



HAL
open science

Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS du coenzyme Q10 plasmatique et musculaire

Fanny Fontaine

► **To cite this version:**

Fanny Fontaine. Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS du coenzyme Q10 plasmatique et musculaire. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03613263

HAL Id: dumas-03613263

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03613263>

Submitted on 18 Mar 2022

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.



THESE
(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS du
Coenzyme Q₁₀ plasmatique et musculaire**

Présentée par
Fanny FONTAINE

**Soutenue publiquement le 20 octobre 2021
devant le jury composé de**

Monsieur Michel BOULOUARD	PU Université de Caen	Président du jury
Monsieur Stéphane ALLOUCHE	PU-PH CHU de Caen	Examineur
Monsieur Damien LEGALLOIS	MCU-PH CHU de Caen	Examineur
Monsieur Alexandre CESBRON	PH CHU de Caen	Examineur

Thèse dirigée par le Professeur Stéphane ALLOUCHE



LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie



CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
DUBOST Emmanuelle	Chimie organique et thérapeutique
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale
KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale,
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies anti-cancéreuses

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie..... Anglais

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SEDILLO Patrick..... Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

Au Professeur *Michel Boulouard*, qui me fait l'honneur de juger mon travail. Merci d'avoir accepté sans hésiter de présider le jury de cette thèse.

A mon directeur de thèse, le Professeur *Stéphane Allouche*. Merci Chef de m'avoir accueillie recueillie au laboratoire de Biochimie, je n'ai absolument aucun regret d'avoir changé de voie, je fais plein de choses différentes, de la culture cellulaire, de la biochimie, de la spectro de masse, de la bio mol, de la génétique... je ne pouvais pas rêver mieux ! Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées tout au long de ce travail. Merci pour tes conseils, tes critiques, ta bienveillance, ta patience, ta disponibilité sans limite 7j/7 et (presque) 24h/24 malgré ton emploi du temps de ministre. Merci pour tes cours particuliers sur les mitochondries, désolée d'avoir frappé autant de fois à ta porte pour te poser plein (trop) de questions (et le pire, c'est que je vais continuer) ! Merci pour les manips à l'arrache et à la louche (haha !), ta délicatesse légendaire, ta connaissance encyclopédique du contenu de tous les congélateurs et placards du laboratoire. Merci pour ton sourire, ta bonne humeur et ton énergie positive permanente malgré les aléas de la vie. Merci enfin pour les conseils Paddle et Wingfoil (Remonte au vent !!!!). En témoignage de ma profonde et sincère reconnaissance ☺

Au Docteur *Damien Legallois*, pour ta participation dans ce jury et ton implication dans ce projet. Merci pour ton partage de connaissances en cardiologie, les manips sur la cohorte RESIST et tes relectures attentives de la publication.

Au Docteur *Alexandre Cesbron*, pour ta participation dans ce jury (ton tout premier !) et pour ta relecture de ce manuscrit. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes conseils spectro de masse et ton encadrement pour les premières manips CoQ₁₀.

Au Docteur *Laurent Coulbault*, pour toutes les connaissances que tu m'as transmises sur la spectrométrie de masse et pour tes conseils avisés dans la mise au point et la validation du dosage du CoQ₁₀, grâce à toi le 5500 n'a (presque) plus de

secrets pour moi ! Mille mercis, surtout, pour les runs que tu as lancés pour moi le soir pour que je puisse aller chercher mes enfants pas trop tard...

Aux équipes du Professeur *Gaëtan Lesca* des Hospices Civils de Lyon, et du Docteur *Fanny Mochel* de la Pitié-Salpêtrière, pour leur collaboration et leurs échanges constructifs dans l'étude des deux cas cliniques de déficit en CoQ₁₀.

Au Docteur *Agnès Lequerrec*, que je ne remercierai jamais assez de m'avoir dit : « Va voir Stéphane, tu verras il est sympa ». Merci pour ton enseignement de qualité sur la qualité et surtout (surtout !) pour m'avoir offert le livre « *Comment ne pas être une mère parfaite* », dont j'applique, bien évidemment, les recommandations à la lettre !!! Non pas que j'avais prétention à en être une (de mère parfaite), mais on essaye toujours de faire de son mieux sans culpabiliser de se consacrer également à son travail...

