



**HAL**  
open science

## Intérêt et validation du dosage des acides organiques urinaires au CHU d'Amiens

Maxime Bottelin

► **To cite this version:**

Maxime Bottelin. Intérêt et validation du dosage des acides organiques urinaires au CHU d'Amiens. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03036083

**HAL Id: dumas-03036083**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03036083>**

Submitted on 2 Dec 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.

**UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE  
FACULTÉ DE MÉDECINE D'AMIENS**

Thèse n°2020-143

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
MÉDECINE**

**DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE BIOLOGIE  
MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement le 9 octobre 2020 par

**Maxime BOTTELIN**

---

**Intérêt et Validation du dosage des acides  
organiques urinaires au CHU d'Amiens**

---

**JURY :**

**Président :** M. Le Professeur Antoine Galmiche  
**Membres du jury :** M. Le Professeur Djamal-Dine Djeddi  
M. Le Professeur Romuald Mentaverri  
Mme le Docteur Agnès Boullier  
**Directrice de thèse :** Mme le Docteur Charlotte Durand-Maugard

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES -----	2
REMERCIEMENTS -----	4
LISTE DES ABREVIATIONS -----	6
I. INTRODUCTION -----	8
1. Les erreurs innées du métabolisme -----	8
2. Acides organiques urinaires -----	9
1. Définition -----	9
2. Métabolisme -----	10
3. Aciduries organiques -----	11
1. Classification -----	11
2. Aciduries organiques les plus communes -----	13
A. Acidurie méthylmalonique (MMA) -----	13
B. Acidurie isovalérique -----	16
C. Leucinose -----	17
D. Acidurie propionique -----	17
3. Manifestations cliniques des aciduries organiques -----	18
4. Prise en charge médicale des aciduries organiques -----	20
4. Le dosage des acides organiques urinaires -----	20
1. Généralités sur la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GCMS) -----	20
1. La chromatographie en phase gazeuse (GC) -----	21
2. La spectrométrie de masse -----	22
5. Démarche qualité au laboratoire -----	25
II. OBJECTIFS -----	26
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES -----	26
1. Gestion des prélèvements -----	26
2. Préparation de l'échantillon -----	27
1. Extraction -----	28
2. Evaporation -----	28
3. Dérivatisation -----	28
4. Injection -----	29
3. Mise au point de la GCMS -----	29
1. Appareillage -----	29
2. Paramètres -----	29
3. Méthode -----	30
A. Création de la table des composés et paramétrage des ions de référence -----	30
B. Mise au point de l'intégration des pics -----	33
4. Etalonnage -----	34
5. Etalons internes -----	36
6. Contrôles de qualité -----	36
7. Interprétation -----	36
4. Validation analytique de la méthode : détermination des paramètres de validité -----	37
1. Répétabilité -----	38
2. Fidélité intermédiaire -----	38

3. Intervalle de mesure -----	38
4. Incertitude de mesure -----	39
5. Contamination inter-échantillons -----	39
6. Interférences -----	40
7. Comparaison de méthodes -----	40
8. Justesse -----	40
9. Exactitude -----	41
IV. RESULTATS -----	41
i. Répétabilité -----	41
ii. Fidélité intermédiaire-----	45
iii. Intervalles de mesure -----	48
1. Limite de détection et quantification -----	48
2. Limite supérieure de linéarité -----	51
iv. Contamination inter échantillons -----	51
v. Exactitude et incertitude de mesure -----	52
vi. Comparaison de méthode -----	66
1. Acide lactique -----	67
2. Acide glycolique -----	68
3. Acide 3OH isovalérique -----	68
4. MMA -----	69
5. EMA -----	70
6. Acide fumarique -----	70
7. Acide glutarique -----	71
8. Acide adipique -----	72
9. Acide subérique -----	72
10. Acide sébacique-----	73
11. Acide 2-OH glutarique-----	74
V. DISCUSSION-----	75
VI. CONCLUSION-----	80
LISTE DES ANNEXES -----	81
BIBLIOGRAPHIE-----	83

## REMERCIEMENTS

À mon Président de jury,

**Monsieur le Professeur Antoine Galmiche**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef du Service de Biochimie, Centre de Biologie Humaine

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, merci pour votre confiance et de l'intérêt que vous avez porté à ce projet, merci de m'avoir fait découvrir la recherche médicale. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

À mes juges,

**Monsieur le Professeur Djamal-Dine DJEDDI,**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (Pédiatre)

Responsable du centre d'activité « Médecine Pédiatrique », Pôle « Femme-Couple-Enfant »

Vous êtes à l'origine du projet DAOU et je vous en remercie, c'est un honneur de collaborer avec vous.

**Monsieur le Professeur Romuald Mentaverri,**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Pharmacie

Merci de m'avoir fait découvrir la transmission du savoir aux étudiants dès le début de mon internat, j'en garde un excellent souvenir.

**Madame le Docteur Agnès Boullier**

Maître de Conférence des Universités- Praticien Hospitalier

Service de Biochimie, Centre de biologie Humaine

Merci pour vos conseils en biochimie métabolique, merci de faire partie de ce jury.

À ma directrice de thèse ,

**Madame le Docteur Charlotte Durand-Maugard**

Praticien Hospitalier

Service de Biochimie, Centre de Biologie Humaine

Merci pour m'avoir guidé tout au long de ce travail, merci pour ton enseignement et ton écoute, j'ai beaucoup appris à tes côtés.

À ma famille, mon père, ma mère, ma soeur que je remercie pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces longues études

À Chloé, avec tout mon amour

À Francine et Roger, vous me manquez

À Claudine et André

À mes amis, Paul, Carl, Mélanie, Marion, Agathe, Edouard, Cécile, Stacy, Mehdi, Richard, Bertille ...

À ma belle-famille

À toute l'équipe de Biochimie du CHU d'Amiens, Eric, Nelly, Virginie

Au Dr Menouar, pour ses précieux conseils et son enseignement de la biologie polyvalente

À l'équipe du laboratoire du CHAM, Isabelle, Anne-Marie, Arnaud, Mike, Delphine, Carole, Jessica...

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé

AdoCbl: AdénosylCobalamine

ADN: acide désoxyribonucléique

AO: Acide Organique

AOU: Acide Organique Urinaire

BCKDH: Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex

BSTFA : Bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CQI: Contrôle de Qualité Interne

CV: Coefficient de variation

C17: heptadécanoate

EEQ: Evaluation Externe de la Qualité

EI: Etalon Interne

EIM: Erreur Innée du Métabolisme

ERNDIM: European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis, and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism.

ET: Ecart-type

FI: Fidélité Intermédiaire

FASST: Fast Automated Scan/SIM Type

GCMS: Gaz Chromatography with Mass Spectrometry

HL: Hématie leucocyte

HPST: Hôpital Patient Santé Territoire

IVA: Isovaleric aciduria

IVD: isovalérylCoA déhydrogenase

LBM: Laboratoire de Biologie Médicale

LCAD: Long Chain acylCoA dehydrogenase

MCEE: Méthylmalonyl CoA Epimerase

MCM: Méthylmalonyl CoA mutase

MeCbl: Méthylcobalamine

MHM: Maladie héréditaire du Métabolisme

MMA: Methylmalonic Aciduria

MSUD: Maple Syrup Urine Disease

NA: Non Applicable

NAA: N acétyl aspartate

NAGS: N acétyl glutamate synthase

PA: Propionic Aciduria

PCC: Propionyl CoA carboxylase

SFEIM: Société Française des Erreurs Innées du Métabolisme

SKML: Stichting Kwaliteitsbewaking Medische laboratoria

TcII: Transcobalamine II

TMS: triméthylsilyl

2PB: 2 PhénylButyrate



Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont des pathologies rares qui doivent être prises en charge le plus précocement possible. Les aciduries organiques font partie de ce groupe de pathologies. Elles résultent de la déficience d'une enzyme dans le métabolisme des sucres des lipides et des acides gras et entraînent l'accumulation des acides organiques dans les urines. En sa qualité de Centre Hospitalier de la région Picardie, le laboratoire de Biochimie avait besoin de développer une méthode de dosage permettant de réaliser le dosage des acides organiques urinaires pour subvenir aux besoins régionaux.

Nous avons donc mis au point une technique de dosage des Acides Organiques Urinaires (AOU) par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Nous avons validé la conformité de notre méthode à travers une série de tests répondant aux exigences de qualité d'un laboratoire de biologie médicale. Notre méthode s'est avérée fiable, robuste et comparable à celle de nos pairs. Nous pourrions donc l'utiliser en routine très prochainement. Nous aborderons dans un premier temps la présentation des aciduries organiques et le principe du dosage. Ensuite nous exposerons la méthode utilisée et sa mise au point. Puis nous détaillerons les paramètres utilisés pour évaluer les performances de cette technique et les résultats qui en découlent. Enfin, nous conclurons et exposerons les perspectives de travaux de recherche associés.

## I. INTRODUCTION

### 1. Les erreurs innées du métabolisme

Les aciduries organiques font partie de la famille des maladies héréditaires du métabolisme (MHM) également appelées erreurs innées du métabolisme.

Les EIM sont un groupe de maladies complexes ayant en commun la déficience d'activité d'une voie métabolique. Elles sont dues à une mutation de l'ADN qui va entraîner une modification de la protéine et donc de sa fonction. Lorsque la protéine touchée est une enzyme vitale, cela peut entraîner un déséquilibre important pour l'organisme. Les EIM représentent un tiers des maladies génétiques connues et ont une incidence entre 1/2000 et 1/4000 (1). *Les notes renvoient à la bibliographie page 83 à 86.*

On peut classer les MHM en trois grands groupes:

– groupe 1 : les « intoxications », groupe des maladies entraînant une intoxication progressive par l'accumulation de composés toxiques en amont du bloc enzymatique (troubles du

catabolisme des acides aminés et des sucres, aciduries organiques, déficits du cycle de l'urée).

– groupe 2 : les déficits énergétiques, impliquant le métabolisme énergétique cytoplasmique et mitochondrial.

– groupe 3 : les maladies par déficit de la synthèse ou du catabolisme des molécules complexes comprenant les maladies peroxysomales, lysosomales, les déficits héréditaires de la glycosylation, de la synthèse endogène du cholestérol.

Les MHM sont généralement du ressort de la pédiatrie car elles surviennent soit de façon aiguë chez le nouveau-né soit plus tard en provoquant un retard de développement chez l'enfant; leur diagnostic à l'âge adulte est très rare (1).

Le diagnostic des EIM fait appel au dosage des métabolites accumulés ou à la mise en évidence des métabolites déficients (comme le dosage des acides organiques dans l'urine pour les aciduries organiques) et nécessite le plus souvent d'être confirmé par une étude génétique pour rechercher la mutation en cause.

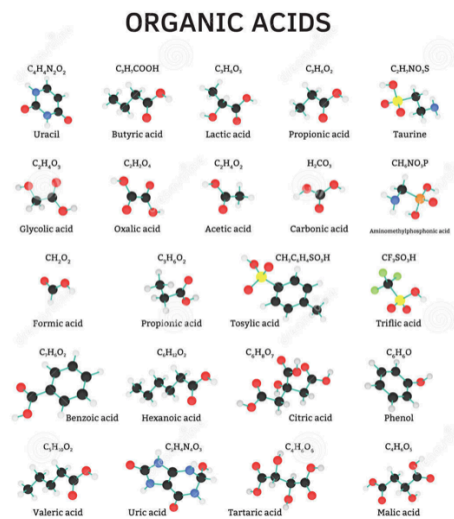
## 2. Acides organiques urinaires

### i. Définition

Les acides organiques (Figure I page 10) sont des composés comprenant au moins un ou plusieurs groupements acide carboxylique ou groupements acide phénolique mais ne comprenant pas de groupement aminés primaires (2).

Les acides organiques peuvent également contenir d'autres structures telles qu'un groupement hydroxyl, thiol ou ester. Ils prennent le nom de l'alcane duquel ils sont dérivés.

Leur solubilité dans l'eau décroît avec la longueur de leur chaîne ou leur poids moléculaire.



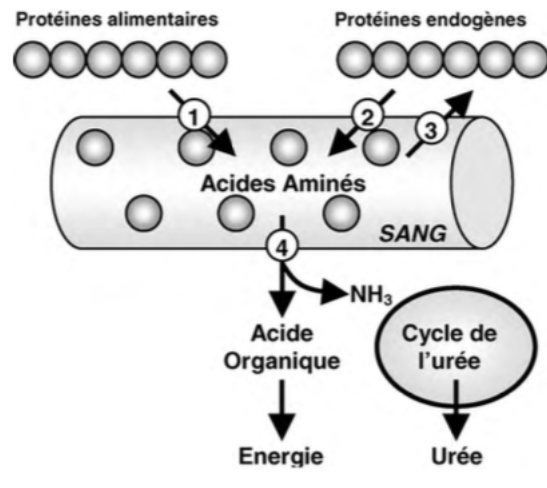
**Figure I : Exemples d'acides organiques les plus courants**

ii. Métabolisme

Les acides organiques urinaires (AOU) sont des intermédiaires physiologiques dans les voies métaboliques du catabolisme des acides aminés, des sucres ou des lipides (Figure II ci-contre). Plus de 250 acides organiques sont retrouvés dans les urines (3).

La déficience d'une enzyme ou d'un transporteur de protéines sur l'une de ces voies entraîne une accumulation d'acides organiques dans les urines.

Chaque acide organique utilise une voie métabolique où intervient une série d'enzymes tout au long du processus métabolique. Chaque enzyme est donc essentielle pour convertir une substance en une autre. Dans le cas où une ou des enzymes sont défectueuses, les produits s'accumulent au niveau d'un point de blocage et peuvent, en fonction de leur toxicité devenir nocifs pour l'organisme. L'acide organique qui s'accumule alors à cet endroit de la voie métabolique est ainsi excrété dans les urines et entraîne donc une acidurie organique. Le milieu de choix pour diagnostiquer la déficience de ces enzymes est donc l'urine car les AO s'y concentrent, mais il est également possible de réaliser l'analyse des AO dans d'autres milieux biologiques comme le plasma en post mortem lorsqu'une urine ne peut être obtenue (4) ou dans le liquide céphalorachidien en cas d'aciduries organiques « cérébrales » par exemple (5).



**Figure II : catabolisme des acides aminés**

*Légende: La dégradation des protéines aboutit à la production dans le sang d'acides aminés (1)(2), eux-mêmes nécessaires à la synthèse des protéines (3) . La dégradation irréversible des acides aminés se fait par des voies enzymatiques spécifiques.*

*Le groupement alpha-aminé, comportant l'azote, est transféré sous forme d'ammoniaque et dégradé en urée au niveau du foie par le « cycle de l'urée ». L'acide aminé, dépourvu de sa fonction azotée, devient alors un acide organique, qui va être dégradé par des enzymes.*

### 3. Aciduries organiques

#### i. Classification

Plus de 65 aciduries organiques ont été décrites (5). L'excrétion des acides organiques varie de valeurs inférieures à 10 mmol/mol de créatinine à des valeurs supérieures à 10000 mmol/mol de créatinine (6).

Elles regroupent des défauts dans les voies intermédiaires du métabolisme des sucres, des acides aminés ou des lipides mais également le métabolisme des purines, des pyrimidines, le cycle de Krebs, le cycle de l'urée et l'oxydation des acides gras.

Les aciduries organiques s'expriment le plus souvent sur un mode autosomique récessif. Leur incidence varie de 1/10000 à 1/1000000 naissances. Individuellement rares mais collectivement nombreuses, elles sont fréquemment diagnostiquées pendant la période néonatale (2).

Le tableau I résume les principales aciduries organiques avec chaque point de blocage (c'est à dire l'enzyme déficiente concernée) en annexe 1 page 81.

Acides organiques RAMIFIÉS (les plus importants quantitativement): AA leucine/isoleucine/valine	Acides organiques à CHAINES COURTES	Acides organiques DICARBOXYLIQUES à CHAINES MOYENNES	Acides organiques AROMATIQUES (dans le cytosol)	Acide lactique (fréquemment rencontré)
Leucinose (MSUD) <b>1</b>	Acidurie propionique <b>8</b>	Déficits héréditaires de l'oxydation mitochondriale des acides gras, (à l'entrée de la mitochondrie)	Phénylcétonurie	Du à l'hypoxie tissulaire souvent
Acidurie isovalérique <b>7</b>	MMA <b>9</b>	MCAD	Acidurie hydroxyphénylpyruvique	Troubles du métabolisme du lactate peu fréquent
Déficit en HMG CoA lyase <b>5</b>	Acidurie Glutarique type I et II <b>6</b>	LCAD	Acidurie homogentisique (alcaptonurie)	
Acidurie isobutyrique <b>2</b>	Acidurie hydroxyglutarique	SCAD	Acidurie xanthurénique	
3 méthylcrotonylglycinurie <b>3</b>	Acidurie 3 hydroxybutyrique <b>10</b>			
Acidurie 3 méthylglutaconique <b>4</b>	Acidurie éthylmalonique			
	Acidurie malonique			
	Acidurie fumarique			
	Maladie de Canavan: acidurie N-acétylaspartique			

### **Tableau I : principales aciduries organiques**

*MSUD: maple syrup urine disease, MCAD: middle chain acid deficiency, LCAD: long chain acid deficiency, SCAD: short chain acid deficiency). La maladie de Canavan est secondaire à un déficit en aspartoacylase qui permet normalement l'hydrolyse du N-acétylaspartate en L-aspartate et acétate (NAA). Le NAA est un marqueur neuronal. Un excès de NAA entraîne une accumulation hydrique dans les oligodendrocytes et une dégénérescence de la substance blanche (7).*

*Légende explicative en lien avec l'annexe 1 page 81.*

## ii. Aciduries organiques les plus communes

La majorité des aciduries organiques résultent du catabolisme anormal d'acides aminés à chaînes ramifiées ou de la lysine.

Nous allons détailler les quatre aciduries considérées comme les plus communes (figure III page 15) : l'acidurie isovalérique, l'acidurie propionique, l'acidurie méthylmalonique et, enfin, la maladie du sirop d'érable, trouble du métabolisme des acides aminés mais qui peut être également considérée comme une acidurie organique (5).

Ces 4 aciduries organiques sont transmises sur un mode autosomique récessif.

### A. Acidurie méthylmalonique (MMA)

La MMA est une acidurie à chaînes courtes. Elle est la conséquence d'une erreur dans le métabolisme du propionate, due à la déficience de la méthylmalonylcoA mutase (MCM), enzyme catalysant la transformation du L-méthylmalonylcoA en succinylcoA. La MCM est une enzyme vitamine B12 dépendante puisqu'elle est dépendante de son co-facteur l'Adénosylcobalamine (AdoCbl). La cobalamine d'origine alimentaire est liée au facteur intrinsèque gastrique (FI), absorbée dans l'iléon et transportée dans le sang en étant liée à la transcobalamine II (TCII), elle entre ensuite dans la cellule, est séparée de la TCII dans les lysosomes et est alors oxydée en cobalamine III dans le cytosol. La cobalamine III est ensuite transformée soit en méthylcobalamine cytosolique (MeCbl) ou en Adénosylcobalamine mitochondriale (AdoCbl). L'acidurie méthylmalonique peut résulter d'une déficience partielle ou complète de la méthylmalonylcoA mutase ou même d'une altération de la synthèse de son cofacteur. Dans ce dernier cas, la supplémentation en vitamine B12 peut corriger la déficience, cette forme peut être associée à des formes touchant les gènes impliqués dans la synthèse de l'AdoCbl également (cbIA et cbIB). Enfin, la déficience en méthylmalonylcoA-épimérase, qui transforme le d-méthylmalonylcoA en L-méthylmalonylcoA, substrat de la méthylmalonyl coA mutase, peut également être à l'origine d'une MMA. La MMA peut également être combinée à une autre maladie métabolique (tableau II page 14) : on parle alors de MMA combinées (tableau II).

MMAs isolées	MMAs combinées
MMA ne répondant pas à la vitamine B12 : Déficiency partielle ou complète de la méthylmalonique coA mutase	MMA combinée à l'homocystinurie (MMA-HC) : altération de la conversion hépatique de la cobalamine en méthyl et adénosylcobalamine
MMA répondant à la B12 : Synthèse altérée du MCM co facteur (AdoCbl), peut être associée à des formes touchant les gènes impliqués dans la synthèse de l'AdoCbl (formes type cbIA, cbIB)	MMA et acidurie malonique due à une déficiency d'une enzyme de la famille des acylCoA synthétases
Mutation du gène codant pour le MéthylmalonylCoA Epimérase (MCEE)	

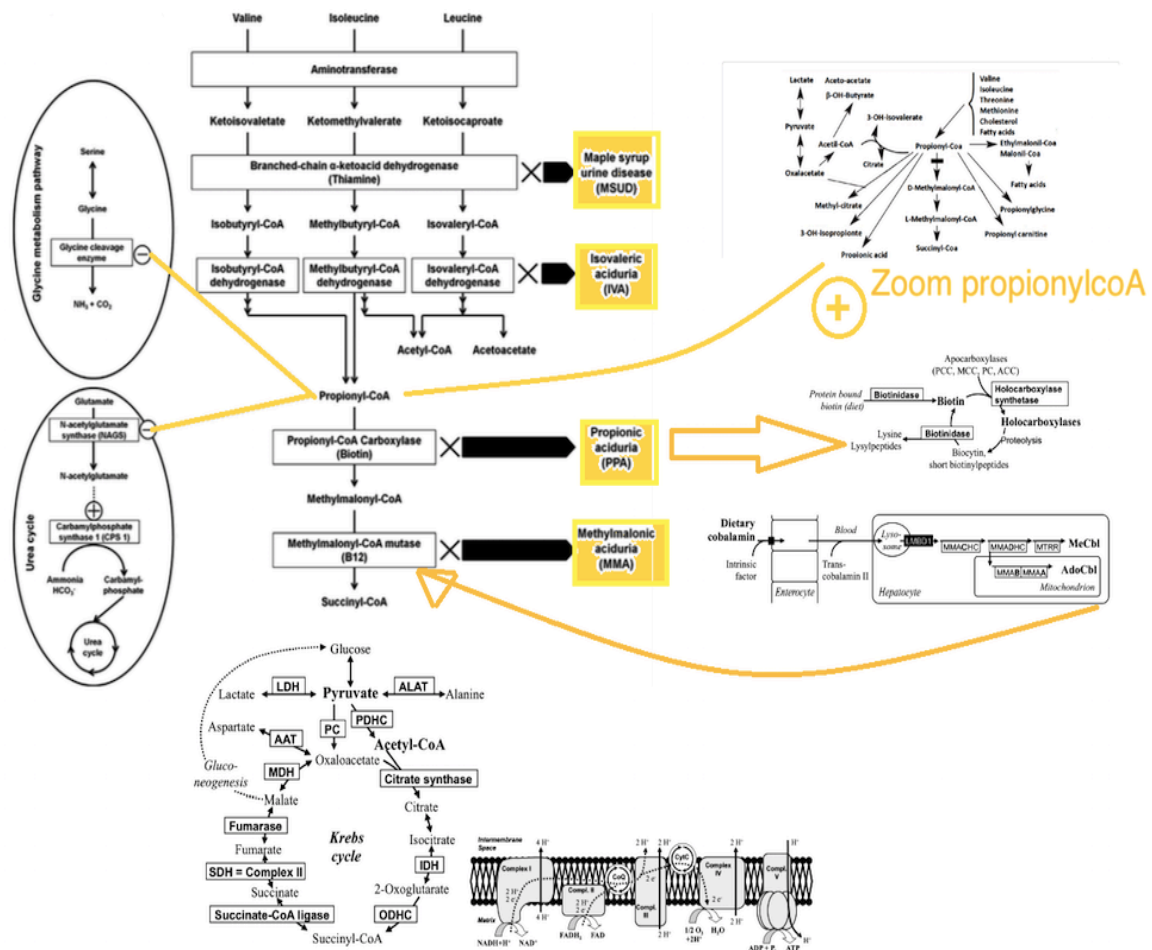
**Tableau II: Sous-classes de MMAs**

Ainsi, le blocage enzymatique observé dans les aciduries méthylmaloniques va entraîner des conséquences sur plusieurs voies métaboliques et donc l'accumulation de plusieurs métabolites qui seront retrouvés lors du dosage des acides organiques dans les urines :

- l'acide méthylmalonique par action de méthylmalonylCoA
- l'acide 3-hydroxypropionique : formé par une voie métabolique mineure du propionylCoA accumulé par beta oxydation (voir le zoom sur le propionylCoA dans la figure IV),
- l'acide 2 méthylcitrique : formé par la condensation du propionylCoA avec l'oxaloacétate
- et la tiglylglycine qui dérive du catabolisme de l'isoleucine.

