.
134. Coutant R, Feillet F. Présentation de l'état des lieux du dépistage néonatal en France. *médecine/sciences*. 2018 May 18;34:19–21.
135. Sarles J, Huet F, Cheillan D, Roussey M. Dépistage néonatal en France : quel avenir ? *Arch Pédiatrie*. 2014 Aug;21(8):813–5.

136. Tu W-J, He J, Chen H, Shi X-D, Li Y. Psychological Effects of False-Positive Results in Expanded Newborn Screening in China. Wools-Kaloustian KK, editor. PLoS One. 2012 Apr 27;7(4):e36235.
137. Bendavid C, Cheillan D, Collet C, Colombier M, Corne C, Denis M-C, et al. Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal selon la Norme NF EN ISO 15189 - Partie 2 : Phase analytique. 2014.
138. Wilson JMG, Jungner G. PRINCIPLES AND PRACTICE OF SCREENING FOR DISEASE [Internet].
139. Haute Autorité de Santé - Évaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par spectrométrie de masse en tandem. Volet 2 [Internet].
140. Marsden D, Larson C, Levy HL. Newborn screening for metabolic disorders. J Pediatr. 2006 May;148(5):577-584.e5.
141. Makni H, St-Hilaire C, Robb L, Larouche K, Blancquaert I. Spectrométrie de masse en tandem et dépistage néonatal des erreurs innées du métabolisme : Rapport technique [Internet]. 2007.
142. Derks TGJ, Boer TS, van Assen A, Bos T, Ruitter J, Waterham HR, et al. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency. J Inherit Metab Dis. 2008 Feb 14;31(1):88-96.
143. McCandless SE, Chandrasekar R, Linard S, Kikano S, Rice L. Sequencing from dried blood spots in infants with "false positive" newborn screen for MCAD deficiency. Mol Genet Metab. 2013 Jan;108(1):51-5.
144. Waddell L, Wiley V, Carpenter K, Bennetts B, Angel L, Andresen BS, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Genotype-biochemical phenotype correlations. Mol Genet Metab. 2006 Jan;87(1):32-9.
145. Arnold GL, Saavedra-Matiz CA, Galvin-Parton PA, Erbe R, Devincintis E, Kronn D, et al. Lack of genotype-phenotype correlations and outcome in MCAD deficiency diagnosed by newborn screening in New York State. Mol Genet Metab. 2010 Mar;99(3):263-8.
146. Bentler K, Zhai S, Elsbecker SA, Arnold GL, Burton BK, Vockley J, et al. 221 newborn-screened neonates with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: Findings from the Inborn Errors of Metabolism Collaborative. Mol Genet Metab. 2016 Sep 1;119(1-2):75-82.
147. Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. J Inherit Metab Dis. 2010 Oct 5;33(5):501-6.
148. Yusupov R, Finegold DN, Naylor EW, Sahai I, Waisbren S, Levy HL. Sudden death in medium chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency (MCADD) despite newborn screening. Mol Genet Metab. 2010 Sep;101(1):33-9.
149. Touw CML, Smit GPA, de Vries M, de Klerk JBC, Bosch AM, Visser G, et al. Risk stratification by residual enzyme activity after newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: data from a cohort study. Orphanet J Rare Dis. 2012 May 25;7(1):30.
150. Carpenter K, Wiley V, Sim KG, Heath D, Wilcken B. Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275 000 babies. Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed. 2001 Sep 1;85(2):105F - 109.

151. Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England newborn screening program. *Clin Chem*. 2001;47(11):1945–55.
152. Horvath GA, Davidson AGF, Stockler-Ipsiroglu SG, Lillquist YP, Waters PJ, Olpin S, et al. Newborn screening for MCAD deficiency: experience of the first three years in British Columbia, Canada. *Can J Public Health*. 2008;99(4):276–80.
153. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Results, outcome, and implications. *Pediatrics*. 2003 Jun 1;111(6 I):1399–406.
154. Hamers FF, Rumeau-Pichon C. Cost-effectiveness analysis of universal newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in France. *BMC Pediatr*. 2012 Dec 8;12(1):60.
155. GIP RESAH. Marché public : Fourniture, installation et maintenance de spectromètres de masses en tandem et fourniture de réactifs permettant la réalisation du dépistage néonatal de la phénylcétonurie et du déficit en MCAD - Paris [Internet]. 2019.
156. Chromsystems. Manuel d'utilisation pour le dosage par LC-MS/MS. MassChrom® Acides aminés et acylcarnitines sur sang séché (sans dérivation). 2020;
157. Oerton J, Khalid JM, Besley G, Dalton RN, Downing M, Green A, et al. Newborn screening for medium chain acyl-CoA ehydrogenase deficiency in England: Prevalence, redictive value and test validity based on 1.5 million creened babies [Internet]. Vol. 18, *Journal of Medical Screening*. Royal Society of Medicine Press; 2011. p. 173–81.
158. Wang B, Zhang Q, Gao A, Wang Q, Ma J, Li H, et al. New Ratios for Performance Improvement for Identifying Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiencies in Expanded Newborn Screening: A Retrospective Study. *Front Genet*. 2019 Sep 18;10:811.
159. Lovera C, Porta F, Caciotti A, Catarzi S, Cassanello M, Caruso U, et al. Sudden unexpected infant death (SUDI) in a newborn due to medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency with an unusual severe genotype. 2012;
160. Couce ML, Sánchez-Pintos P, Diogo L, Leão-Teles E, Martins E, Santos H, et al. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Regional experience and high incidence of carnitine deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):102.
161. Al-Jasmi FA, Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad SM, Souid AK. Inborn errors of metabolism in the United Arab Emirates: Disorders detected by newborn screening (2011–2014). In: *JIMD Reports*. Springer; 2016. p. 127–35.
162. Lund AM, Hougaard DM, Simonsen H, Andresen BS, Christensen M, Dunø M, et al. Biochemical screening of 504,049 newborns in Denmark, the Faroe Islands and Greenland - Experience and development of a routine program for expanded newborn screening. *Mol Genet Metab*. 2012 Nov;107(3):281–93.
163. Yokoi K, Ito T, Maeda Y, Nakajima Y, Ueta A, Nomura T, et al. Acylcarnitine Profi les during Carnitine Loading and Fasting Tests in a Japanese Patient with Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defi ciency. Vol. 213, *Tohoku J. Exp. Med*. 2007.
164. Stroup BM, Held PK, Williams P, Clayton MK, Murali SG, Rice GM, et al. Clinical relevance of the discrepancy in phenylalanine concentrations analyzed using tandem mass spectrometry compared with ion-exchange chromatography in phenylketonuria. *Mol Genet Metab Reports*.

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



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

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

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

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

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

Fanny ZHAO

MISE EN PLACE DU DEPISTAGE NEONATAL DU DEFICIT EN ACYL-COA
DESHYDROGENASE DES ACIDES GRAS A CHAINE MOYENNE (MCAD) PAR
SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM

RÉSUMÉ :

Le déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) est l'anomalie de la bêta-oxydation la plus fréquente, avec une incidence estimée autour de 1/15 000 en France. Il se présente généralement sous forme d'épisodes hypoglycémiques non-cétosiques pouvant se compliquer par un coma voire un décès. Ces épisodes de décompensation peuvent être évités par la mise en place de mesures préventives sous forme de règles hygiéno-diététiques.

Le dépistage néonatal est un programme de santé publique dont la vocation est de prévenir les conséquences souvent irréversibles de ce type de pathologie en détectant les malades avant l'apparition de symptômes en période néonatale, et en mettant en place d'emblée une prise en charge préventive. Ainsi, dans le contexte de l'extension du dépistage néonatal au déficit en MCAD en France, nous avons mis en place un dosage multiplex quantifiant l'octanoylcarnitine, la décanoylcarnitine et également la phénylalanine et la tyrosine (pour le dépistage de la phénylcétonurie) sur taches de sang total séché sur papier buvard et réalisé la vérification de méthode au laboratoire de dépistage néonatal du CHU Grenoble-Alpes. Nous avons ainsi pu démontrer la conformité des performances du kit MassChrom® de Chromsystems sur le spectromètre de masse en tandem (MS/MS) Waters® Xevo® TQD dans les conditions de travail du laboratoire selon la norme NF EN ISO 15189.

Le laboratoire est désormais prêt à proposer le dépistage du déficit en MCAD prévu au 3e trimestre 2020 au niveau national. L'introduction de la MS/MS permettra ensuite une extension du dépistage néonatal à d'autres erreurs innées du métabolisme.

MOTS CLÉS : déficit en MCAD, dépistage néonatal, spectrométrie de masse en tandem, vérification de méthode

FILIERE : Biologie médicale