Aux biologistes, actuels et anciens, du laboratoire de Biochimie : *Sabine Fradin*, *Frédérique Grandhomme*, *Marie Nowoczyn*, *Geneviève Lubac*, *David Guénet*, *Anne Chocat* et *Marie-Hélène Read*. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour votre partage de connaissances et vos conseils durant mes années d'internat. S'il y a bien un service où on n'a pas peur de (re)(re)(re)poser des questions, c'est bien celui de Biochimie.

Mention spéciale à *Marie* pour nos discussions de mères parfaitement imparfaites et décomplexées (cf. ci-dessus) : des fois, on se raconte les ~~conneries~~ bêtises de nos crapauds et après ça va mieux ☺

A tous les techniciens du laboratoire, sans qui ce travail n'aurait pas eu la même saveur, vous êtes au top du top, la meilleure équipe du CHU de Caen !

- la Team Mitochondrie bien sûr : *Magali*, *Thérèse*, *Estelle* et *Mathilde*, avec qui j'ai passé de nombreuses journées. Merci les filles pour votre enseignement de toutes les techniques et trucs et astuces de bio mol, d'enzymo et de polaro (on l'aime bien, hein, notre petit Hansatech), votre gentillesse (dites, j'aurais besoin de faire une PCR...), votre réactivité (en fait, j'en aurais besoin pour... hier...), votre sourire, votre bonne humeur. Merci aussi d'avoir nourri et choyé mes fibros et mes cybrides pendant

mes vacances. Un clin d'œil particulier à *Estelle* (#teamcouture) pour nos discussions chiffons et couture.

- la Team HPLC : *Sandy, Christine, Lydie, Thierry, Dorothee*, et la Team Bioch Méta : *re Sandy, Claire, Estelle (la grande), Maud*, pour m'avoir permis de squatter le 5500 le plus souvent possible.

- le quatuor de choc : *Thomas (mon p'tit chat), Florian, Maël, Alex*. Sans vous, la vie serait beaucoup moins fun !

- les filles de nuit : *Gwendaline* et *Magalie*, en souvenir des gardes passées ensemble (pas fâchée de ne plus en avoir !).

- et tous les autres : *Céline, Valérie, Laetitia* (#teamcouture et #teampâtisserie), *Ingrid, Sandrine, Marie-Apolline, l'ancienne Gaëlle, l'actuelle Gaëlle, la nouvelle Gaëlle, Marie-Christine, Dominique, Sylviane, Didier, Laurette, Séverine, Virginie, Isabelle, Catherine, Sylvie, Arnaud, Loïck* (#teampâtisserie), *Mélanie*... j'espère n'avoir oublié personne ! Merci à tous pour la bonne ambiance, les fous rires, les pause cafés, les gâteaux...

- sans oublier le labo de Pharmaco : *Véro, Magalie, Johanna, Evelyne, Corinne, Christine, Delphine, Valérie*, pour la très sympathique cohabitation ☺

- ni ma super coloc' de bureau *Sylvie*, merci pour tous ces bons moments partagés, nos discussions sur à peu près tout et n'importe quoi mais surtout sur nos (petits) enfants respectifs ! et merci pour tous les pots de confiture que Martin (mais pas que) a joyeusement finis !



Un jour que je rédigeais ma thèse, j'ai vu passer ceci sur les réseaux sociaux :
« On demande à une mère de s'occuper de ses enfants comme si elle n'avait pas de travail, de travailler comme si elle n'avait pas d'enfants, et d'avoir l'apparence d'une

femme qui n'a ni travail ni enfants »... Alors, je dédie cette thèse à toutes ces « wonder mamans »

- qui essaient de conjuguer travail, enfants, conjoint, loisirs en ratant la moitié des choses,

- qui ont 4 journées en une : celle avant le boulot où t'as vidé le lave-vaisselle, lancé une lessive et préparé les enfants, la vraie journée de boulot, celle après le boulot quand t'as récupéré tes enfants, et celle après 21h quand les enfants sont couchés : « ah chouette, j'ai 2h devant moi » - 21h30 : « bon en fait, j'avais me coucher »