Le propionylCoA accumulé bloque également le métabolisme de la glycine et de la NAGS (N acétyl glutamate synthétase) qui permet l'utilisation de l'ammoniaque par le cycle de l'urée.

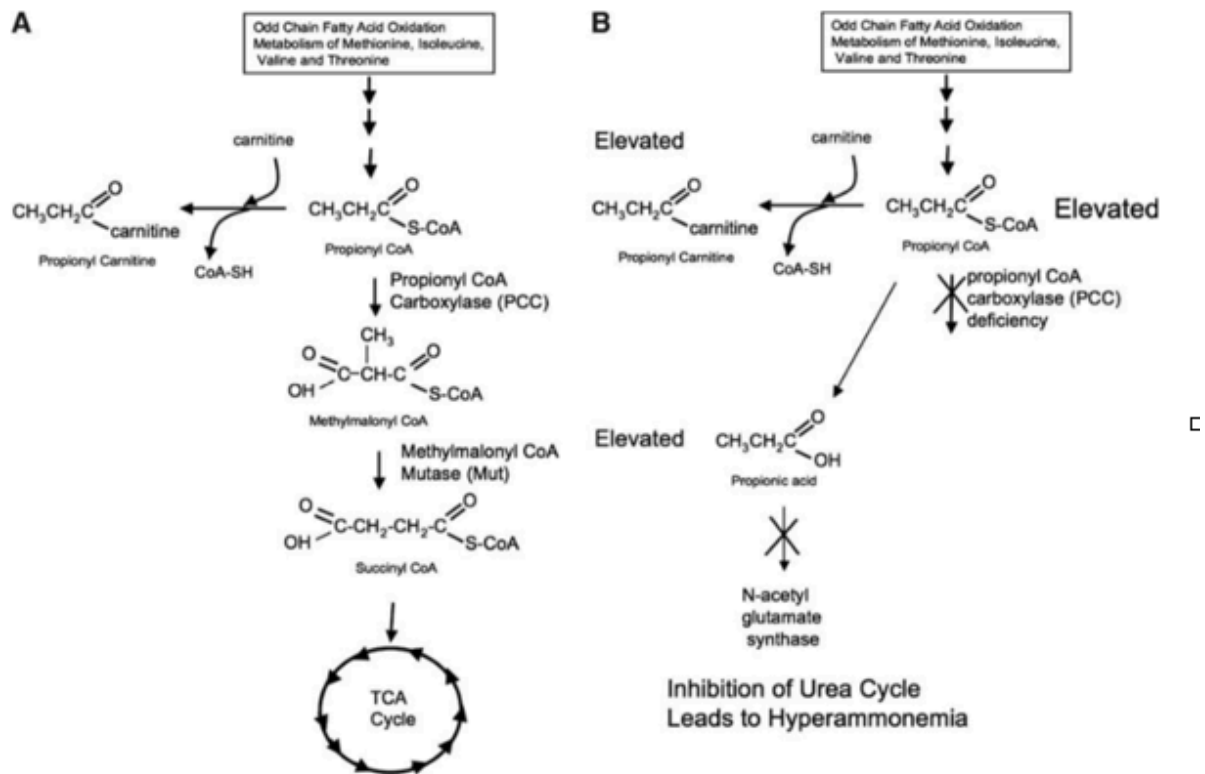
Enfin, l'absence de substrat produit type succinylCoA se répercute sur le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire par conséquent (5)(8)(9) (Figure III).



**Figure III : schéma général des aciduries les plus communes**

Légende: ce schéma reprend les voies des acides ramifiés exposées précédemment et les blocages enzymatiques associés aux aciduries dites « classiques ». Y est détaillé le métabolisme de la cobalamine, lié à la MCM par une flèche. On retrouve également un zoom sur le métabolisme du propionylCoA impliqué dans la MMA et la PA. Le propionylCoA provient du catabolisme de l'isoleucine, de la valine de la méthionine, de la thréonine et des acides gras. Les effets inhibiteurs de l'accumulation du propionylCoA sur la NAGS et le métabolisme de la glycine sont développés sur la gauche du schéma. Enfin, les répercussions et les liens directs avec le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire sont illustrés au bas du schéma.





**Figure IV : voies métaboliques de la propionylCoAcarboxylase (PCC) (10)**

Légende: un autre schéma pour montrer l'importance de la PCC et les conséquences du blocage de celle-ci. A: patient sain, B: patient atteint d'une acidurie propionique.

### B. Acidurie isovalérique

L'acidurie isovalérique (IVA) est la première acidurie décrite chez l'homme. Elle résulte de la déficience de l'isovalérylCoA déshydrogénase (IVD), une enzyme mitochondriale qui catalyse la troisième étape du catabolisme de la leucine : la déshydrogénation de l'isovalérylCoA en 3-méthylcrotonylCoA (figure III).

L'isovalérylCoA est également un inhibiteur de la N-acétyl glutamate synthétase qui produit le N-acétylglutamate qui permet ensuite l'activation de la Carbamylphosphate synthase 1 (CPS1) responsable de la condensation de l'ammoniac et du bicarbonate au début du cycle de l'urée. Une des conséquences de ce déficit est donc la survenue d'une hyperammoniémie comme pour le propionylCoA.

Le dérivé majeur de l'isovalérylCoA est l'isovalérylglycine (réaction catalysée par la glycine N acylase), toujours retrouvée en concentrations élevées dans l'IVA. En cas de crise, d'autres acides peuvent être observés comme l'acide lactique, l'acide 3hydroxybutyrique, l'acétoacétate, l'acide 3-hydroxyvalérique et l'acide isovalérylglycine (5).

### C. Leucinose

Egalement appelée « maladie du sirop d'érable » (ou MSUD en anglais) en raison de l'odeur particulière qu'elle confère à l'urine, la leucinose est due à un déficit d'activité du BCKDH (Branched chain alpha keto acid dehydrogenase complex) (figure III) impliqué dans le métabolisme des acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine et valine). Classiquement considérée comme une amino-acidopathie, la leucinose entraîne également des troubles des acides organiques (5).

La mutation d'un des 4 gènes du complexe BCKDH entraîne une perte de fonction protéique et conduit à l'un des 5 sous-types de leucinose. Les marqueurs biologiques sont des taux élevés d'acides ramifiés dans le sang mais également des taux élevés de cétoacides et d'hydroxyacides ramifiés dans les urines.

Le diagnostic de la leucinose est réalisé par la mise en évidence d'une augmentation des acides aminés ramifiés lors de la chromatographie des acides aminés sanguins, avec la présence pathognomonique d'alloisoleucine. La chromatographie des acides organiques urinaires corrobore le diagnostic en mettant en évidence la présence de cétoacides (2-cétoisocaproïque, 2-cétoisovalérique surtout, 2-céto-3-méthylvalérique, 2-hydroxyisocaproïque, 2-hydroxyisovalérique et 2-hydroxy-3-méthylvalérique).

### D. Acidurie propionique

L'acidurie propionique est due à un déficit en propionylCoA carboxylase (PCC) (Figure IV). La PCC est une carboxylase mitochondriale biotine dépendante qui catalyse la conversion du propionylCoA en méthylmalonylCoA (figure III).

Les marqueurs de cette pathologie sont des taux urinaires élevés d'acide 3-hydroxypropionique ainsi que la présence d'acide 2-méthylcitrique, de tiglyglycines et de propionylglycine (Figure III) normalement absents des urines (5).

L'acide 3-hydroxypropionique et la propionylglycine proviennent directement de l'accumulation de propionylCoA alors que les autres métabolites s'accumulent comme décrit ci-dessus pour la MMA.

### iii. Manifestations cliniques des aciduries organiques

On distingue de manière générale pour les aciduries organiques trois grandes présentations cliniques: la forme néonatale, la forme chronique intermittente et la forme chronique progressive.

La forme néonatale apparaît entre le quatrième et le septième jour généralement sous la forme d'une encéphalopathie métabolique de type « intoxication » (léthargie, difficultés alimentaires, déshydratation, hypotonie axiale/hypertonie segmentaire, myoclonies, troubles neuro-végétatifs).

Dans la forme chronique intermittente (signes pouvant apparaître jusqu'à l'âge adulte) sont généralement retrouvés des épisodes de coma acidocétosiques, une léthargie et ataxie, des signes neurologiques focaux, une obnubilation.

Enfin, la forme chronique progressive se présente généralement par un retard de croissance, un retard psychomoteur, une hypotonie, une anorexie, des infections récurrentes, une ostéoporose.

**La MMA** se caractérise par un retard mental, des signes neurologiques extrapyramidaux, une ostéoporose et une insuffisance rénale progressive.

L'âge de début est variable, les formes retards existent mais la majorité des patients présentent un épisode aigu de crise métabolique dans la première année de vie incluant vomissements, suivis d'une léthargie et d'un coma. Le phénotype le plus commun (ne répondant pas à la vitamine B12) se présente souvent sous la forme d'un patient normal à la naissance puis développant rapidement du fait de l'accumulation de composés toxiques des vomissements, une hépatomégalie, une hypotonie et une encéphalopathie hyperammonémique.

**L'acidurie isovalérique** se présente souvent sous une forme néonatale incluant un syndrome de dénutrition, vomissements et crises d'épilepsie. Une odeur de « chaussettes sales » peut parfois être observée en phase aiguë.

La leucinoase se présente sous quatre sous-types en fonction du degré d'atteinte de l'activité de l'enzyme :

- Forme néonatale sévère (2%): apparaît entre le 4ème et le 7ème jour : léthargie, perte de poids et encéphalopathie sévère, urine avec odeur caractéristique de sirop d'érable.

Une forte intoxication à la leucine peut conduire à un oedème cérébral et au coma.

- Forme intermittente (5-20%) avec une croissance et un développement normal ponctué par des épisodes de leucinoases en cas de stress, d'épisodes infectieux.

- Forme intermédiaire (3-30%) avec des conséquences neurologiques et éventuellement un retard mental.

- Forme avec activité résiduelle supérieure à plus de 40%, qui peut être traitée par la thiamine.

Enfin, **l'acidurie propionique** qui se présente sous sa forme néonatale le plus souvent avec dénutrition, vomissements, suivis de léthargie, crises épileptiques, coma pouvant conduire au décès. C'est l'accumulation de l'acide propionique dans le sang qui est à l'origine de l'acidose métabolique.

Le diagnostic d'une acidurie organique repose, devant les signes cliniques décrits ci-dessus, sur l'analyse des acides organiques dans les urines et peut être complété par le taux de carnitine, le profil des acylcarnitines, des études enzymatiques et un dosage des acides aminés plasmatiques et urinaires.

La carnitine joue un rôle dans le transport des acides gras du cytosol vers les mitochondries lors du catabolisme des lipides. Elle permet également la détoxification des acylcoenzymes A (acyl-CoA) qui s'accumulent dans la mitochondrie. On les retrouve alors sous forme d'acylcarnitines. En cas de déficit de l'oxydation des acides gras ou de certaines aciduries organiques, le profil des acylcarnitines, reflet de l'accumulation des acyl-CoA, devient le révélateur du déficit en cause, par exemple l'acidurie glutarique de type I ou un déficit en biotinidase (11). On peut donc également étudier l'oxydation des acides gras sur sang total in vitro (12). Le dosage des acides aminés plasmatiques permet d'explorer les déficits portant sur le métabolisme des acides aminés et les anomalies des transporteurs des acides aminés (12). L'accumulation intra-mitochondriale de métabolites liés au CoA est une différence importante entre de nombreuses aciduries organiques et les aminoacidopathies.

#### iv. Prise en charge médicale des aciduries organiques

Dans la prise en charge des aciduries organiques, il faut distinguer le traitement d'urgence, qui permet de lutter contre le catabolisme par des apports intra-veineux de glucose à forte dose, une prise en charge symptomatique de l'acidose et une suppression des apports protéiques et le traitement au long cours qui se base sur un régime et une supplémentation adaptés au trouble observé.

Prenons l'exemple de l'acidurie propionique avec une accumulation d'acide 3 hydroxy - propionique par oxydation du propionylcoA et une hyperammoniémie.

L'acidurie propionique entraîne secondairement une insuffisance en carnitine, résultant de la conversion en propionylcarnitine du propionylcoA afin de restaurer le coA libre dans la mitochondrie.

Le traitement de cette acidurie organique comprend donc un régime pauvre en acides aminés précurseurs (isoleucine, valine, méthionine, thréonine), une supplémentation en L-carnitine et enfin un traitement antibiotique ponctuel pour diminuer l'acide propionique d'origine digestive (13).

#### 4. Le dosage des acides organiques urinaires

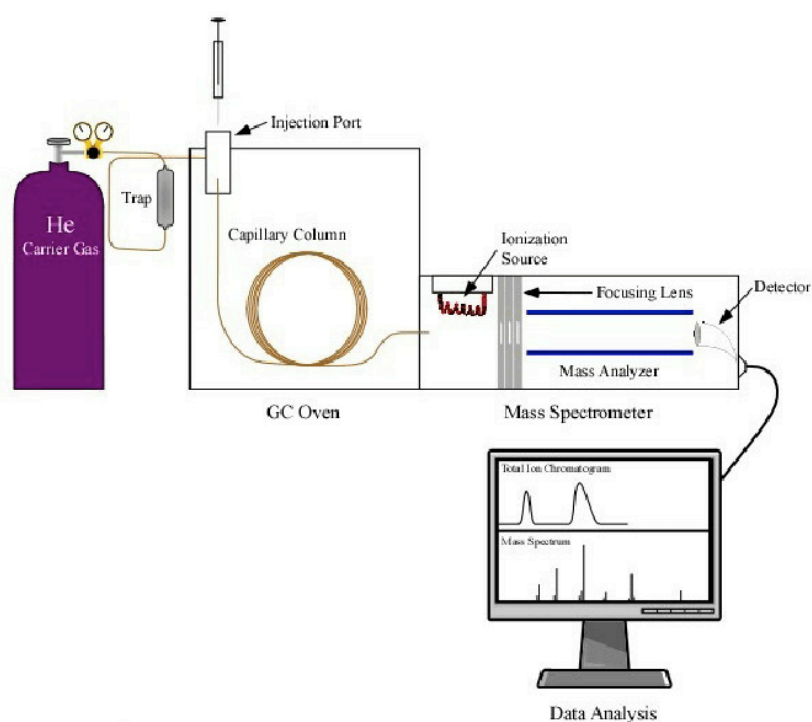
Les aciduries sont mises en évidence par un dosage réalisé sur une chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

##### i. Généralités sur la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GCMS)

La spectrométrie de masse est une analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification (14).

Elle permet d'identifier et de quantifier des molécules de faible masse moléculaire. Couplée à la chromatographie phase gazeuse, elle est la méthode de référence pour l'analyse des acides organiques urinaires (11). La chromatographie gazeuse permet la séparation des molécules présentes dans un échantillon urinaire en fonction de leur température d'ébullition et de leurs interactions avec la phase stationnaire (la colonne séparative). Après une étape de

préparation, les échantillons sont injectés dans la colonne, soumis à un débit de gaz vecteur. Les molécules se séparent alors en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire en sortie de colonne chromatographique, elles sont dirigées vers la source d'ionisation du spectromètre de masse où elles sont ionisées par impact électronique provoquant leur fragmentation. Les fragments ainsi obtenus sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse-sur-charge ( $m/z$ ) par le champ magnétique d'un quadripôle avant d'être collectés par un détecteur.



**Figure V: Schéma général de la Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**

### i. La chromatographie en phase gazeuse (GC)

La GC est une technique analytique séparative utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés organiques volatils.

Le principe fondamental de la séparation par GC est le partage des composés entre une phase mobile (un gaz vecteur inerte) et une phase stationnaire solide ou liquide, immobilisée à l'intérieur de la colonne.

Lors de leur traversée dans la colonne, les molécules passent continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire.

La séparation des composés dépend de plusieurs paramètres : la température, le débit du gaz, et la nature de la phase stationnaire.

Les composants essentiels d'un système de GC sont donc : le gaz vecteur, le système d'injection (figure V), la colonne d'analyse, dans un four à température contrôlée, et le système de détection, relié à un système d'enregistrement et de traitement de données.

Le système d'injection possède deux grands modes : split ou splitless. Le mode split est un mode d'injection avec diviseur de flux qui permet d'injecter de très faibles volumes évitant ainsi de saturer la colonne. Le mode split correspond à un ratio entre la partie réellement injectée dans la colonne et celle dirigée vers l'extérieur de l'appareil.

Le four contient l'élément principal de la séparation chromatographique : la colonne, dont la surface interne est recouverte de molécules plus ou moins polaires en fonction des analytes à rechercher.

La colonne sépare les composants en fonction de leur volatilité et de leur polarité. Le temps de rétention d'une substance à analyser est en fonction de sa température d'ébullition (volatilité) et des interactions entre les groupes fonctionnels (polarité) et ceux de la phase stationnaire. Le choix de la phase stationnaire est donc important.

Pour l'analyse des acides organiques urinaires, on préférera une phase stationnaire non polaire pour permettre la séparation de composés non polaires.

## ii. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse destructive (15). Elle permet de déterminer la masse moléculaire d'une substance et/ou d'obtenir des données structurales. Grâce à la MS, il est possible d'identifier et de quantifier les analytes présents dans un échantillon. Cette technique mesure les rapports masse-sur-charge ( $m/z$ ) de molécules ionisées à l'état gazeux.

Les molécules sont rendues volatiles par l'étape de silylation avec l'ajout de TMS lors de la préparation de l'échantillon.

En sortie de chromatographie, le spectromètre de masse effectuera une ionisation puis une analyse des rapports  $m/z$ .

Le spectromètre de masse est donc constitué de trois parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

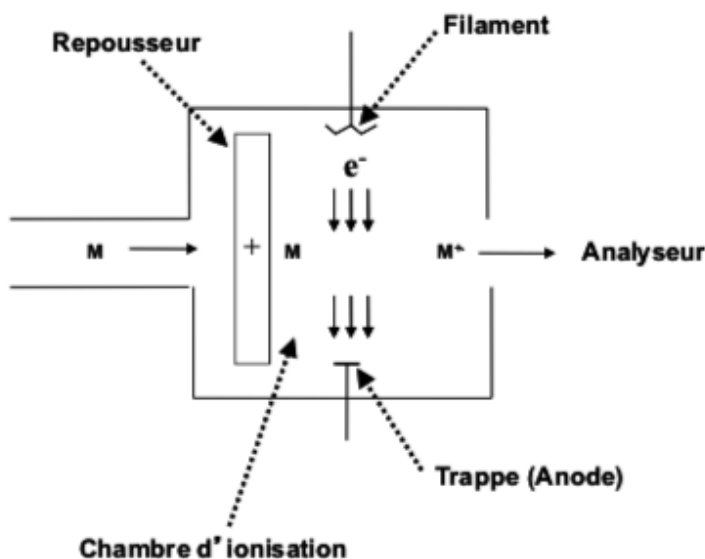
La source d'ionisation utilisée est une source à ionisation électronique (figure VI ci-dessous). L'ionisation électronique consiste à bombarder les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. La source comprend un filament chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés vers une anode, appelée piège ou trappe.

Le faisceau d'électrons entre alors en collision avec les molécules sous forme gazeuse présentes dans la source et leur arrache un électron pour former l'ion moléculaire  $M^+$ .

$M^+$  est alors expulsé vers l'analyseur grâce à une plaque portée à un potentiel positif et appelée repousseur.

Le potentiel d'ionisation (énergie nécessaire à l'ionisation d'une molécule par expulsion d'un électron de valence) se situe autour de 10 eV. Les composés à analyser étant bombardés par un faisceau de 70 eV, la différence augmente l'énergie interne de la molécule et intervient dans les processus de fragmentation si l'énergie apportée à la molécule dépasse le potentiel d'apparition (énergie nécessaire à l'apparition de fragments).

En d'autres termes, l'énergie des électrons incidents est telle que l'ion  $M^+$  acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés ions-fils ou fragments.



**Figure VI: chambre d'ionisation**

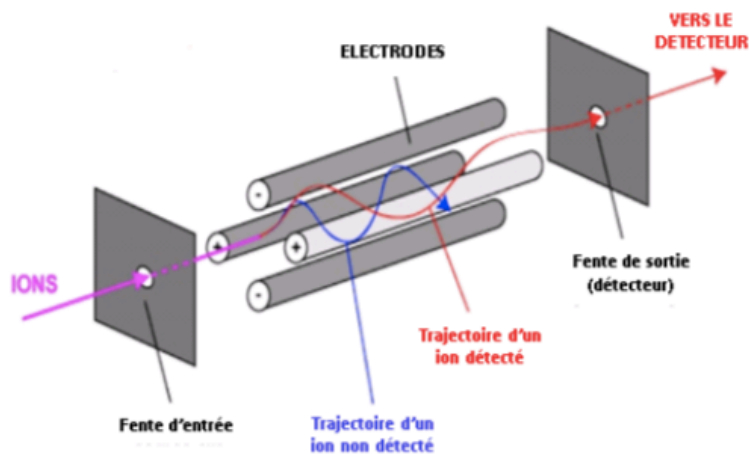




**Figure VII: à gauche : système d'injection , à droite : chambre d'ionisation**

L'analyseur permet ensuite de séparer les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ .

Cet analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles reliées deux à deux (Figure VIII). L'ion entrant dans le quadripôle est soumis à un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant. Le mouvement des ions à l'intérieur du quadripôle dépend de la masse  $m$  de l'ion ainsi que de sa charge  $z$ . Il existe des zones de stabilité dans lesquelles des ions de masse  $m$  peuvent avoir un mouvement stable et donc rester piégés. Les ions sont donc d'abord tous piégés, confinés dans une certaine gamme de masses, puis éjectés sélectivement en direction du détecteur. Le spectre de masse est obtenu en augmentant progressivement la tension pour déstabiliser les trajectoires des ions en fonction de leurs masses croissantes.



**Figure VIII : analyseur quadripolaire**

Il existe une tension continue (U) et une tension alternative (V) entre les 4 électrodes. U et V sont réglées de sorte à ce que seul un ion de rapport m/z choisi puisse se frayer un chemin jusqu'au détecteur (trajectoire stable). Pour obtenir des mesures sur une gamme de rapports m/z, on modifie les réglages de l'appareil à haute fréquence. Le quadripôle fonctionne ainsi comme un filtre à ions. Les ions sélectionnés par le quadripôle sont ensuite détectés, traités par le système informatique puis convertis en spectre de masse.

## 5. Démarche qualité au laboratoire

Depuis la loi HPST de 2010, les laboratoires doivent entreprendre une démarche de qualité approuvée par l'accréditation, cette accréditation est obligatoire pour tous les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM).

L'accréditation des analyses porte sur les phases pré-analytique, analytique et post-analytique de l'examen de biologie médicale.

L'accréditation s'appuie sur des normes internationales. Elle est notifiée par un organisme indépendant faisant autorité, le COFRAC (Comité Français d'Accréditation) qui certifie en toute impartialité la compétence de l'organisme à réaliser des activités spécifiques. Les normes NF EN ISO 15189 (16) et NF EN ISO/CEI 17025 définissent les exigences générales concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale et des laboratoires d'essai.

Ainsi, le laboratoire doit se référer à un guide bonne pratique (SH GTA 04) qui formule des exigences concernant la vérification/validation des méthodes en biologie médicale (17).

Le dosage des acides organiques urinaires pourra être soumis à accréditation selon la norme NF EN ISO 15189.

Le COFRAC définit les différents types de portée à accréditer. Une portée détermine le choix d'utilisation de l'accréditation par les LBM (laboratoire de biologie médicale) et conditionne les modalités d'évaluation et de suivi de l'accréditation. Il y a deux catégories de portées, la portée A qui évalue des méthodes reconnues et la portée B qui offre la possibilité d'employer des méthodes développées ou adaptées par le LBM, c'est le cas ici pour le dosage des acides organiques urinaires. D'un point de vue analytique (SH INF 50), le dosage des acides organiques urinaires entre dans la ligne de portée BB02, en portée B (18).

## II. OBJECTIFS

Au vu de la gravité des manifestations cliniques des aciduries organiques, comme nous l'avons exposé, il est impératif de diagnostiquer rapidement les patients suspects.

Les erreurs innées du métabolisme se déclarent chez le nourrisson ou le petit enfant et sont donc diagnostiquées dans les services de pédiatrie en collaboration avec le laboratoire de biochimie spécialisée.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode de dosage des acides organiques urinaires par GCMS, cette méthode devra ensuite satisfaire aux exigences des normes de qualité d'un laboratoire de biologie médicale afin d'assurer la qualité du rendu du résultat et de l'interprétation clinico-biologique qui en découle.

Actuellement sous-traitée auprès du laboratoire de Biochimie Métabolique du CHRU de Lille, la mise en place de cette technique permettrait également au service de biochimie du CHU d'Amiens d'étendre son domaine de compétences du point de vue métabolique. Une étude rétrospective sur 3 ans a montré un volume moyen de 180 demandes de dosage des acides organiques urinaires au CHU d'Amiens, la nécessité de réaliser ce test dans notre laboratoire est donc avérée.

Nous avons développé une méthode de dosage des AOU puis procédé à sa validation analytique. Nous avons ensuite travaillé sur l'interprétation des profils chromatographiques et appliqué notre dosage à une population néonatale atteinte de cholestase.

## III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Gestion des prélèvements

Le dosage des acides organiques urinaires est réalisé sur un prélèvement urinaire. Il est préférable de prélever une urine du matin, préférentiellement en période de crise. Il est recommandé d'indiquer l'heure du prélèvement, le régime alimentaire ainsi que les traitements médicamenteux et les renseignements cliniques nécessaires au traitement post analytique. L'urine doit être acheminée au laboratoire dans un tube à urines en plastique sans conservateur. Le volume minimal nécessaire à l'analyse est de 1mL (19).

La durée de conservation maximale à température ambiante est de 6 heures, à +4°C 24 heures et à -20°C plusieurs mois (19). Cependant, une étude de stabilité portant sur 5 acides

organiques réalisée en 2017 (20) montre une stabilité de 5 acides organiques à température ambiante jusqu'à 48h. La même étude a testé la conservation des échantillons à travers les cycles de congélation/décongélation: elle est portée à 9 cycles.

Le groupe de travail « Biologie et Qualité » de la société française des erreurs innées du métabolisme (SFEIM) a émis des recommandations concernant l'analyse des acides organiques urinaires sur lesquelles nous avons basé notre mise au point de méthode. Parmi ces recommandations, le groupe conseille un acheminement au laboratoire le plus rapide possible avec congélation en cas de délai d'acheminement de plus de 6 heures (19).

La réalisation d'une bandelette urinaire est systématique pour détecter une potentielle contamination bactérienne qui modifierait l'interprétation des résultats (la présence de nitrites ou d'un pH élevé est en faveur d'une contamination) (19).

## 2. Préparation de l'échantillon

La créatinine urinaire est dosée sur l'échantillon afin de le diluer, l'interprétation des concentrations en acides organiques ne pouvant se faire qu'après normalisation sur la créatinine. En fonction de la créatinine du prélèvement, nous procédons à une dilution de l'urine avec du NaCl 9‰ :

CRÉATININE URINAIRE	DILUTION
< ou = 1,5 mmol/L	Urine pure
1,5-2,5 mmol/L	1/2
2,5-3,5	1/3
3,5-4,5	1/4

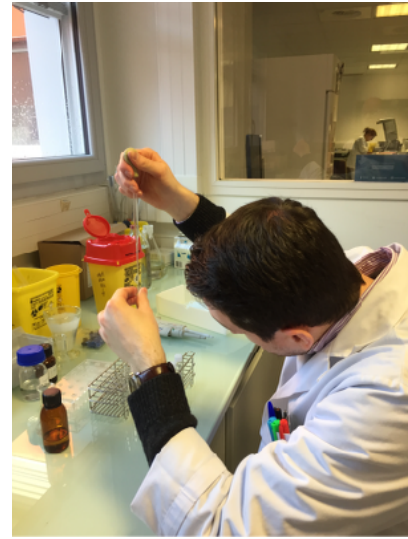
**Tableau III: dilution du prélèvement en fonction de la créatine urinaire**

Une phase de pré-traitement est toujours nécessaire pour extraire la molécule à doser de l'échantillon et éliminer les protéines et autres grosses molécules pouvant interférer avec l'analyse sur le système chromatographique. Nous avons testé la méthode la plus couramment utilisée et reconnue (19)(20)(21).

### i. Extraction

La première étape du prétraitement est une étape d'extraction des acides organiques urinaires à l'acétate d'éthyle. On réalise cette extraction trois fois au minimum.

Dans un tube à hémolyse en verre, nous ajoutons 1 ml d'échantillon puis 200  $\mu$ l d'HCl 2.4 N (20 ml d'HCl concentré avec 100 ml d'eau distillée) et 30  $\mu$ l d'Étalon Interne (EI). L'étalon interne est un composé dont une quantité connue est ajoutée à l'échantillon dès le début du protocole, dont l'analyse recouvre toute la procédure, qui permet de corriger les pertes pendant la préparation de l'échantillon et son analyse en prenant en compte les effets matrices globaux (22).



Nous ajoutons ensuite un bouchon de NaCl en poudre pour saturation du liquide puis nous agitons 15 secondes. Viennent ensuite les étapes d'extractions :

- Ajout de 2ml d'acétate d'éthyle dans le tube patient
- Centrifugation à 3000 tours/minute 4°C pendant 5 minutes
- Récupération de la phase supérieure dans un autre tube à hémolyse à l'aide d'une pipette HL. Ces 3 étapes sont répétées trois fois pour assurer une extraction suffisante des acides organiques.

### ii. Evaporation

Le tube est ensuite placé sous courant d'azote dans un bain-marie à 40°C (1/2h à 3/4h) à l'aide d'un évaporateur à aiguilles jusqu'à obtention d'un résidu sec.

### iii. Dérivatisation

La dérivatisation est une étape essentielle. Elle permet de rendre les AO volatils par transformation en dérivés triméthylsilyl (TMS), ce qui est indispensable à leur analyse par chromatographie gazeuse : dans le tube à hémolyse avec l'extrait sec, on ajoute 50  $\mu$ l de

chloroforme et 50 µl de BSTFA puis l'échantillon est placé au Thermobloc 80°C pendant 45 min avant de mettre la totalité de l'échantillon en Vial pour injecter dans l'automate.

#### iv. Injection

Sur le portoir de la GC MS, nous plaçons les vials qui sont récupérés par la machine afin d'en injecter le contenu dans le système chromatographique.

### 3. Mise au point de la GCMS

#### i. Appareillage

Afin de développer notre propre technique de dosage, nous nous sommes intéressés aux techniques de dosage décrites dans la littérature. (21)(11) Le laboratoire de biochimie du CHU d'Amiens dispose d'un appareil de Chromatographie Gazeuse associé à un spectromètre de masse Shimadzu™ (figure IX). Ce matériel offre des seuils de détection compatibles avec les concentrations attendues des acides organiques urinaires. Nos travaux nous ont amenés à travailler en collaboration avec les équipes de Lille pour la mise en place et les ajustements sur notre machine.



**Figure IX: Appareil Shimadzu QC2010SE**

#### ii. Paramètres

Pour l'analyse dans notre laboratoire nous avons utilisé une chromatographie Gazeuse Shimadzu™ modèle QC2010SE couplée à un spectromètre de masse équipé d'un système d'injection capillaire en mode split porté à une température de 250°C avec un split ratio à 15.0. La colonne, une colonne Shimadzu SH-Rxi-5ms (30M 0,25 mmID, 0,25µm df) est

directement reliée à la source d'ionisation. Le gradient de température est programmé de 80°C à 250°C à 5°C/min et le flux d'hélium est programmé à 1,5 ml/min. Les données sont acquises par scan répétés allant de 50 à 500 amu. Le temps de rétention et l'aire de chaque pic est automatiquement déterminée par le logiciel et l'identité de la molécule est obtenue en interrogeant la base de données NIST.

### iii. Méthode

Pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé des échantillons urinaires conservés congelés au laboratoire de biochimie du CHU Amiens Picardie. Ces échantillons ont servi pour les nombreux essais nécessaires à la mise en place de notre méthode.

#### A. Création de la table des composés et paramétrage des ions de référence

Le groupe de travail de la SFEIM préconise une liste de 13 acides organiques à rendre systématiquement de façon quantitative. Nous avons choisi de mettre au point la méthode sur la base de ces 13 composés (tableau IV page 31). Chaque composé est identifié grâce à son temps de rétention, un ion Target et un ou deux ions de référence.

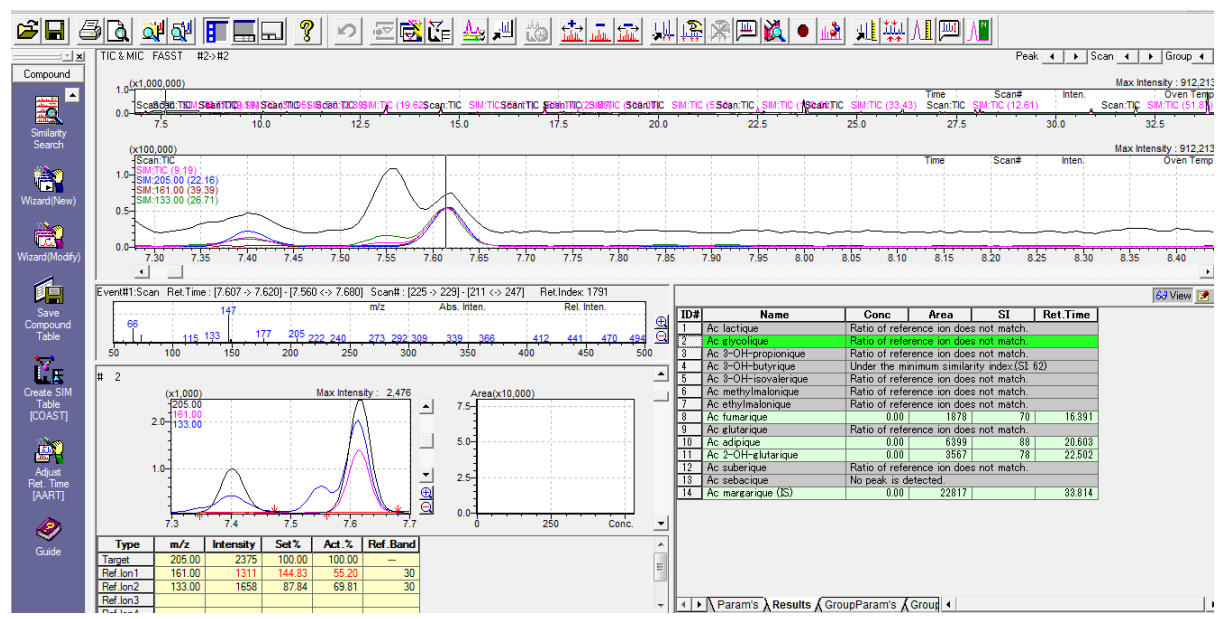
Le temps de rétention d'une molécule est le temps que met le composé à traverser la colonne en fonction de son affinité pour cette phase mobile, pour un gradient de température donné.

Après l'étape d'ionisation, les fragments sont séparés en fonction de leur rapport masse-surcharge ( $m/z$ ) par l'application d'un champ magnétique à l'aide d'un quadripôle, puis collectés par un détecteur. L'ensemble des ions fragmentés constitue le « spectre de masse » caractéristique de la molécule et permettant de l'identifier.

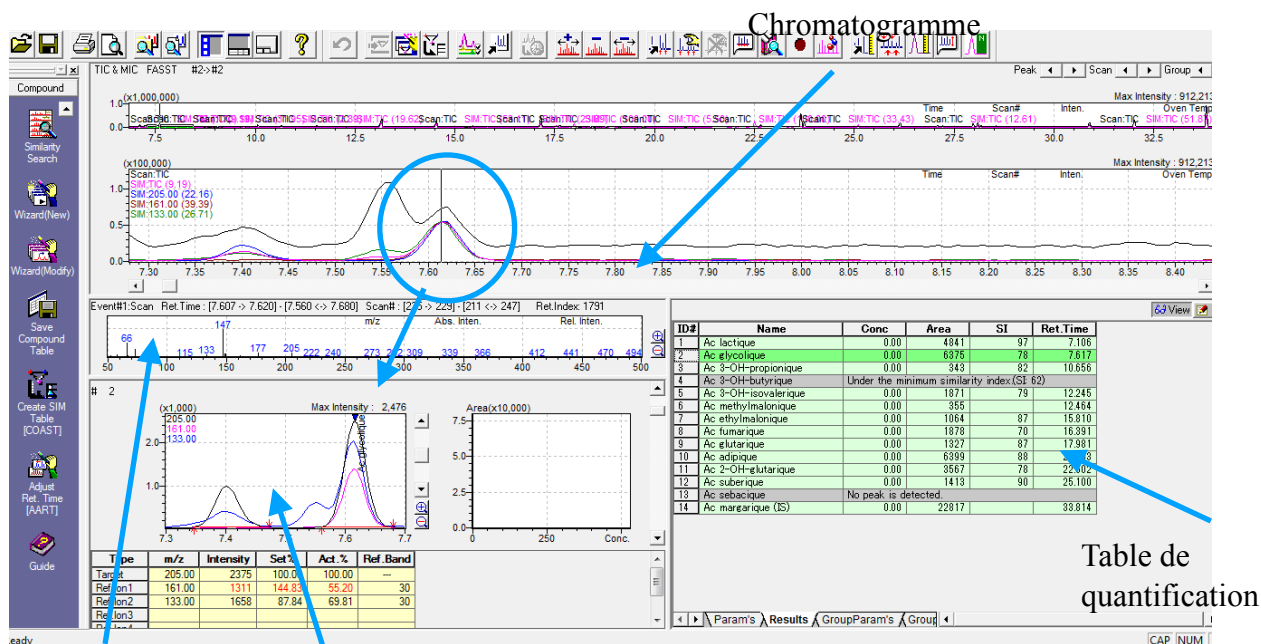
L'ion Target est le fragment majoritaire obtenu après fragmentation et correspond au rapport  $m/z$  du fragment. Il est utilisé pour la quantification. Les ions de références sont des ions de confirmation, ils assurent une spécificité plus importante de la reconnaissance des molécules. Les ions Target choisis sont le plus proche possible de la masse moléculaire (14).

Acide organique urinaire	temps de rétention	Ion target	lons de référence
Acide lactique	7,015	117	191;219
acide glycolique	7,5	133	205;161
Acide 3OH butyrique	10,6	191	133;177
Acide 3OH propionique	10	147	219;177;133
acide 3OH isovalérique	12,2	131	247
Acide méthylmalonique	12,4	218	131;247
acide éthylmalonique	14,5	201	
acide fumarique	16,3	133	245;171
acide glutarique	17	158	261;129
acide adipique	20,5	111	275;172
acide 2OH glutarique	22,4	129	203;247
acide subérique	25,0	303	169;129
acide sébacique	30,25	158	104;360
acide margarique (EI)	33,80	342	
2PB (EI)	17,10	221	118;119;236

**Tableau IV: 13 composés quantifiés et leurs critères d'identification**







Spectre de masse      Ions target + ions de référence

**B**

**Figure X: Exemple de paramétrage des ions de référence**

A: avant choix des ions de référence

B: après choix des ions de référence

Ci-dessus est présenté un exemple de la programmation des ions Target et de référence. Les pics sont bien présents dans le premier cas mais la molécule n'est pas identifiée. Après ajustements des ions, les molécules sont correctement identifiées. De plus, deux molécules peuvent avoir des ions de références identiques, il a donc fallu tester plusieurs combinaisons de choix d'ions sur les 13 composés. Certaines molécules n'ont pas d'ions de référence comme l'acide éthylmalonique puisqu'il partageait ses ions avec l'acide glutarique, nos essais ont démontré qu'il nous fallait mieux s'affranchir des ions de références pour cet acide.

La SFEIM a établi une liste complémentaire de composés à quantifier si besoin (tableau V). Les composés en rouge font partie des composés à rechercher systématiquement en mode manuel.

Ces composés sont des clés d'identifications qui permettent de confirmer une pathologie suspectée avec des résultats anormalement élevés dans la liste des 13 composés. Par exemple, la présence d'acide glutarique élevé doit nous faire rechercher l'acide 3-OH glutarique qui est anormalement élevé dans le cas d'une acidurie glutarique de type I. Ou bien, dans le cas

d'une acidurie isovalérique on peut avoir des taux augmentés d'acide 3-OH isovalérique et il faut donc rechercher l'isovalérylglycine qui confirme l'hypothèse diagnostique.

Acides organiques urinaires à quantifier si besoin
Malonique
4hydroxybutyrique
Méthylsuccinique
Glycérique
3méthylglutarique
3méthylglutaconique
Malique
Pyroglutamique
3hydroxyglutarique
3hydroxy3méthylglutarique
2cétoglutarique
Nacétylaspartique
Méthylcitrique
Homogentisique
Mévalonique
Propionylglycine
Butyrylglycine
2méthylbutyrylglycine
Isovalérylglycine
3méthylcrotonylglycine
Tiglylglycine
Hexanoylglycine
Subérylglycine

**Tableau V: liste complémentaire des acides à quantifier si besoin**

### B. Mise au point de l'intégration des pics

L'intégration des pics est une étape essentielle de l'analyse après traitement de l'échantillon. Ainsi chaque molécule éluée dans la colonne est représentée par un pic sur le chromatogramme. Le chromatogramme est la représentation en 2 dimensions du signal analysé par chromatographie. Les deux dimensions communément retrouvées sur un chromatogramme sont le temps et l'intensité du signal (m/z).

L'intégration du pic est le calcul de son aire afin de permettre sa quantification, l'aire étant proportionnelle à sa concentration.

La lecture du profil, c'est-à-dire l'ensemble du chromatogramme, nécessite une intégration manuelle lorsque celui-ci n'est pas correctement intégré.

Le mode dit FASST permet de conjuguer une lecture complète du chromatogramme (mode SCAN) et des intégrations préenregistrées pour les composés du tableau IV (mode SIM) comme expliqué précédemment, il est compété par un mode « time integration for peak » qui doit renforcer l'intégration des composés lorsque la similarité avec la bibliothèque du spectromètre est supérieure à 70%. Le paramétrage a nécessité de nombreux essais afin de permettre à la machine de détecter systématiquement la présence d'un composé dans une fenêtre autour d'un temps de rétention spécifique sans pour autant la « forcer » à intégrer un composé par défaut. Cette programmation nous permet donc de balayer l'ensemble du chromatogramme tout en intégrant les composés obligatoires, ceci constitue un gain de temps mais cette pré intégration ne se substitue pas à la lecture complète du profil avant chaque interprétation.