- qui laissent leurs enfants le matin à la crèche avec 39° de fièvre en baissant la tête parce qu'elles n'ont pas le choix, ou qui les récupèrent le soir en encaissant un « ça leur fait des sacrées journées quand même... »,

- qui jouent aux devinettes : « Alors, sachant que n°2 a la varicelle, que n°1 a vomi 15 fois depuis hier soir, que papa garde n°1 et que je suis de garde cette nuit, quelle est la probabilité pour que tout le monde soit crevé et chope la gastro avant la fin de la semaine, et que n°1 chope la varicelle dans 2 semaines ? »,

- qui ont un abonnement week-end chez SOS Médecins : « à partir de 3 consultations par mois, on vous offre un massage » (ah zut, c'est pas remboursé par la Sécu...)

- qui ont traumatisé leurs enfants à vie : « Regarde maman, là c'est mon laboratoire avec plein d'instruments bizarres, et là c'est mon sac de garde avec mon doudou de garde parce que je suis de garde cet après-midi parce que je dois donner à manger à mes cellules » (je précise que je n'ai pas de doudou de garde...),

- qui se retrouvent avec de très jolis dessins sur les publications à lire (qui finissent par s'entasser sous le lit...)

- qui vont courir 10km un soir et puis plus rien pendant 3 semaines,

- qui ont rigolé, mais rigolé, quand on leur a dit qu'il fallait qu'elles télétravaillent avec deux enfants en bas âge,

- j'en passe et des meilleures 😊



A mes parents et à ma sœur, à ma grand-mère, à ma famille et à ma belle-famille, à mes amis. Promis, cette fois j'arrête les études !

Enfin...
je crois...

Aux trois amours de ma vie,

A *Alban*, merci pour ton soutien de chaque instant.

Tu es le fromage râpé sur mes pâtes, la confiture de figues sur mon fromage de chèvre, la feuillantine de mon Paris-Brest.

A *Martin* mon p'tit coquin et *Juliette* ma crapouillette, mes deux piles électriques (#leschiensfontpasdeschats), pour tout le temps que je ne vous ai pas consacré, et pour tout celui que je ne vous consacrerai pas...

*En essayant continuellement, on finit par réussir.
Donc, plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.*

Jacques Rouxel, Les Shadocks

(toujours d'actualité depuis ma première thèse...)

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	17
INTRODUCTION	21
I. Généralités sur le Coenzyme Q ₁₀	21
1. Découverte.....	21
2. Structure	21
3. Distribution	22
a) Pool tissulaire	22
b) Pool sanguin.....	23
4. Localisation membranaire	24
II. Biosynthèse du Coenzyme Q.....	26
1. Biosynthèse de l'acide 4-hydroxybenzoïque.....	26
2. Biosynthèse de la chaîne latérale polyisoprényle : la voie du mévalonate	28
3. Biosynthèse du Coenzyme Q.....	29
a) Prénylation du 4HB par Coq2/COQ2	29
b) Hydroxylations en C5, C6 et C1	30
c) O-méthylation en C5 et C6 par Coq3/COQ3	31
d) Méthylation en C2 par Coq5/COQ5	31
e) Protéines non caractérisées	32
4. Le complexe Q.....	34
III. Apport exogène, pharmacocinétique.....	35
1. Sources alimentaires de CoQ ₁₀	35
2. Absorption.....	35
3. Distribution	36
4. Métabolisme et élimination	37
IV. Fonctions du Coenzyme Q ₁₀	38
1. Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale	38
2. Antioxydant endogène.....	44
3. Autres fonctions proposées du CoQ ₁₀	46
a) Métabolisme des pyrimidines.....	46
b) Le système redox des membranes plasmiques (PMRS).....	47
c) Régulation des pores de transition de perméabilité mitochondriale.....	48
d) Amélioration de la fonction endothéliale.....	49
e) Régulation de l'expression génique	49