#### iv. Etalonnage

La calibration permet d'établir une courbe d'étalonnage pour la quantification des composés selon 3 niveaux de concentrations différents.

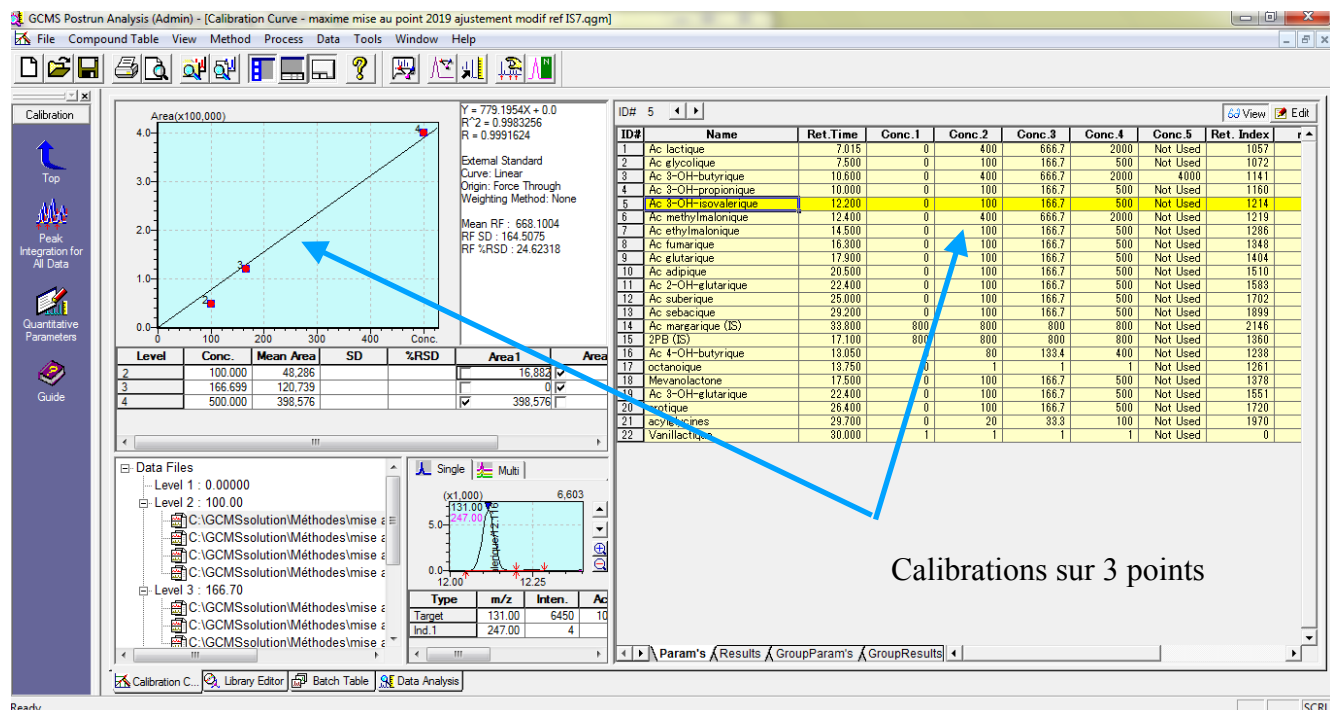


Figure XI: courbe d'étalonnage de l'acide éthylmalonique

**MELANGE A**

	Lactate	MMA	fumarique	Adipique	Suberique	3hydroxyglutarique	4hydroxybut
PUR	2000	2000	500	500	500	500	400
1/3	666.7	666.7	166.7	166.7	166.7	166.7	133.4
1/5	400	400	100	100	100	100	80

Concentrations en  $\mu\text{mol/L}$ **MELANGE B**

	Glycolique	3hydroxyisov	EMA	Glutarique	2hydroxyglut	sebacique	MVA	Orotiq
PUR	500	500	500	500	500	500	500	500
1/3	166.7	166.7	166.7	166.7	166.7	166.7	166.7	166.7
1/5	100	100	100	100	100	100	100	100
NORMES								

**Tableau VI: mélanges gammes de calibration**

Nous avons réalisé des gammes de calibration en utilisant des poudres titrées de chaque acide organique du fabricant SIGMA™. Cependant, nous avons observé des phénomènes de mauvaise solubilisation notamment avec l'acide subérique; le passage en bain-marie et le changement de solvant n'ont pas résolu ce problème. De plus, des phénomènes d'interactions entre les poudres rendaient leur identification impossible.

Nous avons donc utilisé des mélanges d'acides organiques récemment commercialisés par TEN BRINK™ et recommandés par la SFEIM (la figure XI page 34 représente la courbe d'étalonnage de l'acide éthylmalonique). Sur la figure à gauche, la droite de calibration avec les 3 points de calibration. Chaque point correspond à une concentration donnée, cette concentration est corrélée à une aire qui servira de référence pour les calculs de quantification.

Les gammes d'étalonnage TEN BRINK™ sont établies à partir de deux mélanges A et B contenant des acides organiques différents. Après reconstitution avec 5ml d'eau distillée, les mélanges de calibrants ont été dilués au tiers et au cinquième afin d'obtenir trois niveaux de concentrations (Tableau VI).

## v. Étalons internes

Acquisition et quantification par GCMS se font idéalement par rapport à un étalon interne. Pour les acides organiques urinaires, il est conseillé d'utiliser deux étalons, un sortant au début et un autre à la fin de l'analyse chromatographique (19).

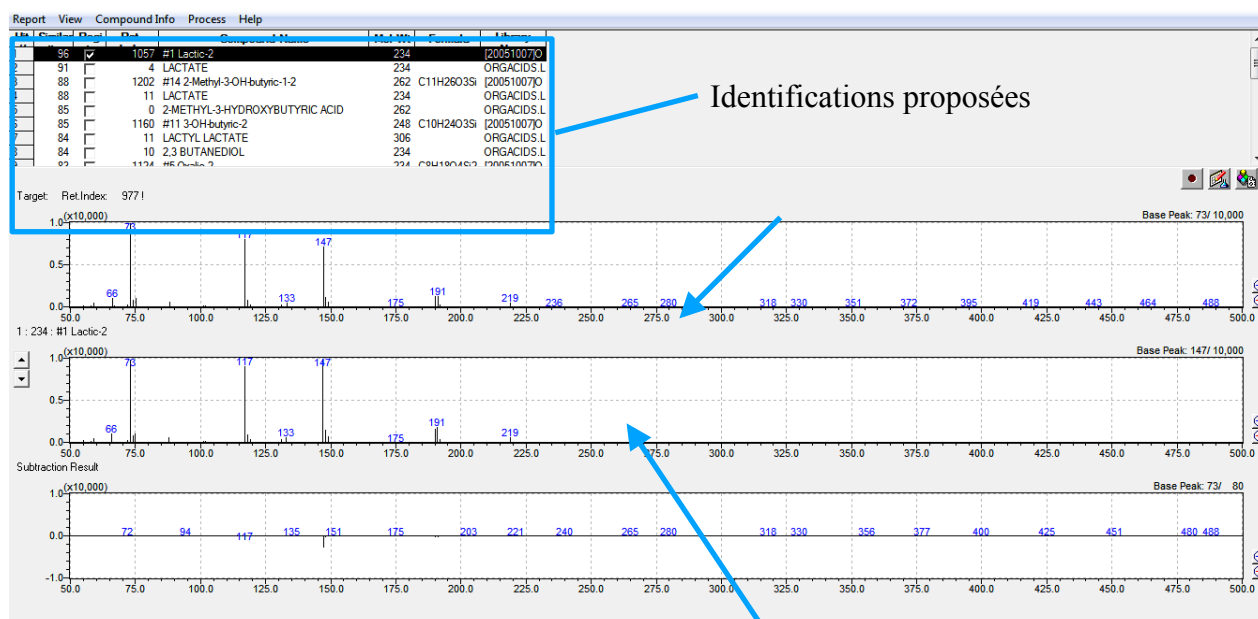
Nous avons donc choisi d'utiliser le 2 phénylbutyrate (2PB) pour le début du tracé et l'heptadécanoate (C17) en fin de tracé (21). Cependant, au cours des essais les étalons se sont montrés assez peu reproductibles. Nous avons donc décidé de nous affranchir de ces derniers, en suivant la qualité des extractions et la pureté de l'aiguille par un suivi des surfaces des étalons à chaque analyse en adéquation avec la pratique de nos collègues lillois.

## vi. Contrôles de qualité

Les Contrôles Internes de Qualité (CQI) ERNDIM commercialisés par SKML™, sont analysés en début et fin de chaque série.

Une Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) est réalisée grâce aux contrôles ERNDIM qualitatifs (contrôles interprétatifs) et quantitatifs, ils sont trimestriels.

## vii. Interprétation



**Figure XII: comparaison du spectre de l'acide lactique à la bibliothèque**

Spectre de référence

L'interprétation des pics chromatographiques obtenus est réalisée à l'aide de bibliothèques de spectres de masse (NIST, personnelle) qui permettent de comparer les spectres obtenus sur le tracé à des spectres de référence.

L'identification des pics, l'interprétation globale du profil et les conclusions seront abordés dans la partie discussion (page 78).

#### 4. Validation analytique de la méthode : détermination des paramètres de validité

Comme expliqué précédemment, une fois la méthode mise au point, il est nécessaire de procéder à la vérification des performances analytiques.

**Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (selon NATA note n°17 – juin 2012) :**

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Justesse/exactitude</b> (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<b>Comparaison</b> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir <sup>9</sup> , EBMD) et analyse des discordances <sup>10</sup>	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</b>	Bibliographie	/	Essai	/
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Robustesse</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Intervalle de référence</b> (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Limite de détection</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Spécificité/sensibilité analytique</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>11</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>				

**Tableau VII: critères de performances pour une portée B selon SH GTA 04**

La norme NF EN ISO1589 exige de déterminer des critères de performance pertinents (recommandations GTA04 (tableau VII page 37)(23).

Cependant les limites d'acceptabilité sont difficiles à établir dans le contexte de ce dosage car les données de la littérature sont pauvres, nous nous sommes donc appuyés sur les recommandations de la SFEIM.

Les paragraphes suivants détaillent les critères à évaluer afin de vérifier les performances analytiques de la méthode mise au point.

#### i. Répétabilité

Sa détermination consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon, pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même instrument.

Le groupe de travail conseille :

-8 extractions (même opérateur, même jour)

-À deux niveaux de concentrations

La répétabilité est conforme si le CV des valeurs obtenues est inférieur à 15% (19)(24).

#### ii. Fidélité intermédiaire

Sa détermination consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans une des conditions différentes : l'opérateur, les réactifs, l'appareillage, les calibrages et les gammes d'étalonnage ou les jours.

Le groupe de travail conseille :

-8 extractions à des jours différents par des opérateurs différents

-À deux niveaux de concentrations

La SFEIM préconise un CV inférieur à 15% (ou 20% quand les résultats sont proches de la limite inférieure de quantification).

Nous avons procédé à 16 extractions afin d'obtenir des résultats plus robustes.

#### iii. Intervalle de mesure

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

Limite de détection : Il s'agit du plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions.

Limite de quantification : La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue.

La limite de quantification est la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient. (17)

La limite de détection est déterminée par l'analyse de huit extractions d'un échantillon de NaCl. Elle est égale à 3 fois l'écart type obtenu pour chaque acide organique.

La limite de quantification est égale à 10 fois l'écart type obtenu avec les 8 injections.

La limite supérieure de linéarité est égale au dernier point de gamme de la calibration.

#### iv. Incertainde de mesure

L'incertainde de mesure est un « *paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à une mesurande, à partir des informaitons utilisées* ».

La connaissance de cette incertainde aide le biologiste médical lors de l'interprétation d'un résultat et le clinicien lors de sa prise de décision.

Nous suivrons les recommandations du SH GTA 14 (25), selon la méthode CIQ/EEQ.

L'incertainde sur le résultat d'analyse est obtenu en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertainde issues du CIQ et de l'EEQ comme exposé ci-dessous:

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

- $u^2(CIQ)$  : représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du contrôle interne de qualité (CIQ) ;
- $u^2(EEQ)$  : variance liée à la justesse (biais).

#### v. Contamination inter-échantillons

Une étude de contamination inter-échantillon est à effectuer pour tous les systèmes automatisés. Elle porte surtout sur les analytes qui peuvent être affectés par ce phénomène en raison des variations physiologiques observées en pratique courante



Compte tenu de l'importance clinique de certains examens, le niveau de la contamination doit être proche de zéro ou susciter la définition de règles de vérification systématique à chaque fois qu'un échantillon présente une valeur susceptible de contaminer l'échantillon suivant et de produire un résultat erroné.

Les préconisations de la SFEIM sont d'injecter trois échantillons de concentrations hautes (H1, H2, H3) puis trois échantillons de concentration basse (B1, B2, B3).

Le calcul est le suivant: Contamination en % =  $100 \times (B1-B3) / H-B3$  avec H=moyenne de H1, H2 et H3. On considère que le résultat sera acceptable si le pourcentage est inférieur au CV de la répétabilité.

#### vi. Interférences

La détection par spectrométrie de masse permet de visualiser les spectres de masse des composés interférents et une identification des composés connus et ne présente donc pas d'interférences entre les composés présents dans l'échantillon (19).

#### vii. Comparaison de méthodes

Afin de comparer les résultats obtenus avec notre technique, nous avons réalisé l'analyse de 9 échantillons urinaires en parallèle du CHRU de Lille. La comparaison statistique des résultats a été réalisée grâce à la droite de régression des moindres rectangles et au diagramme des différences.

#### viii. Justesse

Elle est estimée en comparant la moyenne obtenue établie avec des échantillons de CIQ externalisés dont nous ne disposons pas.

## ix. Exactitude

L'exactitude s'étudie à partir des résultats d'EEQ en comparant la valeur obtenue à la valeur cible (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs). L'écart observé qualifie l'inexactitude.

Inexactitude =  $x - v / v * 100$  avec  $v$  = valeur vraie = valeur du groupe de pairs

Ces valeurs permettront un calcul d'une valeur moyenne et de sa dispersion nécessaire pour le calcul d'incertitude.

## IV. RESULTATS

Présentons les résultats des tests d'évaluation des critères de performance de notre méthode.

### 1. Répétabilité

Elle consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon, pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même instrument.

L'acide propionique n'a pas été inclus dans la validation analytique puisqu'il n'est pas présent dans les contrôles de qualité externes, pré-requis indispensable pour rendre un résultat quantitatif (lors de la mise en route de notre travail en 2019).

**Tableau VIII: répétabilité niveau haut (rh: répétabilité haute)**

AOU	rh1	rh2	rh3	rh4	rh5	rh6	rh7	rh8
acide lactique	43,11	44,2	47,19	47,77	49,83	51,83	51,53	56,19
acide glycolique	19,2	20,4	21,13	21,4	22,2	23,8	24,82	25,7
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	1244	1270	1350	1386	1433	1500	1562	1670
ac3OHiso	6,93	7,72	9,66	10,37	11,62	13,06	14,59	16,68
MMA	1,19	1,18	1,3	1,3	1,35	1,41	1,53	1,59
EMA	5,89	5,23	5,34	6	6,54	5,83	6,65	6,05
acide fumarique	8,55	8,82	9,29	9,54	9,86	0,38	10,77	11,48
acide glutarique	1,02	1,06	1,12	1,15	1,17	1,25	1,075	1,39
acide adipique	91,15	93,93	100	101	104	109	112	120
acide subérique	37,16	39,44	42,2	43,5	45,8	48,02	50,36	53,5
acide sébacique	0,61	0,61	0,69	0,02	0,8	0,85	0,83	0,91
acide2OHglut	6,39	6,41	6,75	7,64	7,54	8,03	8,58	8,79

La première analyse sur 8 extractions successives pour le niveau haut (concentration élevées en routine) a montré une déviation croissante des résultats de manière uniforme au fur et à mesure des 8 passages pour les 12 acides organiques dosés, elle est présentée dans le tableau VIII page 41.

Cette déviation observée nous laisse penser que l'échantillon se dégrade au fur et à mesure des extractions, notamment à partir de 3 heures où l'on remarque une déviation notable des concentrations puis s'accroît sur les 10 heures passées sur le portoir de la GCMS entre les injections. Si la dégradation n'avait été observée que pour un ou deux analytes, il aurait pu s'agir d'un phénomène isolé imputable à la stabilité d'un acide en particulier mais ce n'est pas le cas ici.

Notre première hypothèse a été de penser que l'échantillon n'était pas stable dans le temps à température ambiante, ce qui nous a mené à tester le composé avec mise au congélateur des échantillons jusqu'à injection, à -20°C puis à -80°C, les résultats sont résumés dans les tableaux IX et X.

**Tableau IX: stabilité d'un échantillon après congélation à -20°C sur 5 jours**

AOU	Valeurs j0	Valeurs j+2	CVJ2 %	Valeurs j0	Valeurs j+3	CVJ3 %	Valeurs j0	Valeurs j+5	CVJ5 %
acide lactique	66,31	77,64	17,09	17,84	33,71	88,96	26,83	41,94	36,03
acide glycolique	95,31	106,44	11,68	16,1	8,34	-48,20	9,96	16,47	39,53
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	1494,36	1707,82	14,28	494,35	942,26	90,61	1040,96	1715,64	39,33
ac3OHiso	55,53	80,02	44,10	1,04	6,28	503,85	1,6	9,33	82,85
MMA	4,22	4,9	16,11	0,31	2,79	800	0,85	1,86	54,30
EMA	8,42	8,63	2,49	4,52	7,92	75,22	3,3	4,77	30,82
acide fumarique	10,37	12,03	16,01	11,36	22,89	101,50	8,52	14,26	40,25
acide glutarique	3,19	3,39	6,27	1,51	3	98,68	0,83	1,48	43,92
acide adipique	11,97	12,03	0,50	120,09	217,86	81,41	83,62	136,9	38,92
acide subérique	52,22	58,53	12,08	51,91	99,54	91,75	32,6	58,94	44,69
acide sébacique	1,86	2,22	19,35	0,69	1,06	53,62	0,34	0,81	58,02
acide2OHglut	15,61	19,27	23,45	9,5	17,27	81,79	5,15	9,82	47,56

**Tableau X: comparaison des CV entre les 2 températures de congélation**

AOU	Valeurs J0 -80°	Valeurs J2 -80°	CV -80°	CV J2 -20°
acide lactique	42,24	49,04	16,10	17,08
acide glycolique	95,89	106,92	11,50	11,67
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	4340,35	5194,07	19,67	14,28
ac3OHiso	70,07	99,06	41,37	44,1
MMA	3,44	4,47	29,94	16,11
EMA	8,42	10,91	29,57	2,49
acide fumarique	6,12	7,13	16,50	16
acide glutarique	33,07	40,61	22,80	6,29
acide adipique	57,53	66,25	15,16	0,5
acide subérique	8,68	14,96	72,35	12,08
acide sébacique	3,7	8,89	140,27	19,35
acide2OHglut	18,51	32,17	73,7979	23,44

Avec congélation à -20°C, le CV (Coefficient de Variation) reste acceptable (<20%) pour la majorité des composés exceptés l'acide 3OH isovalérique à J+2, soit au lendemain de la première injection tandis que les variations observées sont trop importantes pour les jours suivants.

Avec congélation à -80°C, en comparaison à -20°C, on s'aperçoit que la majorité des CV sont meilleurs à -20°C, la congélation à -80°C ne conserve donc pas mieux les échantillons (tableau X).

On peut donc conclure que le composé n'est stable à température ambiante que pendant 3 heures. Passé ce délai le composé nécessite une congélation à -20°C entre les injections, il reste stable jusqu'au lendemain mais pas au-delà. Une explication serait que la congélation permet de limiter l'évaporation de l'échantillon (à l'origine de sa concentration).

Après congélation à -20°C entre les injections dès rh3, les résultats obtenus pour le niveau haut sont présentés dans le Tableau XI page 44, nous suivons ensuite la même méthode pour le niveau bas.

**Tableau XI: répétabilité niveau haut avec congélation au -20°C dès rh3**

AOU	rh1	rh2	rh3	rh4	rh5	rh6	rh7	rh8	M	ET	CV %
acide lactique	43,11	44,2	45,6	47,77	47	47,6	47,8	47,7	46,34	1,84	3,96
acide glycolique	19,2	20,4	21,13	21,4	22,2	23,8	22	22,8	21,6	1,43	6,60
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	1244	1270	1280	1386	138	1370	1388	1333	1332	59,4	4,46
ac3OHiso	6,93	7,72	7,74	7,86	7,9	7,6	7,96	7,7	7,67	0,32	4,22
MMA	1,19	1,18	1,3	1,3	1,35	1,4	1,45	1,43	1,32	0,10	7,73
EMA	5,89	5,23	5,34	6	5,54	5,74	5,65	5,85	5,65	0,27	4,79
acide fumarique	8,55	8,82	8,84	8,54	8,86	8,38	8,77	8,48	8,65	0,19	2,17
acide glutarique	1,02	1,06	1,02	1,05	1,07	1,15	1,07	1,19	1,07	0,06	5,62
acide adipique	91,15	92,3	92	92,5	92,3	93	93,2	92,6	92,3	0,63	0,68
acide subérique	37,16	38,4	38,1	38,2	38,4	38,3	37,3	33,5	37,4	1,66	4,43
acide sébacique	0,61	0,61	0,68	0,7	0,66	0,65	0,63	0,61	0,64	0,03	5,38
acide2OHglut	6,39	6,41	6,42	6,43	6,44	6,6	8,8	7,7	6,89	0,89	12,85

**Tableau XII: répétabilité niveau bas**

AOU	rb1	rb2	rb3	rb4	rb5	rb6	rb7	rb8	Moyenne	Écart type	CV %
acide lactique	8,8	9,01	9,13	9,34	9,31	9,29	9,38	9,85	9,26	0,31	3,32
acide glycolique	52,44	53,09	54,09	54,9	55,2	54,9	57,0	57,99	54,96	1,87	3,40
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	5,16	5,2	5,32	5,34	5,39	5,39	5,59	5,62	5,38	0,16	3,05
ac3OHiso	4,51	4,91	5,3	5,5	5,8	6,14	6,74	7,22	5,77	0,91	15,79
MMA	1,62	1,7	1,74	1,75	1,74	1,74	1,84	1,86	1,75	0,08	4,32
EMA	3,61	3,14	3,42	3,82	3,49	3,44	3,53	4,11	3,57	0,29	8,12
acide fumarique	0,19	0,2	0,2	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,21	0,01	5,39
acide glutarique	0,175	0,178	0,185	0,19	0,197	0,19	0,19	0,197	0,19	0,01	4,47
acide adipique	1	1,01	1,02	1,02	1,04	1,03	1,07	1,07	1,83	0,03	1,42
acide subérique	0,72	0,72	0,72	0,73	0,73	0,76	0,78	0,8	0,75	0,03	4,18
acide sébacique	1,29	1,29	1,29	1,38	1,28	1,34	1,4	1,43	1,34	0,06	4,41
acide2OHglut	2,93	2,98	3,03	3,08	3,04	3,08	3,01	3,23	3,05	0,09	2,92

Les CV obtenus pour 8 passages le même jour par le même opérateur sont inférieurs à 15 % (seuil recommandé par la SFEIM) (tableau XI et XII).