V.	Les déficits en CoQ ₁₀	49
1.	Les déficits primaires.....	50
a)	Clinique	50
b)	Physiopathologie	51
2.	Les déficits secondaires	52
3.	Supplémentation en CoQ ₁₀ dans les déficits primaires et secondaires	54
a)	Profil de sécurité et posologie	54
b)	Efficacité clinique	54
VI.	Intérêt du dosage du CoQ ₁₀ dans les milieux biologiques	55
1.	Choix du milieu biologique	55
a)	Muscle	56
b)	Fibroblastes	57
c)	Plasma	57
d)	Autres milieux biologiques	58
2.	Place du dosage du CoQ ₁₀ dans le diagnostic des maladies mitochondriales	59
	MATERIELS ET METHODES.....	63
I.	Sélection des sujets.....	63
1.	Cohorte RESIST pour le dosage plasmatique	63
2.	Cohorte pour comparaison plasma/muscle	64
3.	Cohorte pour le dosage musculaire.....	64
II.	Conditions de prélèvement	64
III.	Dosage du CoQ ₁₀	65
1.	Réactifs et solvants	65
2.	Calibrants, étalon interne et contrôles qualités	66
a)	Calibrants	66
b)	Etalon interne	66
c)	Contrôles internes de qualité (CIQ).....	66
3.	Traitement pré-analytique	67
a)	Dosage plasmatique	67
b)	Dosage musculaire	68
4.	Analyse chromatographique.....	68
5.	Spectrométrie de masse	69
a)	Principes généraux.....	69
b)	Source d'ionisation	69
c)	Séparation des ions	71
IV.	Validation de la méthode analytique selon la norme ISO 15189	72
1.	Répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire.....	73
2.	Variabilité inter-opérateurs	74

3.	Exactitude	74
4.	Spécificité analytique.....	74
5.	Incertitude	75
6.	Etendue de mesure et linéarité.....	75
7.	Interférences	76
8.	Contamination inter-échantillons	77
9.	Robustesse et fiabilité des réactifs	77
10.	Effet de matrice et rendement d'extraction.....	77
V.	Etude biochimique du muscle	78
1.	Préparation des homogénats musculaires.....	78
2.	Dosage des protéines	79
3.	Dosage de la citrate synthase	79
VI.	Analyses statistiques	80
	RESULTATS - MISE EN PLACE DE LA METHODE DE DOSAGE.....	81
I.	Mise au point de la méthode analytique.....	81
1.	Etape pré-analytique	81
2.	Exemple de chromatogramme	85
3.	Dosage de l'ubiquinone vs. ubiquinol	85
4.	Effet de matrice et optimisation de la gamme d'étalonnage.....	87
5.	Rendement d'extraction	88
II.	Validation et performance de la méthode.....	89
1.	Spécificité analytique.....	89
2.	Etendue de mesure et linéarité.....	89
3.	Répétabilité et fidélité intermédiaire.....	90
4.	Interférences	91
5.	Contamination inter-échantillon	91
6.	Stabilité des échantillons.....	92
a)	Stabilité pré-analytique	92
b)	Stabilité post-extraction	93
c)	Stabilité à la conservation.....	94
7.	Exactitude	94
8.	Incertitude	97
9.	Robustesse de la méthode.....	98
a)	Matrices acceptables	98
b)	Paramètres de l'HPLC	98
	RESULTATS - APPLICATIONS CLINIQUES.....	100
I.	Dosage du CoQ ₁₀ plasmatique dans l'infarctus du myocarde.....	100

1.	Contexte : infarctus du myocarde et remodelage ventriculaire	100
2.	Rôle du CoQ ₁₀ dans l'infarctus du myocarde	101
3.	Objectifs de l'étude.....	102
4.	Conclusion	103
5.	Détermination de valeurs de référence du CoQ ₁₀ plasmatique	103
II.	Dosage du CoQ ₁₀ dans les pathologies mitochondriales.....	104
1.	Détermination de valeurs de référence du CoQ ₁₀ musculaire	105
2.	Un déficit en CoQ ₁₀ lié à une variation du gène <i>COQ8A</i>	105
3.	Un déficit en CoQ ₁₀ lié à une variation du gène <i>COQ9</i>	108
	DISCUSSION	115
I.	Mise au point et validation de la méthode de dosage du CoQ ₁₀	115
II.	Applications cliniques	122
	CONCLUSION	131
	ANNEXE	133
	BIBLIOGRAPHIE	143

ABREVIATIONS

- 4HB : Acide 4-hydroxybenzoïque
- 4HBz : 4-hydroxybenzaldéhyde
- 4HPP : 4-hydroxyphénylpyruvate
- ADP : Adénosine diphosphate
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- APCI : Atmospheric pressure chemical ionization (ionisation chimique à pression atmosphérique)
- ATP : Adénosine triphosphate
- BSA : Bovine serum albumin (albumine sérique bovine)
- CIQ : Contrôle interne de qualité
- CoA : Coenzyme A
- CoQ₁₀ : Coenzyme Q₁₀ forme oxydée ubiquinone
- CoQ₁₀^{*} : Coenzyme Q₁₀ forme semiquinone
- CoQ₁₀H₂ : Coenzyme Q₁₀ forme réduite ubiquinol
- COX : Cytochrome c oxydase
- CRmt : Chaîne respiratoire mitochondriale
- CV : Coefficient de variation
- EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
- EEQ : Evaluation externe de la qualité
- EI : Etalon interne
- ESI : Electrospray ionization
- FAD(H₂): Flavine adénine dinucléotide
- FDA : Food and drug administration
- FMN : Flavine mononucléotide
- FPP : Farnésyl pyrophosphate
- HDL : High density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
- HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
- HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
- HPLC-MS/MS : High performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem)
- LCR : Liquide céphalorachidien
- LDL : Low density lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)

LOD : limit of detection (limite de detection)
LOQ : Limit of quantification (limite de quantification)
m/z : rapport masse/charge
MM : masse molaire
MRM : Multiple reaction monitoring
MS : mass spectrometry (spectrométrie de masse)
NAD(H) : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H) : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGS : Next Generation Sequencing (séquençage haut débit)
pABA : Acide *para*-aminobenzoïque
PPHB : polyprényl hydroxybenzoate
ROS : Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
RVG : Remodelage ventriculaire gauche
SDH : Succinate déshydrogénase
SAM : S-adénosylméthionine
SNC : Système nerveux central
STEMI : ST segment elevation myocardial infarction (infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST)
T_r : Temps de rétention
VLDL : Very low density lipoprotein (lipoprotéine de très basse densité)
VUS : Variant of Unknown Significance (variant de signification indéterminée)
WES : Whole Exome Sequencing (séquençage de l'exome)
WGS : Whole Genome Sequencing (séquençage du génome)

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1. Structure générale des ubiquinones.	22
Figure 2. Les trois états redox du Coenzyme Q.	22
Figure 3. Localisations intramembranaires possibles du CoQ (adapté de Lenaz <i>et al.</i>).	25
Figure 4. Localisation et translocation de l'ubiquinol (en jaune) dans la bicouche lipidique (en blanc : cardiolipide, en bleu : phosphatidylcholine, en violet : phosphatidyléthanolamine). ...	25
Figure 5. Schéma général de la synthèse du CoQ (FPP : Farnésyl pyrophosphate).	26
Figure 6. Synthèse du 4HB chez <i>S. cerevisiae</i> et l'homme.	27
Figure 7. Structure des autres précurseurs naturels du CoQ.	28
Figure 8. Implication de la voie du mévalonate (en bleu) dans la synthèse du CoQ, du cholestérol, du dolichol et des protéines prénylées (adapté de Tricarico <i>et al.</i>).	29
Figure 9. Structure des analogues du 4HB pouvant être prénylés par COQ2.	30
Figure 10. Schéma récapitulatif de la synthèse du CoQ chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'homme.	32
Figure 11. Organisation du complexe Q chez <i>S. cerevisiae</i>	34
Figure 12. Evolution de la concentration plasmatique en CoQ ₁₀ en fonction de la posologie pendant 4 semaines de traitement et 2 semaines après l'arrêt du traitement.	36
Figure 13. Pharmacocinétique du Coenzyme Q ₁₀ (adapté de Martelli <i>et al.</i>).	38
Figure 14. Place de la mitochondrie dans la production énergétique cellulaire.	39
Figure 15. Schéma représentatif du complexe I (adapté de Wirth <i>et al.</i>)	39
Figure 16. Schéma représentatif du complexe II (adapté de Nelson <i>et al.</i>)	40
Figure 17. Représentation du cycle Q dans le complexe III.	41
Figure 18. Schéma représentatif du complexe IV (adapté de Belevich <i>et al.</i>).	41
Figure 19. Schéma représentatif du complexe V.	42
Figure 20. Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de ses différents complexes.	43
Figure 21. Les différentes voies métaboliques utilisant le CoQ ₁₀ comme accepteur d'électrons.	44
Figure 22. Sites d'action du CoQ sur la peroxydation lipidique (adapté de Bentinger <i>et al.</i>).	45
Figure 23. Rôles du CoQ ₁₀ dans les cellules.	46
Figure 24. Implication du CoQ ₁₀ et de la CRmt dans le fonctionnement de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH).	47
Figure 25. Schéma représentatif du système redox de la membrane plasmique.	48
Figure 26. Manifestations cliniques et gènes impliqués dans les déficits primaires en CoQ ₁₀	50