Le niveau bas et haut sont donc satisfaisants, la répétabilité de notre méthode est donc conforme aux exigences attendues.

## 2. Fidélité intermédiaire

Les résultats de la fidélité intermédiaire sont présentés dans les tableaux XIII et XIV (page 46-47) qui regroupent les 16 extractions pour chaque acide organique pour deux niveaux (bas et haut).

La difficulté de ces essais a résidé dans le fait que nous avons choisi d'utiliser des échantillons de patients (afin d'être au plus près de la « réalité » des résultats qui sont rendus en routine). Or, il est rare qu'un patient ait un profil avec des taux abaissés de manière uniforme pour tous les acides ou à l'inverse augmentés; nous avons donc effectué un travail de recherche de profils particuliers.

En l'absence de source bibliographique, nous fixons un CV acceptable à 35% pour la majorité des acides organiques qui sont proches de leur limite de quantification (valeurs en vert dans le tableau XIV page 47).

Cependant, il apparaît que pour certains acides organiques tels que l'aide 3OH isovalérique le CV est supérieur à 35%. On remarque que les moyennes pour les niveaux hauts et bas de cet acide sont inférieures au cut off pathologique(26)(27).

Ainsi, le rendu d'une valeur à une autre varie jusqu'à 35% mais reste en-dessous de la valeur désignée comme pathologique donc ne peut ne pas avoir d'impact du point de vue clinique, le CV est compatible avec l'interprétation clinique des résultats (28).

Le COFRAC dit à ce sujet dans le SH GTA 04 que « *Lorsque les résultats obtenus sont supérieurs aux limites de conformité préétablies, le laboratoire vérifiera si les différences observées, compte tenu du nombre de valeurs et du niveau de concentration des échantillons, sont significatives et les **confrontera aux exigences Cliniques.*** » C'est le cas pour l'acide 3OH isovalérique mais également pour l'acide glycolique.

Pour l'acide glutarique, le CV du niveau haut est de 148% (valeur en rouge dans le tableau XIV) mais le raisonnement est le même. Les valeurs rendues vont de 0,59 à 2,44 mmol/mol de créa alors que le seuil pathologique est fixé à 12. Cela n'a donc pas d'impact clinique

significatif puisque la variation est observée sur des valeurs en-dessous du seuil pathologique mais il faudra compléter avec l'analyse des CIQs qui apporteront des valeurs plus hautes.

**Tableau XIII: Fidélité intermédiaire 1**

AOU	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9
acide lactique HAUT	8,11	21	16,3	19	25	13,01	19,25	18	11,39
acide lactique BAS	9,4	15,4	11,74	16	25,8	16,7	18	21,6	14,24
acide glycolique HAUT	20,18	40,36	30,5	30,81	55	45,7	27,8	50	42,5
acide glycoliqueBAS	5	17,8	22,04	10,7	14,19	15,19	17,31	17,5	12,04
ac3OHprop (non rendu)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ac3OHbut HAUT	175	755	1310	1118	1288	643	531	600	203
ac3OHbut BAS	7,9	0,3	6,81	7,09	12,2	7,8	6,7	12,3	9,34
ac3OHisov HAUT	5,84	13,51	10,8	6,14	15	10,25	4,57	10,3	13,67
ac3OHisov BAS	0,56	2,18	6,73	1,73	4,53	1,24	1,08	2	0,34
MMA HAUT	1,22	1,74	1,97	1,37	1,71	1,37	1,49	1,85	1,69
MMA BAS	0,48	1,02	0,74	0,91	0,88	0,73	0,33	0,9	0,8
EMA HAUT	1,86	2,18	3,65	3,54	4,75	3,21	4,86	3,4	3,33
EMA BAS	1,55	2,52	2,99	1,93	2,55	2,69	1,61	2,5	3,59
acide fumarique HAUT	6,62	8,83	7,56	9,16	10,41	8,24	12,21	11,02	7,9
acide fumarique BAS	0,13	0,174	0,174	0,146	0,15	0,13	0,15	0,17	0,16
acide glutarique HAUT	0,65	10,7	0,84	0,89	1,13	0,82	1,62	1,64	0,83
acide glutarique BAS	0,58	0,78	0,84	0,64	0,69	0,59	0,7	0,7	0,72
acide adipique HAUT	69,8	88,17	73	89,91	104,7	81,72	129	90	77,56
acide adipique BAS	1,34	1,64	1,71	1,32	1,45	1,29	1,44	1,6	1,55
acide subérique HAUT	25,79	36,95	30,54	35,05	41	33,14	55,8	36,5	25,09
acide subérique BAS	0,7	0,62	0,72	0,58	0,71	0,66	0,51	0,59	0,47
acide sébacique HAUT	0,92	1,24	1,48	1,39	1,22	1,21	1,31	1,31	1,3
acide sébacique BAS	0,31	0,61	0,53	0,36	0,56	0,39	0,74	0,54	0,36
acide2OHglut HAUT	2,47	5,58	4,46	5,53	8,43	5,67	10,2	6,4	5,98
acide 2OHglut BAS	1,06	1,6	2,76	2,15	2,81	2,7	2,55	2,8	2,99
acide lactique HAUT+	26,5	28,3	19,5	14,75	28,85	28,9	18,375	24	19,25
acide glycolique HAUT+	98,2	108,3	72,175	59,8	114,16	118,46	56,13	91	29,09

**Tableau XIV: Fidélité intermédiaire 2**

AOU	N°10	N°11	N°12	N°13	N°14	N°15	N°16	M	ET	CV %	Seuil pathologique
acide lactique HAUT	10	16	21	14,73	19,54	20,03	21,6	17,12	4,62	27,17	100
acide lactique BAS	25	24,21	26,65	21,3	22,8	26	21	19,74	5,38	27,17	
acide glycolique HAUT	36,21	60,55	65,22	66,36	81	78,28	85	50,96	20,15	39,55	150
acide glycoliqueBAS	15,47	15,05	17,77	14,48	25	15	16,3	15,67	4,46	28,5	
ac3OHprop (non rendu)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut HAUT	169,6	367,1	398	804	864	1300	1200	732,85	414,23	56,52	50
ac3OHbut BAS	7,58	14	14,91	16,51	19,5	18,63	12,3	10,86	5,09	46,90	
ac3OHisov HAUT	7,31	5,34	10,3	19,2	19,8	27,51	10,3	10,25	6,18	60,31	50
ac3OHisov BAS	0,27	0,68	1,05	1,6	2,59	1,3	2,63	1,9	1,67	87,78	
MMA HAUT	1,29	1,71	1,81	1,99	2,56	2,38	2,57	1,79	0,42	23,5	5
MMA BAS	0,75	0,65	0,64	0,94	1,22	0,9	1,34	0,83	0,25	30,36	
EMA HAUT	3,8	3,36	2,29	3,16	3,65	3,92	4,59	3,47	0,85	24,7	10
EMA BAS	1,74	2,06	2,5	3,33	3,01	2,79	3,22	2,53	0,62	24,5	
acide fumarique HAUT	8,08	6,24	6,78	9,96	12,6	14,2	15,05	9,67	2,7	27,9	14
acide fumarique BAS	0,13	0,17	0,18	0,19	0,2	0,2	0,17	0,16	0,02	14,1	
acide glutarique HAUT	0,78	0,59	0,61	1,03	1,37	1,39	1,37	1,64	2,44	148,7	12
acide glutarique BAS	0,56	0,74	0,76	0,85	0,78	1,04	0,66	0,73	0,11	16,5	
acide adipique HAUT	79,8	61,29	64,82	100	105	103	100	88,61	17,86	20,15	12
acide adipique BAS	1,22	1,59	1,62	1,91	2,23	2,15	2,2	1,64	0,32	19,77	
acide subérique HAUT	28,2	21,27	21	39,25	34	53,7	31	34,26	9,95	29	6
acide subérique BAS	0,3	0,51	0,48	0,61	0,6	0,79	0,68	0,59	0,12	20,3	
acide sébacique HAUT	1,05	1,35	1,41	1,49	1,3	1,71	2,03	1,35	0,25	18,7	4
acide sébacique BAS	0,41	0,36	0,29	0,45	0,66	0,66	0,45	0,48	0,13	28,7	
acide2OHglut HAUT	6,08	4,5	4,45	7,35	6,7	9,25	8,8	6,36	2,03	32	20
acide 2OHglut BAS	2,3	2,97	3,03	3,25	3,88	3,74	4,06	2,79	0,78	28	
acide lactique HAUT+	47	29	32,3	12,57	15,15	27,5	28,3	25,01	8,47	33,8	
acide glycolique HAUT+	134	109	121,05	54,31	65,4	101	129	91,31	31,2	34,2	



Enfin, pour l'acide 3OH-butyrique (en jaune dans le tableau XIV page 47) il semblerait qu'une coélution soit à l'origine de ces valeurs hautes.

L'existence d'au moins six isomères d'acide hydroxybutyrique représente une limite, particulièrement quand la présence de 3hydroxyisobutyrique est négligé par la coélution avec un pic de 3hydroxybutyrique, nous compléterons par l'analyse des CIQ également.

### 3. Intervalles de mesure

#### i. Limite de détection et quantification

**Tableau XV: limite de détection et de quantification, premier essai**

AOU	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	Moyenne	écart type	limite detection	limite quantification
acide lactique	7,7	6,76	5,58	3,28	6,81	7,01	7,01	8,41	6,57	1,4554	4,37	14,55
acide glycolique	3,02	2,3	2,72	2,81	4,23	4,01	4,01	4,37	3,43375	0,7524	2,26	7,52
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	4,2	5,7	5,5	5,2	7,8	6,6	6,7	7,8	6,1875	1,1868	3,56	11,87
ac3OHisov	0,06	0	0	0	0,15	0,15	0,15	0,06	0,07125	0,0652	0,20	0,65
MMA	0,07	0,01	0,05	0	0	0	0	0	0,01625	0,0259	0,08	0,26
EMA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
acide fumarique	0,05	0,02	0,02	0	0,07	0,09	0,09	0,1	0,055	0,0357	0,11	0,36
acide glutarique	0,12	0,12	0,15	0,05	0,1	0,08	0,08	0,25	0,11875	0,0573	0,17	0,57
acide adipique	0,35	0,34	0,28	0,15	0,21	0,23	0,23	1,38	0,39625	0,3770	1,13	3,77
acide subérique	0,31	0,73	0,43	0,17	0,25	0,16	0,16	0,43	0,33	0,1837	0,55	1,84
acide sébacique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
acide2OHglut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nous avons utilisé la méthode des blancs avec l'analyse de huit extractions de NaCl. Cependant certains acides n'étaient pas détectés (en rouge dans le tableau XV page 48).

Nous avons donc utilisé une autre méthode de détermination de la limite de quantification. Celle-ci consiste à prendre un échantillon avec des résultats bas puis à faire 5 niveaux de dilutions (demi, tiers, cinquième, septième et dixième) que nous répétons cinq fois chacun (tableau XVI). Ensuite nous calculons les CV et taux de récupération par rapport au taux attendu pour déterminer le seuil de quantification.

On choisit un CV acceptable (<15%) et un taux de récupération entre 100 et 120%.

**Tableau XVI: dilutions MMA et EMA**

AOU	PUR	DEMI 1	DEMI 2	DEMI 3	DEMI 4	DEMI 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV %	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
MMA	2,8	1,2	1,2	1,3	1,5	1,2	0,13	1,28	10,19	1,4	91,43
EMA	3,3	1,4	1,1	1,4	2,4	1,5	0,49	1,56	31,60	1,65	94,55
AOU	PUR	TIERS 1	TIERS 2	TIERS 3	TIERS 4	TIERS 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV %	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
MMA	2,8	0,69	0,9	0,98	1,13	1,1	0,18	0,96	18,44	0,93	103,23
EMA	3,3	1,08	0,94	1,4	1,5	0,91	0,27	1,166	23,11	1,1	106,00
AOU	PUR	CINQ 1	CINQ 2	CINQ 3	CINQ 4	CINQ 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV %	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
MMA	2,8	0,35	0,43	0,45	0,46	0,55	0,07	0,448	15,97	0,56	80,00
EMA	3,3	0	0,88	0	0	0	0,39	0,176	223,61	0,66	26,67
AOU	PUR	SEPTIÈME 1	SEPTIÈME 2	SEPTIÈME 3	SEPTIÈME 4	SEPTIÈME 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV %	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
MMA	2,8	0,24	0,25	0,27	0,28	0,21	0,03	0,25	10,95	0,4	62,5
EMA	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,41	0
AOU	PUR	DIXIÈME 1	DIXIÈME 2	DIXIÈME 3	DIXIÈME 4	DIXIÈME 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV %	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
MMA	2,8	0,15	0,20	0,21	0,26	0,28	0,05	0,22	23,40	0,28	78,57
EMA	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0

Le seuil de quantification choisi pour l'acide méthylmalonique est donc de 0,96 mmol/mol de créat et celui de l'acide éthylmalonique est de 1,17 mmol/mol de créat. Les valeurs sont donc reportées en vert dans le tableau XVI.

**Tableau XVII: dilutions acide sébacique et acide 2OH glutarique**

AOU	PUR	DEMI 1	DEMI 2	DEMI 3	DEMI 4	DEMI 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
acide sébacique	0,8	0,34	0,34	0,4	0,4	0,34	0,03286	0,364	9,028	0,4	91
acide2OHglut	4,8	2,2	2,3	2,4	2,6	2,2	0,16733	2,34	7,150	2,4	97,5
AOU	PUR	TIERS 1	TIER S 2	TIERS 3	TIERS 4	TIERS 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
acide sébacique	0,8	0,21	0,25	0,32	0,21	0,24	0,04505	0,246	18,31	0,27	91,11111111
acide2OHglut	4,8	2,2	2,5	2,8	2,9	2,9	0,30495	2,66	11,46	1,6	166,25
AOU	PUR	CINQ 1	CINQ 2	CINQ 3	CINQ 4	CINQ 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
acide sébacique	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0,16	0
acide2OHglut	4,8	0	1,21	1,23	1,28	1,33	0,56652	1,01	56,09	0,96	105,2083333
AOU	PUR	SEPTIÈME 1	SEPTIÈME 2	SEPTIÈME 3	SEPTIÈME 4	SEPTIÈME 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
acide sébacique	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0
acide2OHglut	4,8	0,47	0,5	0,5	0,55	0,56	0,03781	0,516	7,328	0,7	73,71428571
AOU	PUR	DIXIÈME 1	DIXIÈME 2	DIXIÈME 3	DIXIÈME 4	DIXIÈME 5	ECART TYPE	MOYENNE	CV	VALEUR ATTENDUE	TAUX DE RÉCUPÉRATION
acide sébacique	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0
acide2OHglut	4,8	0,36	0,44	0,48	0,53	0,6	0,09066	0,482	18,81	0,48	100,4166666

Nous procédons à la même démarche avec l'acide 2OH glutarique et l'acide sébacique dans le tableaux XVII Les seuils de quantification choisis sont de 0,48 mmol/mol de créa pour l'acide 2OH glutarique et 0,24 mmol/mol de créat pour l'acide sébacique.

## ii. Limite supérieure de linéarité

La limite supérieure de linéarité est définie comme le dernier point de gamme de calibration du mélange commercialisé par H.J TEN BRINK <sup>TM</sup> comme présenté dans le tableau XVIII.

**Tableau XVIII: limite supérieure de linéarité (LSL)**

AOU	LSL
acide lactique	2000
acide glycolique	500
ac3OHprop	500
ac3OHbut	400
ac3OHiso	500
MMA	2000
EMA	500
acide fumarique	500
acide glutarique	500
acide adipique	500
acide subérique	500
Acide sébacique	500
Acide 2OH glutarique	500

## 4. Contamination inter échantillons

Le passage d'un échantillon présentant une valeur susceptible de contaminer l'échantillon suivant et de produire un résultat erroné a été testé pour chaque AO dans le tableau XIX (page 52).

Le passage d'un échantillon fortement concentré n'a pas entraîné de « relargage » des molécules sur un échantillon faiblement concentré analysé à la suite et ce pour l'ensemble des acides organiques. Les valeurs négatives peuvent être expliquées par B3>B1, conséquence d'une dégradation du composé injecté mais n'a pas de lien avec la contamination inter échantillons. La contamination est conforme.

**Tableau XIX: Contamination inter échantillons**

AOU	H1	H2	H3	Mh	B1	B2	B3	CONTAMINATION EN %
acide lactique	42,24	42,8	30,67	38,57	14,08	9,63	13,88	0,81
acide glycolique	95,89	91,72	73,56	87,06	21,4	4,01	14,76	9,18
ac3OHprop	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ac3OHbut	4340	1269	2940	2850	452	69	124	12,04
ac3OHiso	70,07	68,75	34,47	57,76	2,57	0,33	0,63	3,40
MMA	3,44	3,37	3,3	3,37	0,43	0,64	0,78	-13,51
EMA	8,42	8,42	7,26	8,03	1,62	2,64	2,08	-7,73
acide fumarique	6,12	6,2	5,72	6,01	0,89	0,97	1,45	-12,27
acide glutarique	33,07	33,69	31,44	32,73	5,05	5,07	7,77	-10,90
acide adipique	57,53	58,65	53,83	56,67	8,8	9,87	14,22	-12,77
acide subérique	8,68	9,44	8,7	8,94	1,25	1,52	2,72	-23,63
acide sébacique	3,7	3,38	3,33	3,47	0,45	0,41	0,48	-1,00
acide2OHglut	18,51	22,38	21	20,63	3,09	3,72	5,24	-13,97

### 5. Exactitude et incertitude de mesure

Il s'agit d'une ébauche de l'exactitude et de l'incertitude de mesure en raison du trop faible nombre d'EEQs analysés. Nous traiterons les résultats acide par acide. Chaque tableau dans les pages suivantes, regroupe l'analyse des résultats des EEQs (exactitude) combinée à celle des CIQ pour calculer l'incertitude de mesure de chaque analyte (25)(17). L'incertitude doit être recalculée régulièrement (une périodicité annuelle est recommandée). Pour l'acide lactique, le calcul de l'inexactitude est réalisé à partir des EEQs.

Elle est représentée par le biais en % (en bleu dans le tableau XX page 54) selon la formule suivante: Inexactitude=biais=  $x-v/v*100$  avec  $v$ = valeur vraie= valeur du groupe de pairs.

À partir des biais observées est calculée une moyenne des biais puis un écart type des écarts ( en vert dans le tableau XX) entre les résultats du labo et les valeurs assignées par la formule suivante:

$$\hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}}$$

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

- $u^2(CIQ)$  : représente la variance (carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du contrôle interne de qualité (CIQ) ;
- $u^2(EEQ)$  : variance liée à la justesse (biais).

En jaune dans le tableau XX.

L'incertitude évaluée à partir des évaluations externes est obtenue à partir de la valeur absolue de l'écart moyen associé de la loi de distribution uniforme (on divise la demi-étendue par racine de 3) et de l'écart-type des écarts précédemment calculé. La formule de calcul est la suivante :

$$u(EEQ) = \sqrt{\left(\frac{|E|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

L'incertitude est en violet dans le tableau XX. On considèrera l'incertitude acceptable si < ou égale à 30%.

**Tableau XX: incertitude mesure acide lactique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide lactique 1	2,21	8,65	-6,44	6,44	-74,45 %
Acide lactique 2	3,50	5,91	-2,41	2,41	-40,78 %
Acide lactique 3	2,7	3	-0,3	0,3	-10,00 %
Acide lactique 4	0,0260	0,050	-0,024	0,024	-48,00 %
		Moyenne	-2,294	2,294	
		ET	2,963	2,963	
		Min		0,024	
		Max		6,440	
		ABS Moy/ Racine3	1,324	1,324	
		u (EEQ)		3,245	

**REPRODUCTIBILITE**

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	19,70	4344,00
Ecart type	5,38	166,00
CV (%)	27,17 %	3,83 %

**INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE**

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/ mol de créat)	NON EXPLOITABLE	332,06
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	7,64 %

Ici, l'incertitude est incalculable pour les valeurs basses et de 332,06 pour des valeurs hautes de l'ordre de 4000 ce qui est bien supérieur au seuil pathologique retenu de 150 mmol/mol de créat, avec une incertitude à 7,64% donc conforme.

**Tableau XXI: incertitude mesure acide glycolique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide glycolique1	30	111	-81	81	-72,97 %
Acide glycolique2	43,6	69,2	-25,6	25,6	-36,99 %
Acide glycolique3	195	184	11	11	5,98 %
Acide glycolique4	0,0260	0,050	-0,024	0,024	-48,00 %
		Moyenne	-23,906	29,406	
		ET	41,034	35,956	
		Min		0,024	
		Max		81,000	
		ABS Moy/ Racine3	13,802	16,978	
		u (EEQ)		43,293	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	18,18	76,28
Ecart type	4,02	15,28
CV (%)	22,15 %	20,00 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	91,82
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	120,37 %

Pour l'acide glycolique, l'incertitude de mesure des niveaux bas est inexploitable car trop proche de la limite de quantification et l'incertitude du niveau haut est trop élevée, une solution sera de compléter avec des valeurs de CIQ plus hautes.



**Tableau XXII: incertitude mesure acide 3OH butyrique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Ac3OH butyrique 1	450	487	-37	37	-7,60 %
Ac3OH butyrique 2	120	152	-32	32	-21,05 %
Ac3OH butyrique 3	54	53,2	0,7999999999	0,79999999	1,50 %
Ac3OH butyrique 4	1,4	2,81	-1,41	1,41	-50,18 %
		Moyenne	-17,403	17,803	
		ET	19,868	19,390	
		Min		0,800	
		Max		37,000	
		ABS Moy/Racine3	10,047	10,278	
		u (EEQ)		22,264	

**REPRODUCTIBILITE**

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	10,86	7325
Ecart type	5,09	414,00
CV (%)	46,90 %	56,52 %

**INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE**

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	829,20
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	11,32 %

Pour l'acide 3OH butyrique, le niveau bas est inexploitable puisque la moyenne des CIQ est trop proche de la limite de quantification et le niveau haut est conforme.