Figure 27. Place du dosage du CoQ ₁₀ dans le diagnostic des maladies mitochondriales.....	59
Figure 28. Processus pré-analytique et analytique du dosage du CoQ ₁₀	65
Figure 29. Caractéristiques techniques de la colonne Pursuit PFP® et représentation schématique des groupements PFP.....	69
Figure 30. Représentation schématique d'un spectromètre de masse.....	69
Figure 31. Théorie de l'APCI.....	70
Figure 32. Fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.....	71
Figure 33. Principe de l'acquisition en mode MRM (adapté de Boja <i>et al.</i>).....	71
Figure 34. Spectre de fragmentation du CoQ ₁₀	72
Figure 35. Préparation des solutions pour la détermination de l'effet de matrice et du rendement d'extraction.	78
Figure 36. Profil des ions retrouvés en Q1 après infusion d'une solution pure de CoQ ₁₀	83
Figure 37. Profil des ions retrouvés en Q3 après sélection de l'ion parent m/z 863,4 en Q1.	84
Figure 38. Chromatogramme type obtenu pour le dosage du CoQ ₁₀	85
Figure 39. Exemple d'une courbe de calibration.	90
Figure 40. Détermination de la durée maximale de conservation des extraits organiques à -20°C avant injection sur l'appareil d'HPLC, sur les 3 niveaux de CIQ.....	93
Figure 41. Pourcentage de variation des concentrations en CoQ ₁₀ en fonction des cycles de congélation/décongélation, sur les 3 niveaux de CIQ.	94
Figure 42. Valeurs des z-score obtenus pour les échantillons d'EEQ du programme ERNDIM pour l'année 2020.....	96
Figure 43. Résultats d'EEQ rendus par les 10 laboratoires en fonction de la méthode analytique utilisée.	97
Figure 44. Comparaison du dosage du CoQ ₁₀ entre plasma EDTA et plasma hépariné (A) ou plasma EDTA et sérum (B).....	98
Figure 45. Influence de l'usure de la colonne sur l'élargissement des pics chromatographiques.....	99
Figure 46. Implications possibles du CoQ ₁₀ dans le développement de l'insuffisance cardiaque post-IDM.....	101
Figure 47. Analyse des différents ARNm du gène COQ9 marqués par sondes fluorescentes, extraits de différents tissus.	109
Figure 48. Chromatogrammes obtenus après ajout de la transition correspondant au 6-déméthoxyCoQ ₁₀ (6-DMQ ₁₀).....	112
Figure 49. Représentation 2D (A) et 3D (B) des interactions entre l'adénosine 5'-(β,γ-imido)triphosphate et les principaux acides aminés du site actif de la protéine COQ8A.	125

Figure 50. A) Structure tertiaire de la protéine COQ9, localisation des différents domaines et de l'emplacement de la Valine 25. Structure déterminée par le logiciel de prédiction AlphaFold. B) Modèle de liaison des ligands de COQ9 et de l'interaction avec COQ7.128

Tableau 1. Teneur (en µg/g de tissu) en CoQ ₁₀ , en CoQ ₉ et proportion de la forme réduite dans différents tissus chez l'homme et le rat (adapté de Åberg <i>et al.</i>)	23
Tableau 2. Teneur (en µmol/g de protéine) en CoQ ₉ dans les organites du foie chez le rat (adapté de Zhang <i>et al.</i>)	23
Tableau 3. Distribution du CoQ ₁₀ dans le sang total, le plasma et les lipoprotéines (adapté de Tomasetti <i>et al.</i>).....	24
Tableau 4. Avantages et inconvénients des différents milieux biologiques pour le dosage du CoQ ₁₀ (adapté de Yubero <i>et al.</i>)	56
Tableau 5. Classification ACMG.	60
Tableau 6. Liste des réactifs et solvants utilisés.....	65
Tableau 7. Dosage du CoQ ₁₀ : gradient de solvants HPLC.....	68
Tableau 8. Paramètres de température et de pression des gaz de la source APCI.....	70
Tableau 9. Validation de la méthode de dosage du CoQ ₁₀ : paramètres à vérifier.	73
Tableau 10. Influence du nombre d'extractions sur la sensibilité de la méthode.	82
Tableau 11. Transitions MRM, temps de rétention et paramètres d'acquisition du CoQ ₁₀ et du CoQ ₁₀ -d ⁹ (étalon interne).....	84
Tableau 12. Influence du traitement pré-analytique sur le dosage du CoQ ₁₀	86
Tableau 13. Estimation de l'effet de matrice.	88
Tableau 14. Estimation du rendement d'extraction.	88
Tableau 15. Variabilité intra- et inter-série des temps de rétention du CoQ ₁₀ et de son EI. ...	89
Tableau 16. Exemples de valeurs normales (VN) et d'étendue de mesure (EM) de différentes techniques de dosage du CoQ ₁₀	89
Tableau 17. Répétabilité et fidélité intermédiaire.....	90
Tableau 18. Etude de l'interférence de l'hémolyse, de l'ictère et de la lactescence sur le dosage du CoQ ₁₀	91
Tableau 19. Etude de la contamination inter-échantillon sur le dosage plasmatique du CoQ ₁₀	92
Tableau 20. Etude de la stabilité pré-analytique du CoQ ₁₀ sur sang total EDTA.	93
Tableau 21. Résultats obtenus pour le dosage des EEQ ERNDIM sur l'année 2020.	95
Tableau 22. Incertitudes sur la mesure du CoQ ₁₀ plasmatique en fonction de la concentration en CoQ ₁₀ des CIQ.	97
Tableau 23. Valeurs de référence déterminées pour le CoQ ₁₀ plasmatique et les ratios CoQ ₁₀ /T-CHL et CoQ ₁₀ /LDL-CHL.	104

Tableau 24. Valeurs de référence déterminées pour le CoQ ₁₀ musculaire rapporté au taux de protéines ou à l'activité de la citrate synthase (CS).	105
Tableau 25. Proportions approximatives (en pourcentage) du transcrit attendu et du transcrit additionnel majoritaire dans différents tissus.	110
Tableau 26. Mesure des activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.	110
Tableau 27. Tableau comparatif des performances analytiques de différentes méthodes de dosage du CoQ ₁₀ plasmatique et musculaire décrites dans la littérature.	117
Tableau 28. Tableau comparatif des valeurs de référence du CoQ ₁₀ plasmatique décrites dans la littérature.	118
Tableau 29. Tableau comparatif des coefficients de corrélation r entre le CoQ ₁₀ et le cholestérol total ou LDL décrits dans la littérature.	118
Tableau 30. Tableau comparatif des valeurs de référence du CoQ ₁₀ musculaire décrites dans la littérature.	121

INTRODUCTION

I. Généralités sur le Coenzyme Q₁₀

1. Découverte

En 1955, l'équipe de Morton isole et décrit une « substance SA » à partir de fractions lipidiques de différents tissus animaux (rat, cochon, cheval).¹ Cette substance, qui présente un pic d'absorption à 272nm dans le cyclohexane, est décrite comme relativement non-polaire, pouvant être un hydrocarbure, un stéroïde ou une vitamine liposoluble. L'analyse du spectre infra-rouge du composé suggère la présence d'un chromophore constitué de double-liaisons conjuguées à une ou deux fonctions cétone, et d'un ou plusieurs groupements *isopropyle*.