**Tableau XXIII: incertitude mesure acide 3OH isovalérique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Ac3OHisovalérique ue1	3,60	6	-2,4	2,4	-40,00 %
Ac3OHisovalérique ue2	30	31	-1	1	-3,23 %
Ac3OHisovalérique ue3	52,8	50	2,8	2,8	5,60 %
Ac3OHisovalérique ue4	143	141	2	2	1,42 %
		Moyenne	0,350	2,050	
		ET	2,457	0,772	
		Min		1,000	
		Max		2,800	
		ABS Moy/ Racine3	0,202	1,184	
		u (EEQ)		2,465	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	5,12	103,50
Ecart type	4,46	13,00
CV (%)	35,00 %	27,09 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/ mol de créat)	NON EXPLOITABLE	26,46
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	24,54 %

Pour l'acide 3OH isovalérique, le niveau bas est inexploitable puisque la moyenne des CIQ est proche de la limite de quantification et le niveau haut est conforme.

**Tableau XXIV: incertitude mesure MMA**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
MMA 1	10	20,2	-10,2	10,2	-50,50 %
MMA 2	133	178	-45	45	-25,28 %
MMA 3	1,15	1,5	-0,35	0,35	-23,33 %
MMA 4	4,50	10,2	-5,7	5,7	-55,88 %
		Moyenne	-15,313	15,313	
		ET	20,197	20,197	
		Min		0,350	
		Max		45,000	
		ABS Moy/ Racine3	8,841	8,841	
		u (EEQ)		22,047	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	0,83	207,00
Ecart type	0,25	34,00
CV (%)	30,00 %	32,90 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	81,05
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	39,15 %

Pour l'acide méthylmalonique le niveau bas est inexploitable car la moyenne de la reproductibilité se trouve en dessous de la limite de quantification et le niveau haut est non conforme.

**Tableau XXV: incertitude mesure EMA**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
EMA 1	159	186	-27	27	-14,52 %
EMA 2	2	2,1	-0,1	0,1	-4,76 %
EMA 3	94,8	92	2,8	2,8	3,04 %
EMA 4	8,8	31	-22,2	22,2	-71,61 %
		Moyenne	-11,625	13,025	
		ET	15,156	13,553	
		Min		0,100	
		Max		27,000	
		ABS Moy/ Racine3	6,712	7,520	
		u (EEQ)		16,576	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	11,80	143,34
Ecart type	3,32	7,62
CV (%)	19,61 %	33,22 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	36,49
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	24,45 %

Pour l'acide éthylmalonique, le niveau bas est inexploitable mais le niveau haut a une incertitude conforme.

**Tableau XXVI: incertitude mesure acide fumarique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide fumarique 1	0,1	0,5	-0,4	0,4	-80,00 %
Acide fumarique 2	3,3	5,35	-2,05	2,05	-38,32 %
Acide fumarique 3	211	186	25	25	13,44 %
Acide fumarique 4	35,7	42,8	-7,0999999999	7,0999999999	-16,59 %
		Moyenne	3,863	8,638	
		ET	14,377	11,275	
		Min		0,400	
		Max		25,000	
		ABS Moy/ Racine3	2,230	4,987	
		u (EEQ)		14,549	

**REPRODUCTIBILITE**

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	0,16	9,67
Ecart type	0,02	2,70
CV (%)	14,10 %	27,90 %

**INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE**

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	NON EXPLOITABLE
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	NON EXPLOITABLE

Pour l'acide fumarique le niveau bas est non exploitable car la moyenne de la reproductibilité se trouve en dessous de la limite de quantification et le niveau haut l'est également car la moyenne de reproductibilité n'est pas suffisamment élevé par rapport aux EEQs il faudra donc compléter avec d'autres données lors de la révision annuelle.

**Tableau XXVII: incertitude mesure acide glutarique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide glutarique 1	68,2	95	19	19	7,39 %
Acide glutarique 2	25,4	48,3	-22,9	22,9	-47,41 %
Acide glutarique 3	0,4	0,54	-0,14	0,14	-25,93 %
Acide glutarique 4	276	257	19	19	7,39 %
		Moyenne	3,740	15,260	
		ET	19,921	10,246	
		Min		0,140	
		Max		22,900	
		ABS Moy/ Racine3	2,159	8,810	
		u (EEQ)		20,037	

**REPRODUCTIBILITE**

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	0,73	145,34
Ecart type	0,11	20,60
CV (%)	16,50 %	33,40 %

**INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE**

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	57,48
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	39,55 %

Pour l'acide glutarique le niveau bas est inexploitable et le niveau haut a une incertitude non conforme bien que l'incertitude en valeur absolue est acceptable.

**Tableau XXVIII: incertitude mesure acide adipique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide adipique 1	1,3	2	-0,7	0,7	-35,00 %
Acide adipique 2	102	104	-2	2	-1,92 %
Acide adipique 3	64,9	64,2	0,7000000000	0,7000000000	1,09 %
Acide adipique 4	19,6	31,5	-11,9	11,9	-37,78 %
		Moyenne	-3,475	3,825	
		ET	5,724	5,418	
		Min		0,700	
		Max		11,900	
		ABS Moy/ Racine3	2,006	2,208	
		u (EEQ)		6,065	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	14,50	299,00
Ecart type	2,46	9,60
CV (%)	30,70 %	32,20 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	13,09	22,71
	Incertitude (%)	90,28 %	7,60 %

Pour l'acide adipique le niveau bas est non conforme et le niveau haut est conforme.

**Tableau XXIX: incertitude mesure acide subérique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide subérique 1	19,20	19,8	-0,6000000000	0,6000000000	-3,03 %
Acide subérique 2	59	76,2	-17,2	17,2	-22,57 %
Acide subérique 3	35,1	39	-3,9	3,9	-10,00 %
Acide subérique 4	2	2	0	0	0,00 %
		Moyenne	-5,425	5,425	
		ET	8,035	8,035	
		Min		0,000	
		Max		17,200	
		ABS Moy/ Racine3	3,132	3,132	
		u (EEQ)		8,624	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	7,50	136,34
Ecart type	1,28	18,71
CV (%)	30,46 %	35,73 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	41,20
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	29,22 %

Pour l'acide subérique le niveau bas est inexploitable mais le niveau haut a une incertitude conforme.



**Tableau XXX: incertitude mesure acide sébacique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Acide sébacique 1	0	0	0	0	0,00 %
Acide sébacique 2	50	67	-17	17	-25,37 %
Acide sébacique 3	13	18	-5	5	-27,78 %
Acide sébacique 4	130	177	-47	47	-26,55 %
		Moyenne	-17,250	17,250	
		ET	21,077	21,077	
		Min		0,000	
		Max		47,000	
		ABS Moy/ Racine3	9,959	9,959	
		u (EEQ)		23,312	

REPRODUCTIBILITE

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	6,76	66,96
Ecart type	1,11	22,60
CV (%)	16,43 %	33,80 %

INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	NON EXPLOITABLE	NON EXPLOITABLE
	Incertitude (%)	NON EXPLOITABLE	NON EXPLOITABLE

Pour l'acide sébacique, les niveaux bas et hauts sont inexploitables.

**Tableau XXXI: incertitude mesure acide 2OH glutarique**

		Si groupe de pairs			
Echantillons CEQ	Résultat Labo	Résultat pairs	Biais observé	Biais observé (ABS)	Biais en %
Ac2OH glutarique1	25	35	-10	10	-28,57 %
Ac2OH glutarique2	4	4,16	-0,16	0,16	-3,85 %
Ac2OH glutarique3	81	81	0	0	0,00 %
Ac2OH glutarique4	151	158	-7	7	-4,43 %
		Moyenne	-4,290	4,290	
		ET	5,014	5,014	
		Min		0,000	
		Max		10,000	
		ABS Moy/ Racine3	2,477	2,477	
		u (EEQ)		5,592	

**REPRODUCTIBILITE**

	Niveau bas	Niveau haut
Moyenne	22,72	220,74
Ecart type	1,95	7,23
CV (%)	30,59 %	32,75 %

**INCERTITUDE DE MESURE ELARGIE**

Si groupe de pairs	Incertitude (micromol/mol de créat)	11,84	18,28
	Incertitude (%)	52,13 %	8,28 %

Pour l'acide 2OH glutarique le niveau bas est non conforme bien qu'en pratique il est bien inférieur au seuil pathologique donc sans réel impact clinique. Le niveau haut est conforme.

Globalement les résultats nécessitent d'être complétés avec davantage de données afin d'être plus représentatifs de la performance de la méthode, les 4 EEQs ne semblent pas suffisants pour interpréter justement les résultats, il faudra également compléter avec des valeurs basses supérieures aux limites de quantifications établies.

Pour compléter, le SH GTA 14 précise pour l'incertitude de mesure que :

*« c'est l'aptitude du laboratoire à évaluer de façon réaliste l'incertitude de mesure des résultats qui sera appréciée. Le résultat de l'incertitude en lui-même n'est pas évalué par rapport à un critère de conformité et ne peut donc pas être comparé aux indicateurs issus de la littérature tels que Ricos, Valtec, ... ;*

*les composantes de l'évaluation des incertitudes sont à maîtriser, le calcul n'est qu'une résultante de ces composantes ;*

*L'évaluation minimale de l'incertitude n'est pas un critère de sélection de la méthode. »*

## 6. Comparaison de méthode

Nous avons comparé notre méthode avec le CHU de Lille qui dose également les AOU par GCMS sur 9 patients.

Les échantillons ont été analysés dans la semaine suivant leur réception limitant ainsi le délai de réalisation entre les deux méthodes avec mise à -20°C.

Pour chacun des couples de valeurs, la différence et le rapport ont été calculés.

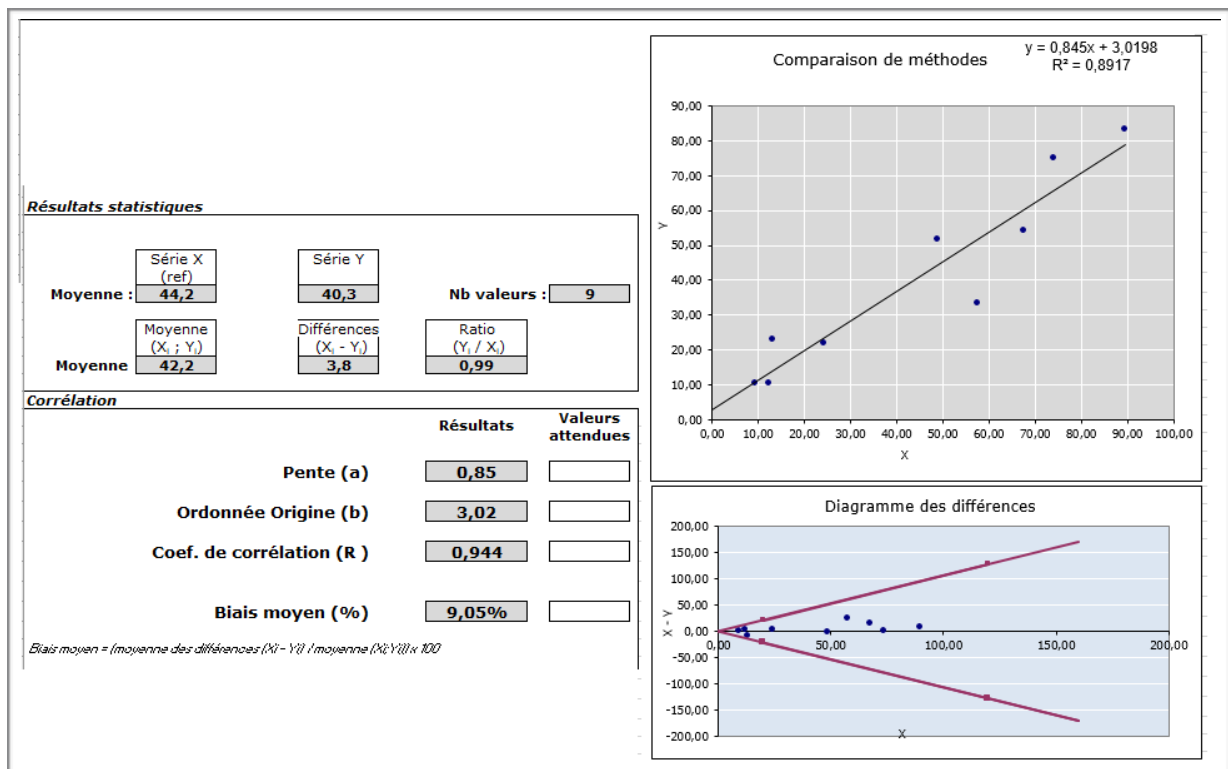
X représente la méthode de référence soit Lille et Y notre méthode.

On établit ainsi un graphique des différences (Xi-Yi) fonction de Xi en reportant les limites de suivi représentées par les droites rouges calculées en fonction des limites de suivi dont le calcul apparait ci dessous (selon SH GTA04):

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ technique de testé}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ technique de comparaison}})^2}$$

Avec  $\sigma_{FI}$  : écart-type de la fidélité intermédiaire (FI) obtenue à partir des CIQ.

## i. Acide lactique



Les valeurs discordantes se trouvent en dehors des limites de suivi représentées par les lignes rouges du diagramme des différences.

On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi.

En l'absence de source bibliographique nous choisissons un biais inférieur à 15%.

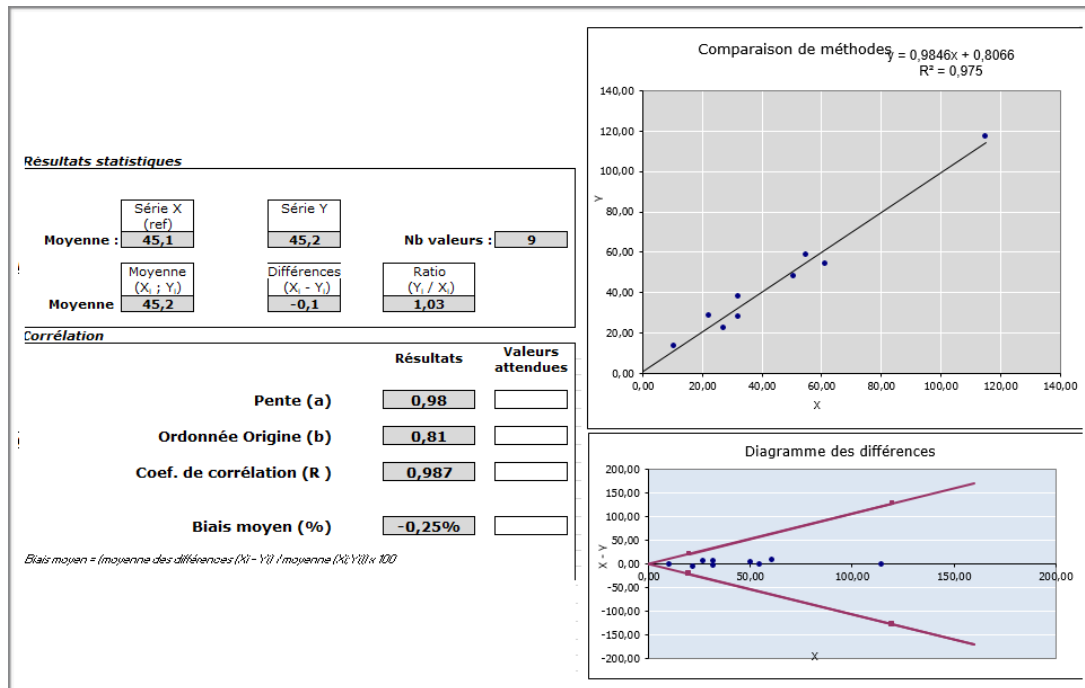
Ici, le biais est mesuré à 9,05% ce qui est acceptable.

Le coefficient de corrélation doit s'approcher de 1, ici il est mesuré à 0,944, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

L'équation de la droite de régression s'interprète sur la pente et l'ordonnée à l'origine, une similitude optimale est une pente à 1 et une ordonnée à l'origine égale à 0.

La pente est à 0,85 pour une ordonnée à 3, ce qui traduit une bonne similitude.

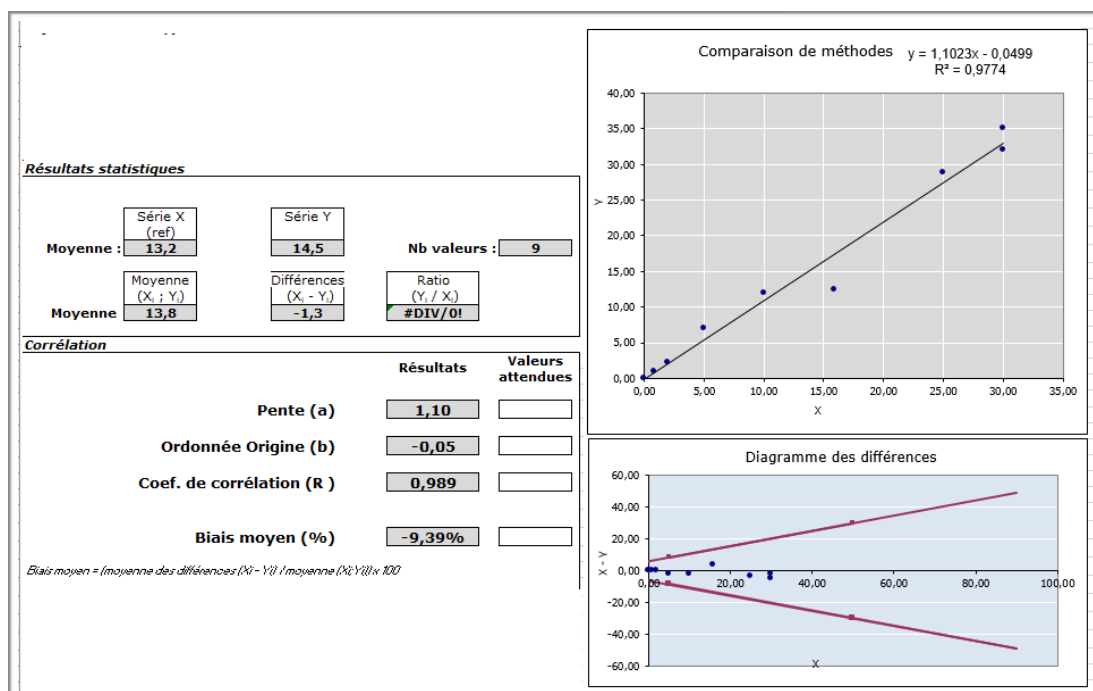
## ii. Acide glycolique



On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à -0,25% ce qui est négligeable.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,944, le lien est donc fort entre les deux méthodes. La pente est à 0,98 pour une ordonnée à 0,81, ce qui traduit une bonne similitude entre nos résultats et ceux de Lille.

## iii. Acide 3OH isovalérique

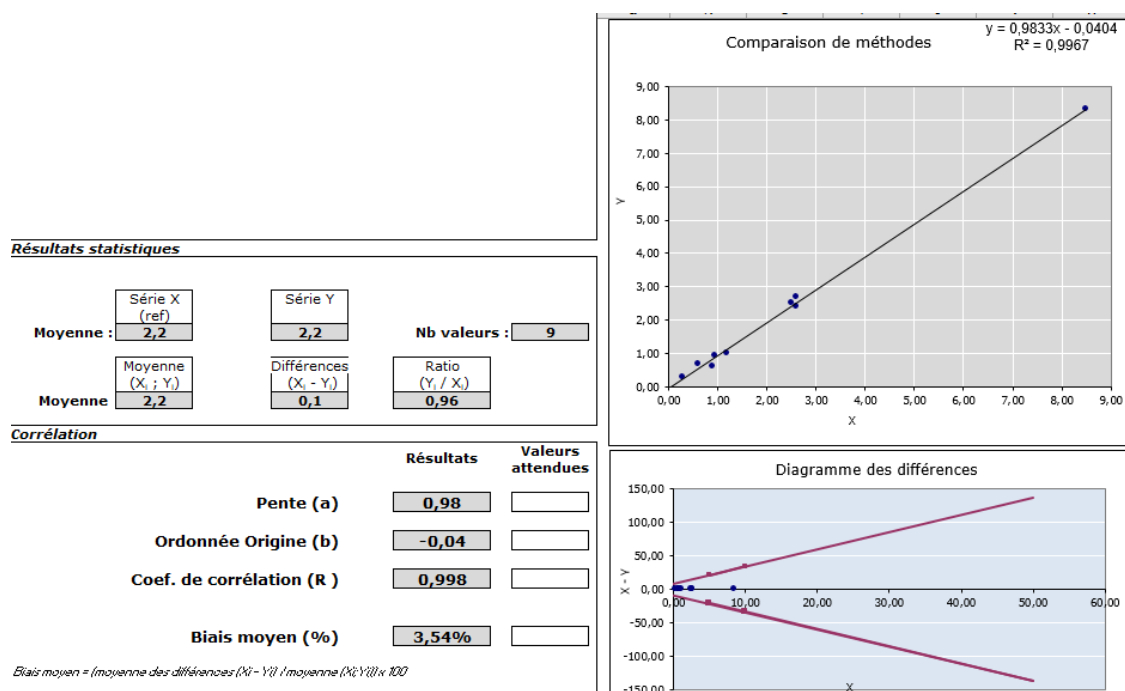


On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisque aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à -9,39 % ce qui est conforme.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,989, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 1,10 pour une ordonnée à -0,05, ce qui traduit une bonne similitude entre les données.

#### iv. MMA

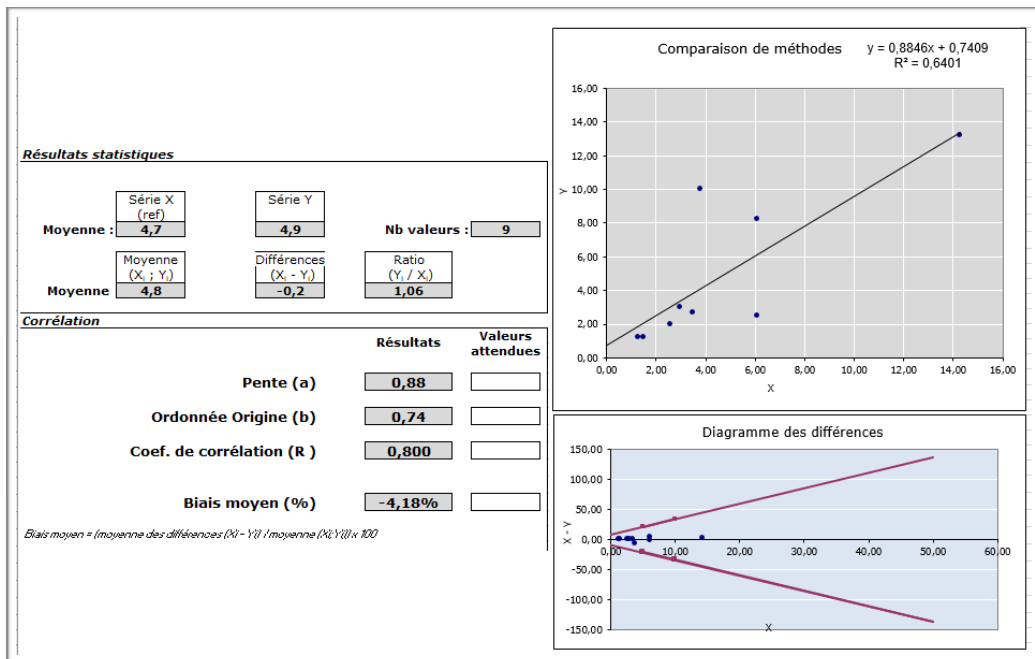


On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisque aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à 3,54 % ce qui est conforme.

Le coefficient de corrélation est mesuré à 0,998, nos valeurs sont donc corrélées.

La pente est à 0,98 pour une ordonnée à -0,04 ce qui traduit une bonne similitude.

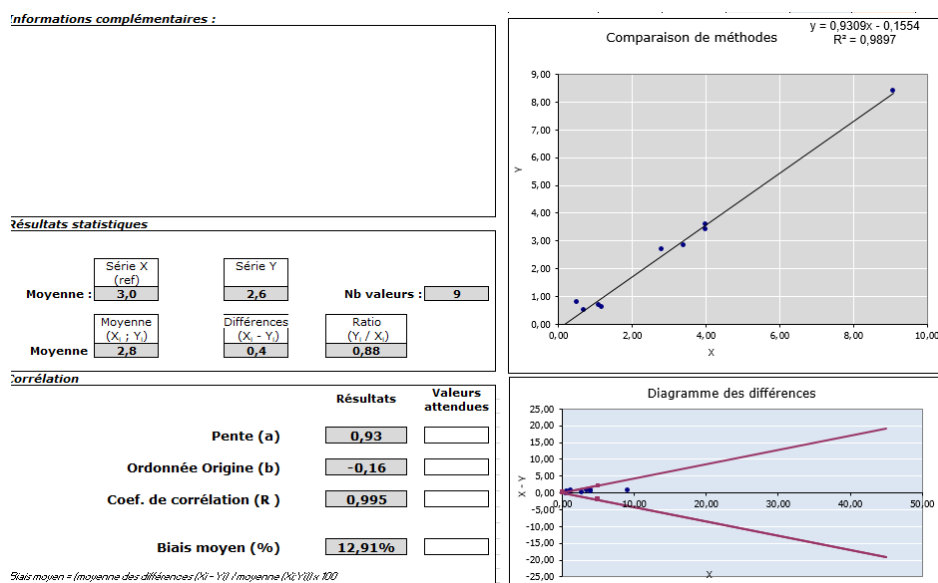
## v. EMA



On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à -4,18% ce qui est conforme.

Le coefficient de corrélation est mesuré à 0,80, nos valeurs sont donc moyennement corrélées à celles de Lille pour l'acide éthylmalonique. La pente est à 0,88 pour une ordonnée à 0,74, ce qui traduit une similitude moyenne entre les données. Ceci peut s'expliquer par la moyenne très basse des dosages, ainsi le petit écart se traduit par un biais plus important que pour des valeurs hautes, ceci n'a donc pas d'impact clinique.

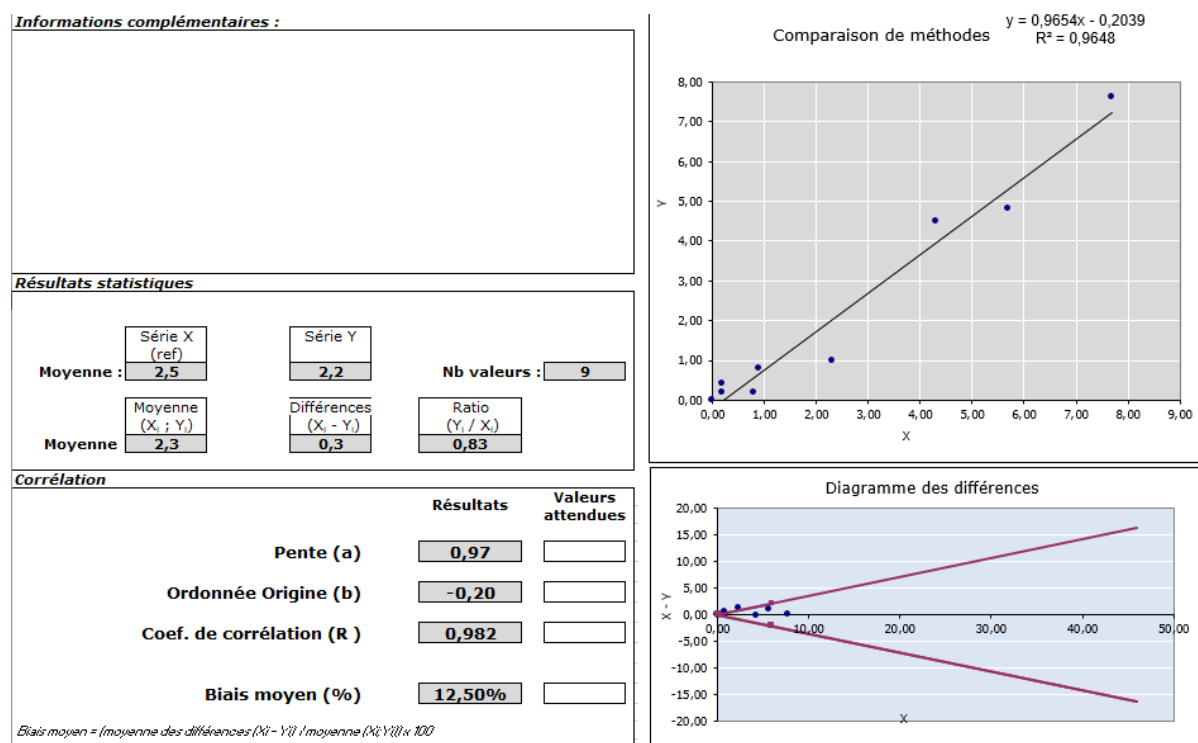
## vi. Acide fumarique



On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à 12,91 % ce qui est très satisfaisant. De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,995, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 0,93 pour une ordonnée à -0,16, ce qui traduit une bonne similitude entre les données.

### vii. Acide glutarique



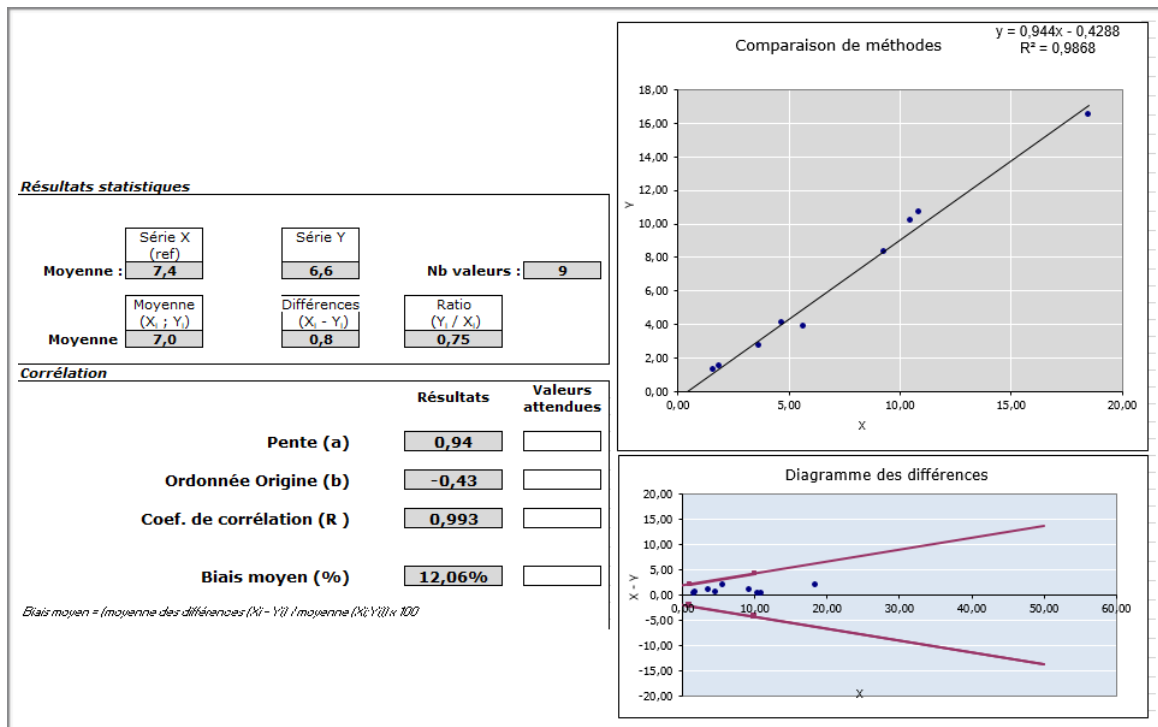
On n'observe deux valeurs discordantes à la limite des limites de suivi entre les deux méthodes, le biais est mesuré à 12,50 % ce qui est très satisfaisant.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,982, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 0,97 pour une ordonnée à -0,20, ce qui traduit une bonne similitude entre les données.



### viii. Acide adipique

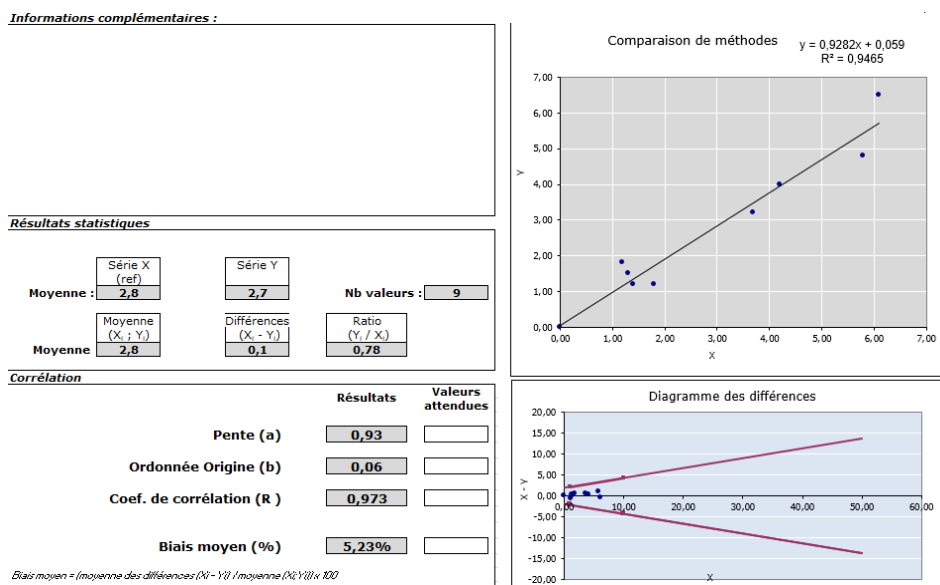


On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à 12,06 % ce qui est conforme.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,993, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 0,94 pour une ordonnée à -0,43, ce qui traduit une excellente similitude entre les données.

### ix. Acide subérique

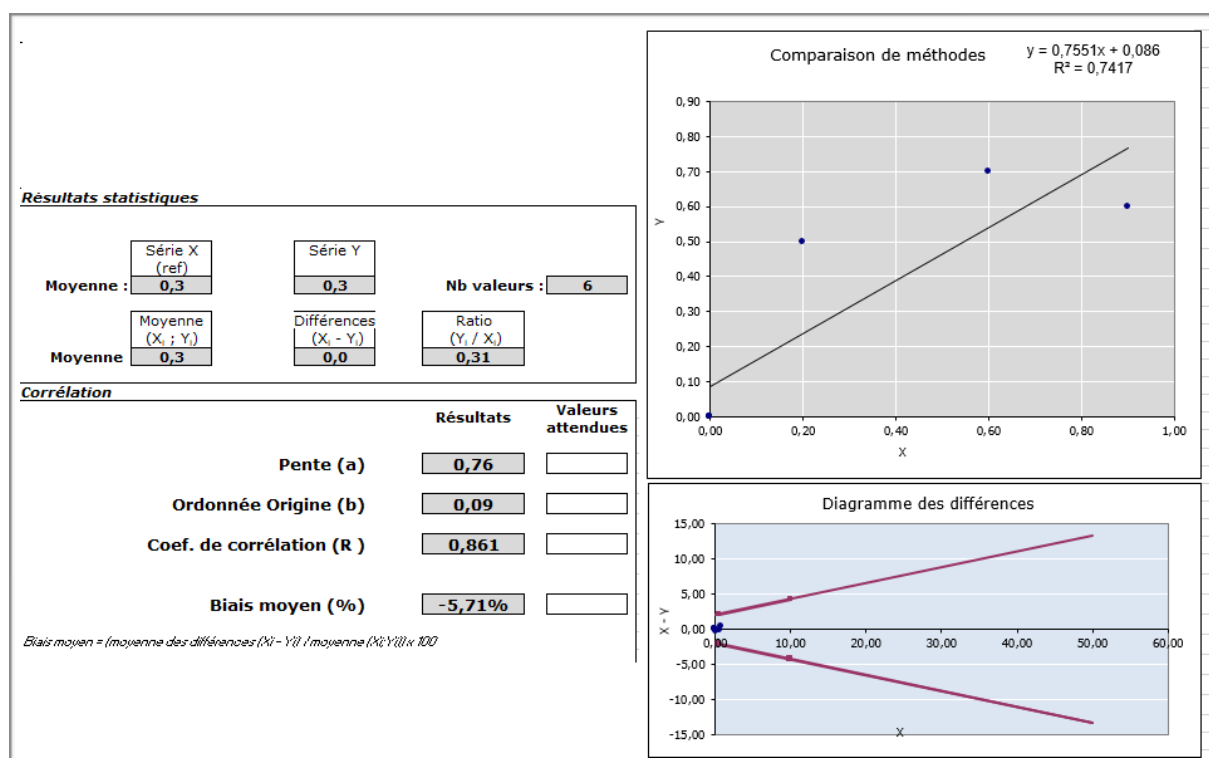


On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à 5,23 % ce qui est conforme.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,973, le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 0,93 pour une ordonnée à 0,06, ce qui traduit une excellente similitude entre les données.

x. Acide sébacique

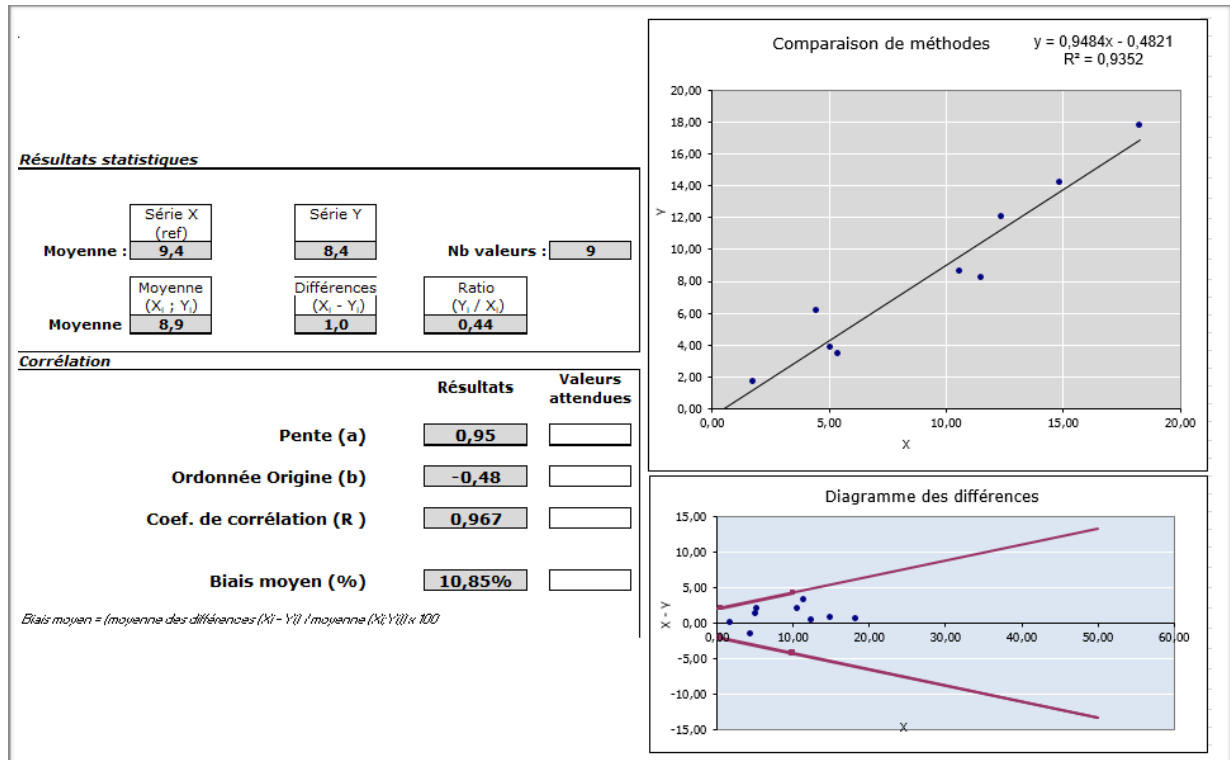


On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à -5,71% ce qui est très satisfaisant.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,861, le lien est présent entre les deux méthodes.

La pente est à 0,76 pour une ordonnée à 0,09, ce qui traduit une similitude moyenne entre les données mais les valeurs sont dans les limites de suivi donc acceptable.

xi. Acide 2-OH glutarique



On n'observe pas de valeurs discordantes entre les deux méthodes puisqu'aucune valeur n'est en dehors des limites de suivi, le biais est mesuré à 10,85 % ce qui est très satisfaisant.

De plus, le coefficient de corrélation est mesuré à 0,967 le lien est donc fort entre les deux méthodes.

La pente est à 0,95 pour une ordonnée à -0,48, ce qui traduit une excellente similitude entre les données.

Nos résultats sont donc comparables à ceux du laboratoire du CHU de Lille, qui représente une technique plus éprouvée que la nôtre et bien corrélés dans nos rendus de résultats.

## V. DISCUSSION

Comme nous l'avons exposé, la détermination de la concentration des acides organiques dans les urines est un dosage indispensable pour le diagnostic et le suivi des maladies métaboliques rares.

Nous avons mis au point une méthode reproductible et fiable dont la vérification des performances devra être complétée par la suite; la mise en application du dosage en routine permettra d'obtenir davantage de recul sur l'inexactitude de la méthode et en faire un calcul plus précis et exploitable. Nos résultats sont comparables aux résultats rendus par les équipes de Lille sur la grande majorité des acides dosés.

L'analyse des acides organiques urinaires est une technique de réalisation très longue, nécessitant un personnel compétent pour le pré-traitement de l'échantillon. Nous avons choisi de nous passer de l'étape de traitement des urines par l'uréase puisqu'elle n'était pas fiable, certains laboratoires recommandent cependant sa réalisation en cas de déficit en succinique semi-aldéhyde pour rechercher l'acide 4hydroxybutyrique, il va de même pour l'étape d'oximation pour les suspicions de tyrosinémie de type I.

Notre mise au point de technique est inspirée des techniques de références (20)(2)(29)(30)(31)(32)(33)(34), l'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse étant la méthode permettant à la fois la meilleure séparation et la meilleure identification parmi les quelques autres méthodes comme l'électrophorèse capillaire (35) ou la spectrométrie de masse en tandem (36).

Néanmoins, les recommandations sur la validation de la méthode par la SFEIM sont en cours de publication à ce jour et aucune validation de méthode n'a encore été publiée; il est donc difficile de situer la validité de notre méthode par rapport à celles qui sont utilisées dans les laboratoires d'autres hôpitaux.

Nous avons rencontré des difficultés au fil des étapes de cette mise en place, la préparation de l'échantillon a nécessité de nombreux essais afin de maîtriser le protocole pour limiter les interférences inhérentes aux manipulations comme l'extraction qui, si elle est mal réalisée par

l'opérateur, engendre un résidu sec trop important et empêche toute injection au risque de boucher l'aiguille. Lors de la mise en place technique, nombreux problèmes de solubilisation des poudres SIGMA™ et d'interférences entre composés ont été résolus avec le mélange commercial. L'intégration des pics et la programmation des ions de référence ont nécessité des recherches bibliographiques et une aide importante par les équipes lilloises. Enfin, nous nous sommes affranchis de l'utilisation d'étalon interne avec une méthode de substitution pour contrôler les extractions.

Ces travaux pourront être complétés par les acides à quantifier si besoin (voir tableau V page 33) afin de compléter et d'améliorer la sensibilité de l'interprétation du biologiste.

Aussi nous pourrions compléter notre gamme de calibration plus largement, notamment pour l'acide lactique qui peut être très élevé dans les crises métaboliques ou l'acide propionique car il était absent du mélange commercial TEN BRINK™.

Des techniques dites simplifiées avec un temps de préparation réduit émergent peu à peu, elles confortent la place de choix de la GCMS dans les aciduries organiques tout en évoluant dans l'optique d'un rendu de résultat plus rapide pour le patient (37).

Pour illustrer un exemple de profil anormal, nous avons choisi de présenter un dosage effectué au laboratoire dans le cadre d'un contrôle externe de qualité dans le tableau XXXII et la figure XIII page 77.

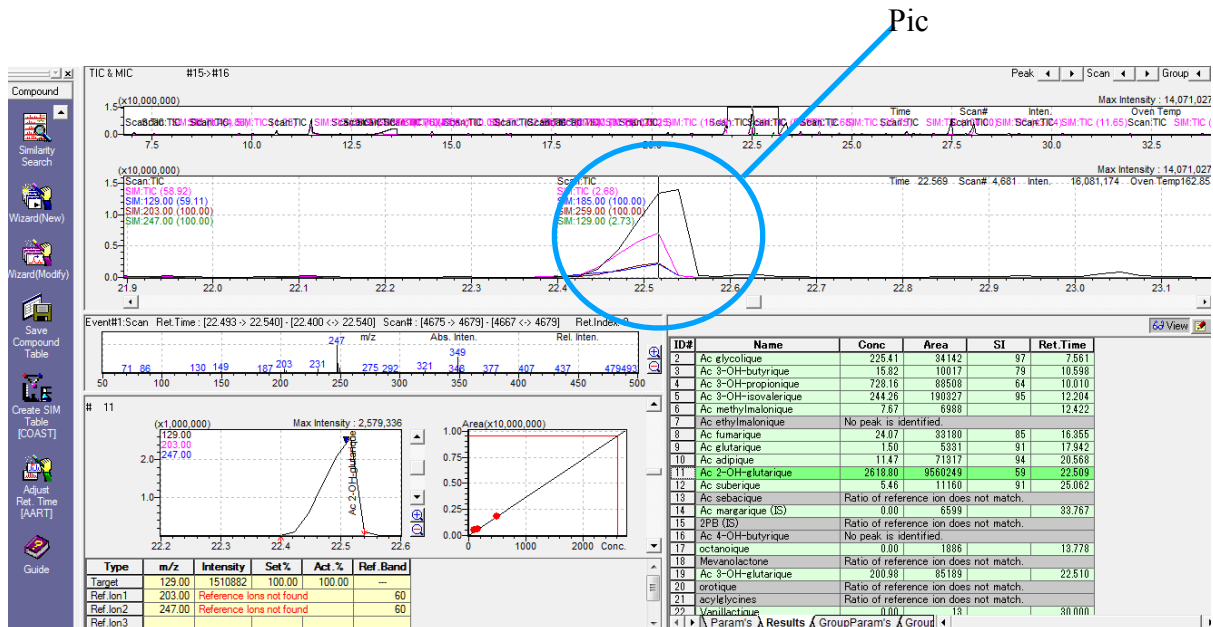
La patiente était une femme qui avait présenté un retard mental à l'âge de quatre ans accompagné de tremor et d'ataxie, diagnostiqué tardivement à l'âge de 43 ans.

La présence d'une augmentation du lactique, propionique et isovalérique ainsi qu'un net excès de 2OH glutarique qui font évoquer une acidurie 2 hydroxyglutarique.

Nous avons proposé le diagnostic probable d'acidurie hydroxyglutarique, ce résultat était concordant avec le résultat attendu. Ce qui corrobore la qualité de notre travail.

**Tableau XXXII: EEO ERNDIM 2020-3**

Acides organiques urinaires	Concentrations en mmol/mol de créatinine
ac lactique	110
ac glycolique	45
ac3OHbut	3
ac3OHprop	14
ac3OHiso	50
ac méthylm	1,52
ac éthylm	0
ac fumarique	5
ac glutarique	0,3
ac adipique	2,4
ac2OHglut	520
ac subérique	1
ac sebacique	0
ac4OHbut	0
octanoique	Non quantifiable
mevanolact	0
ac orotique	0



**Figure XIII: Visualisation du pic d'acide 2OH glutarique**

L'interprétation du profil est l'étape finale; elle commence par l'identification des analytes obtenus sur le profil grâce au TIC qui est la représentation du spectre de masse de tous les pics et identifie chaque pic un à un. Malgré cela une identification visuelle est nécessaire sur chaque pic avec une recherche manuelle des composés en rouge du tableau V pour comparaison à la bibliothèque des spectres. Au final, l'interprétation du profil est basé sur la reconnaissance de motifs anormaux en lien avec des pathologies spécifiques. Chaque conclusion doit se faire après intégration des renseignements cliniques du patient.

Un profil anormal n'est pas suffisant pour conclure et établir le diagnostic d'une acidurie organique. De plus les profils sont souvent variés, il n'existe pas de profils réellement normaux, on peut avoir quelques-uns des acides élevés, des métabolites moyennement élevés ou à la limite du pathologique. Le patient peut également présenter un profil faussement normal parce que le recueil a été effectué en dehors d'un épisode de crise, ou sous traitement. Il est donc nécessaire de répéter ces dosages en cas de forte suspicion clinique. En annexe 2 page 82 nous avons établi un tableau d'aide pour interpréter les profils : les premières colonnes du tableau correspondent à des situations non métaboliques qui peuvent induire des élévations de certains métabolites. La suite du tableau reprend quelques aciduries et leurs patterns typiques d'acides augmentés. Le biologiste pourra donc s'aider de ce tableau pour l'interprétation.

Enfin, afin d'utiliser notre dosage en dehors de son cadre classique de prescription, nous avons décidé de l'appliquer dans un protocole de recherche chez les nouveau-nés atteints de cholestase. Cette étude constituera le travail du mémoire de DES (protocole DAOU n°PI2020\_843\_0022).

L'objectif de ce travail est de démontrer l'intérêt du dosage des acides organiques urinaires chez les patients de néonatalogie atteints de cholestase biologique.

Nos critères d'inclusion sont les suivants : ictère cholestatique avec bilirubine conjuguée > 20 micromol/l ou >10% de la bilirubine totale avec ou sans augmentation des gamma GT et des acides biliaries totaux. Trente patients seront inclus.

Nous présentons les résultats préliminaires des 5 premiers patients inclus dans notre étude. Les profils observés sont normaux, on note la présence de taux d'acide lactique élevés pour deux patients de manière isolée rapportés au contexte clinique et à l'acidose lactique notamment. Ces résultats seront complétés et analysés dans le mémoire de DES présenté prochainement.

**Tableau XXXIII: résultats des 5 premiers patients du DAOU**

AOU	PATIENT1	PATIENT2	PATIENT3	PATIENT4	PATIENT5
acide lactique	31,8	887	78,78	56,81	1165
acide glycolique	12,6	104	34,14	29,17	50,64
ac3OHprop	13,4	17,3	6,3	15,8	88,81
ac3OHbut	0	0	0	5,31	56,97
ac3OHisov	0	33,46	3,63	2,07	42,76
MMA	1,38	5,3	1,29	1,72	0
EMA	3,04	23,34	1,37	3,81	0
acide fumarique	0,29	8	0,54	0,3	8,23
acide glutarique	0,68	0,67	0,41	1,38	0,46
acide adipique	1,4	3,69	1,43	3,03	3,21
acide subérique	0,9	1,76	0	2,29	4,63
acide sébacique	0	0	0	0	0
acide2OHglut	3,49	9,58	0	5,42	0



## VI. CONCLUSION

Les aciduries organiques sont des pathologies graves qui nécessitent une prise en charge précoce. Elles touchent les voies du métabolisme intermédiaire des acides aminés, des sucres ou des lipides.

Nous avons choisi la technique de référence par GCMS et en suivant les recommandations des sociétés savantes. L'étape de prétraitement de l'échantillon et sa conservation sont des étapes sensibles qui influent directement sur la qualité du dosage rendu. La programmation de la technique a nécessité de nombreux essais pour permettre la meilleure identification possible.

La vérification de la qualité de notre méthode est basée sur les critères de la norme NF EN ISO15189 et du COFRAC. À ce jour, aucune validation de méthode n'a été publiée sur le dosage des acides organiques urinaires à notre connaissance.

Nous avons mis au point un dosage fiable et robuste qui sera réévalué de manière annuelle lors de sa mise en application dans le service de biochimie du CHU d'Amiens.

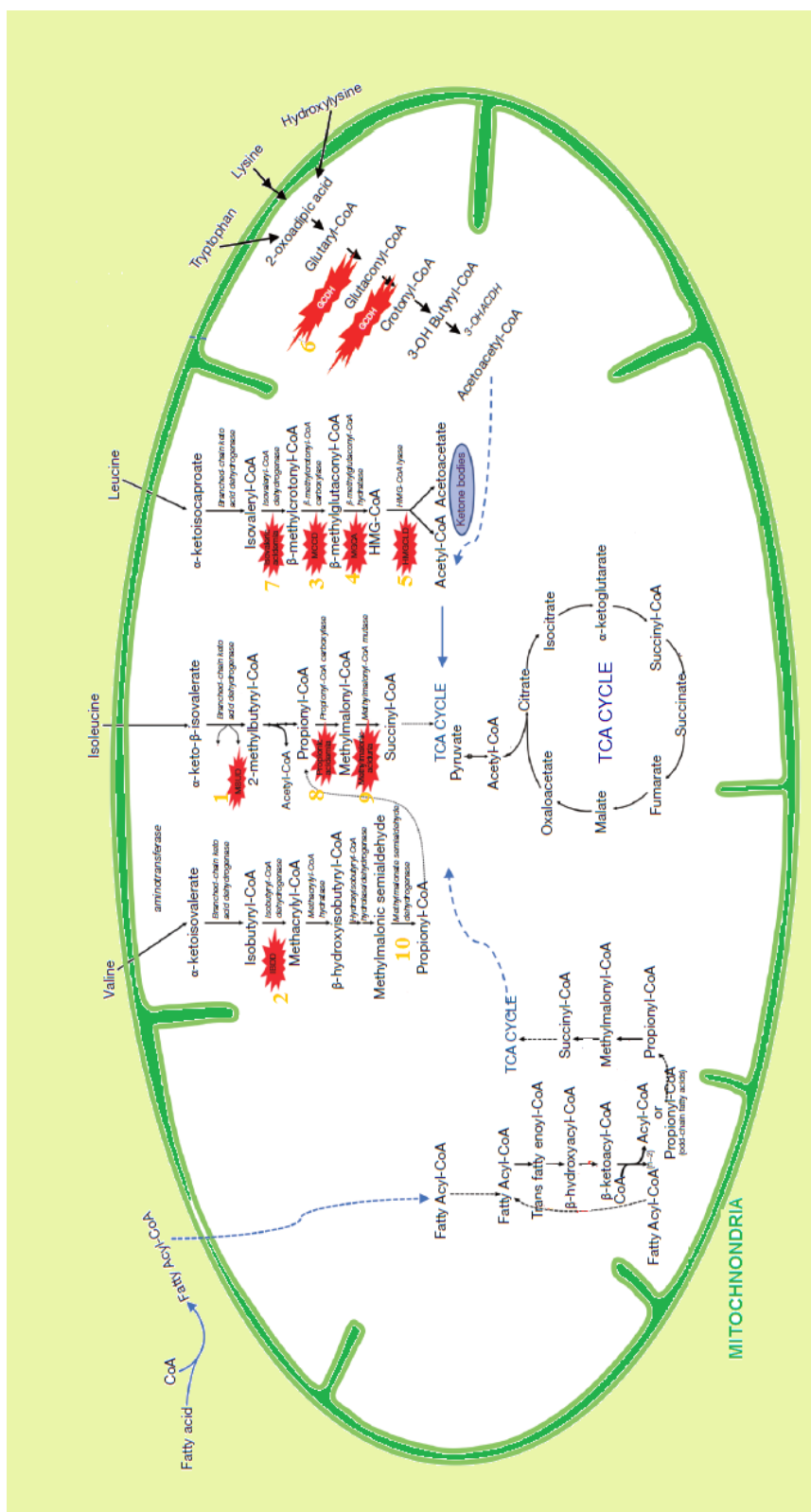
L'évaluation de l'exactitude sera à compléter grâce à la mise en routine de l'analyse.

Notre méthode est comparable de manière robuste à une méthode déjà éprouvée par le CHRU de Lille. Celle-ci pourra également évoluer en fonction des besoins des services pour dépister davantage de pathologies grâce à des compléments d'analyse comme l'ajout d'autres acides organiques urinaires dans notre programme.

L'interprétation biologique nécessite un échange clinico-biologique afin d'identifier, de la manière la plus pertinente les motifs anormaux.

Enfin, l'étude DAOU a montré dans ces premiers résultats des profils sensiblement normaux chez des patients atteints de cholestase mais il conviendra d'analyser l'ensemble des données; une fois le recueil terminé, ces résultats feront l'objet du mémoire de DES.

## LISTE DES ANNEXES



### ANNEXE 1 : voies métaboliques impliquant les aciduries

Chaque numéro en rouge dans le tableau I est à mettre en lien avec les numéros de l'annexe I. Par exemple le numéro **8** correspond à l'acidurie propionique (PA), ce même numéro correspond au point de blocage du métabolisme de l'isoleucine, il s'agit de la propionylCoA carboxylase en annexe 1.

ABU	cause	acidose lactique	atteinte hépatique	B12	traitement	triglycérides à chaînes moyennes	infection bactérienne	déficit multiples en carboxyle carboxyle	déficit en biacétoyl glutarique de type I	Acide glutarique de type II	Acide L-thyrosyl glutarique	déficit sévère en biacétoyl glutarique	trouble de la bêta oxydation MCO	Acide propionique	MMA	EMA	IVA	Hypercollaïne de type I	lysozyme de type I
	acidose lactique	+			lithium		+			+									
	acide érythroïque																		+
	ac3Dhprop	+			despakine		+				+			+					
	ac3Dhbut	+		+				+											
	ac3Dhiso	+			despakine					+	+						+		
	MMA				+										+				
	EMA									+						+			
	acide fumarique				lithium														
	acide glutarique						+			+			+						
	acide adipique	+								+									
	acide subérique	+								+									
	acide rebacique	+								+									
	acide3Dhbut										+								
	acides hors profil		acides aromatiques			hydrohexanoïque	hydroxyphénylacétique	trifluorométhyl	Dicarboxyloxy				si adipique-30hbut	Méthylcitrrique	Méthylsuccinique	Acide oxalique	Acide oxalique	Acide oxalique	Acide oxalique
						hydroxyoctanoïque	hydroxypropionylglycine	trifluorométhyl	Acide 3-oh					Méthylcitrrique	Acétylglutamique	Acétylglutamique	Acétylglutamique	Acétylglutamique	Acétylglutamique
						octanoïque	phénylacétylglutamine		glutamine										
						absence dérivés glycine	phénylpropionylglycine												
							benzoate												
							hippurique												
							Zétylglutamine												
							Zétylglutamine												
							acétylglutamine												
							p-cresol												
							hippurique												

## ANNEXE 2: aide à l'interprétation des profils

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bonafé L, Pelet B, O Boulat, Superti-Furga A. Les erreurs innées du métabolisme: un nouveau défi pour la médecine adulte. *F. Med Suisse*. 2011, 11, 607-612.
- [2] Lehotay DC, Clarke JT. Organic acidurias and related abnormalities. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1995;32:377–429.
- [3] Kumps A, Pierre Duez, Yves Mardens. Metabolic, Nutritional, Iatrogenic, and Artifactual Sources of Urinary Organic Acids: A Comprehensive Table. *Clinical Chemistry* 48:5 708–717 (2002).
- [4] Ottolenghi C, Abermil N, Lescoat A, Aupetit J, Beaugendre O, Morichon-Delvallez N, et al. Gestational age-related reference values for amniotic fluid organic acids. *Prenat Diagn* 2010 ; 30 : 43-8.
- [5] Zschocke, Hoffmann. *Vademecum Metabolicum Manuel de pédiatrie métabolique*. Berlin Schattauer Milupa, 2015.
- [6] Nenad Blau, Marinus Duran, K.Michael Gibson. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2008. 137-170.
- [7] Chabrol B, de Lonlay P. *Maladies métaboliques Héritaires*, doin Rueil malmaison 2011, chapitre 11.
- [8] Villani GRD, Gallo G, Scolamiero E, Salvatore F, Ruoppolo M. “Classical organic acidurias”: diagnosis and pathogenesis. *Clin Exp Med* DOI 10.1007/s10238-016-0435-0 2016.
- [9] Fernandes J, Saudubray JM, Tada K. *inborn metabolic diseases Diagnosis and treatment*, Springer verlag Berlin 1990.
- [10] Hofherr S, Senac J, Chen C, Palmer D, Philip Ng, Barry M. Short-Term Rescue of Neonatal Lethality in a Mouse Model of Propionic Acidemia by Gene Therapy. *Hum Gene Ther*. 2009 Feb; 20(2): 169–180.

- [11] Moussaïf F, Benoist JF, Thioulouse E, Berthe MC, Couderc R. Spectrométrie de masse et diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - DÉCEMBRE 2011 - N°437.
- [12] Seargeant LE, Balachandra K, Mallory C, Dilling LA, Greenberg CR. A simple screening test for fatty acid oxidation defects using whole-blood palmitate oxidation. J Inher Metab Dis 1999 ; 22 : 740-6.
- [13] Labarthe F, Willota S, Rouillet-Renoleaub N, Maakaroun-Vermesse Z, Tardieua M, Leureta O et al. Nutrition des maladies métaboliques rares en pédiatrie, Réanimation (2010) 19, 441—447.
- [14] Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse par Marie Claude Menet – Revue francophone des laboratoires –Decembre 2011-n°437 41-53.
- [15] Uttam Garg and Catherine A. Clinical Applications of Mass Spectrometry Methods and Protocols. Hammett-Stabler, NY 2010.
- [16] Norme NF ISO EN 15189, Exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale. décembre 2012.
- [17] SH GTA 04, Revision 01, Guide Technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, COFRAC.
- [18] SH INF 50, Revision 06, Portées types d'accréditation, COFRAC, 2019.
- [19] Cecile Acquaviva, Christelle Corne, Marie Christine Denis, Anne-Frederique Dessein, Elisabeth Thioulouse, Monique Fontaine et al. recommandations concernant l'analyse des acides organiques urinaires, Novembre 2018.
- [20] Fernandez-Peralbo M, Luque de Castro M. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. Trends in Analytical Chemistry. 2012;41:75-85.
- [21] Groupe Biologie et qualité de la SFEIM. Acides organiques urinaires Biologie et Qualité octobre 2013.

- [22] Le Dourion V, Gantois F. Lignes directrices et recommandations pour la sélection des étalons internes pour l'analyse de substances organiques en spectrométrie de masse. Rapport Aquaref 2018 25p.
- [23]. SH REF 08, Révision 06, Expression et évaluation des portées d'accréditation, COFRAC.
- [24] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation US Department Of Health and Humans Services, Food and Drug Administration Biopharmaceutics, May 2018.
- [25] SH GTA 14, Révision 00, Guide Technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale, COFRAC.
- [26] Boulat O, Gradwohl M, Matos V, Guignard JP, Bachmann C. Organic Acids in the Second Morning urine in a Healthy swiss Paediatric Population. *ClinChemLabMed*2003;41(12):1642–1658.
- [27] Horman I, Traitler H. Routine Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis of Urinary Organic Acids. Results over a Three-Year Period. *Biomedical and environmental mass spectrometry*. Volume 18, 1016-1022.
- [28] Vassault A, Grafnever D, de Graeve J, Cohen JR, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale: spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann BIOIChn* 1999. 57 685-95.
- [29] Tanaka K, Hine DG, West-Dull A, Lynn TB. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. I. Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem*. 1980;26(13):1839–46.
- [30] Kumari C, Singh A, Ramji S, Shoemaker JD, Kapoor S. Urinary Organic Acids Quantitated in a Healthy North Indian Pediatric Population, *Ind J Clin Biochem*, 2013 14-19.
- [31] Vaidyanathan K, Narayanan M.P, Vasudevan D.M. Organic acidurias: An Updated Review. *Ind. J. Clin. Biochem*, 2011, 26, 319-325.
- [32] Liebich H.M. Basic profiles of organic acids in urine. *J. of Chrom B*, 1990, 525, 1-14.
- [33] Fitch WL, Anderson PJ, Smith DH. Isolation, identification and quantitation of urinary organic acids. *Journal of Chromatography*, 162 (1979) 249-259.

- [34] Tanaka K, West-Dull A, Hine DG, Lynn TB, Lowe T. Gas- chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin Chem.* 1980;26(13):1847–53.
- [35] Garcia A, Barbas C, Aguilar R, Castro M. Capillary elec- trophoresis for rapid profiling of organic acidurias. *Clin Chem.* 1998;44(9):1905–11.
- [36] Pitt JJ, Eggington M, Kahler SG. Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2002;48(11): 1970–80.
- [37] Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S . Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 942–948.

## **Intérêt et validation du dosage des acides organiques urinaires au CHU d'Amiens**

Les aciduries organiques font partie du groupe des erreurs innées du métabolisme. Ce sont des pathologies touchant le métabolisme intermédiaire des acides aminés, des sucres ou des lipides, et nécessitant un diagnostic et une prise en charge précoce. Le blocage d'un enzyme entraîne une accumulation des acides organiques dosables dans les urines.

Nous avons donc mis au point un dosage indispensable au diagnostic de ces maladies héréditaires métaboliques. Ce dernier est effectué par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse, selon le respect de normes de qualité. La mise au point de la technique a demandé de nombreux essais et un paramétrage complexe pour garantir les meilleures performances. Les paramètres de validité analytique sont basés sur les critères de la norme NF EN ISO 15189. Notre méthode est fiable, robuste et comparable à une méthode déjà éprouvée mais aucune validation de méthode n'a encore été publiée. Des essais supplémentaires complèteront l'analyse de la justesse lors de la mise en routine très prochaine de l'analyse au CHU d'Amiens.

Notre dosage est actuellement appliqué à une population de cholestase néonatale, pour explorer son intérêt dans cette situation.

Mots clefs : acidurie organique, maladies métaboliques, erreurs innées du métabolisme, chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse, acidurie méthylmalonique type CbIA, néonatalogie.

## **Interest and validation of the dosage of urinary organic acids at the University Hospital of Amiens**

Organic acidurias belong to the group of inborn errors of metabolism. These are pathologies affecting the intermediate metabolism of amino acids, sugars or lipids, and requiring early diagnosis and management. Blockade of an enzyme leads to an accumulation of measurable organic acids in the urine. We have therefore developed an assay essential for the diagnosis of these hereditary metabolic diseases. This assay is carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry, in accordance with quality standards. The development of the technique required numerous tests and complex settings to guarantee the best performance. The analytical validity parameters are based on the criteria of standard NF EN ISO 15189.

Our method is reliable, robust and comparable to an already proven method but no validation method has yet been published. Additional tests will soon complete the accuracy analysis when it will be routinely used at the Amiens University Hospital.

Our assay is currently applied to a population with neonatal cholestasis, to explore its interest in this situation.

Keywords: organic aciduria, metabolic diseases, inborn errors of metabolism, gas chromatography-mass spectrometry, methylmalonic aciduria type CbIA, neonatology.