Deux ans plus tard, Crane *et al.* extraient un « composé quinonique Q-275 » (absorbant à 275nm dans l'éthanol) à partir de mitochondries de cœur de bœuf et établissent qu'il participe comme coenzyme à la chaîne respiratoire mitochondriale grâce à des cycles réversibles d'oxydation et de réduction.² Ils décrivent également la présence de ce composé et de quatre homologues chez des levures et des bactéries ; ce groupe de molécules est alors désigné sous le terme Coenzyme Q.³ Leur structure est finalement caractérisée en 1958 par Wolf *et al.*⁴

2. Structure

Les ubiquinones (ou Coenzyme Q – CoQ) sont des molécules organiques constituées d'une tête polaire et d'une chaîne latérale hydrophobe ce qui leur confère leur caractère amphiphile. Leur structure générale est présentée dans la Figure 1 : le noyau 5,6-diméthoxy-3-méthyl-1,4-benzoquinone est substitué en position 2 par une chaîne latérale composée de 6 à 10 unités isoprènes dont la longueur dépend de l'espèce. La taille de cette chaîne est à la base de la nomenclature qui identifie les ubiquinones sous le terme Coenzyme Q_n, où *n* représente le nombre d'unités isoprènes. Le Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀ – Masse Moléculaire MM=863,64g/mol) est la principale forme active chez l'homme alors qu'on retrouve majoritairement le CoQ₉ chez le rat,⁵ le CoQ₈ chez les entérobactéries⁶ et le CoQ₆ chez *Saccharomyces cerevisiae*.⁷

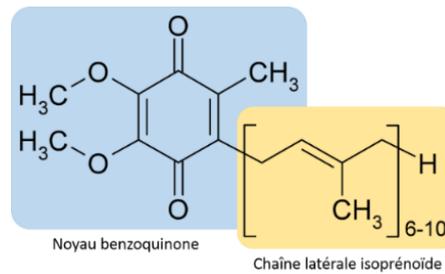


Figure 1. Structure générale des ubiquinones. Dénomination IUPAC : 2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E,26E,30E,34E)-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-Decamethyltetraconta-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-decaenyl]-5,6-dimethoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione.

La présence des deux fonctions cétone en *para* du noyau benzène permet au CoQ d'exister sous trois états redox : la forme ubiquinone (CoQ) complètement oxydée, la forme semiquinone (CoQH•) partiellement réduite et la forme ubiquinol (CoQH₂) complètement réduite présentant deux fonctions alcool (Figure 2).⁸ La conversion entre ces différentes formes par réactions d'oxydo-réduction explique les rôles du CoQ comme coenzyme, antioxydant et transporteur d'électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale qui seront détaillés plus loin (page 38).

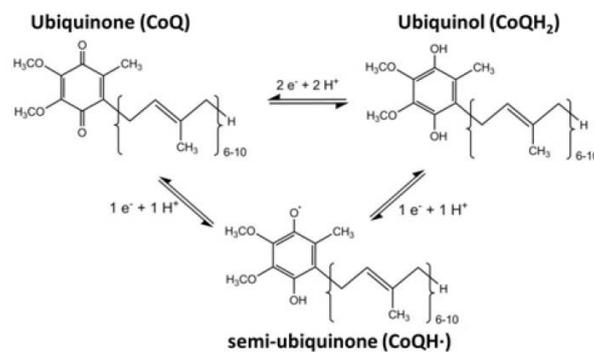


Figure 2. Les trois états redox du Coenzyme Q.⁸

3. Distribution

Le pool total de CoQ₁₀ chez l'adulte est estimé entre 0,5 et 1,5g et se répartit entre un pool tissulaire majoritaire et un pool sanguin.⁹

a) Pool tissulaire

Le CoQ est présent dans tous les tissus et cellules chez quasiment tous les organismes vivants : dès 1959, il est isolé chez les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons.⁷ La mesure des taux de CoQ dans différents tissus prélevés en post-mortem chez le rat et l'homme révèle des taux variables selon les organes

(Tableau 1).⁵ Chez l'homme, la quantité de CoQ₁₀ varie de 8µg par gramme de tissu dans les poumons à 114µg par gramme dans le cœur. Que ce soit chez l'homme ou le rat, les quantités les plus importantes se retrouvent au niveau des organes qui consomment beaucoup d'énergie : le cœur, le foie et les reins. Le cœur est ainsi l'organe le plus riche en CoQ où il participe à la production d'ATP (Adénosine Triphosphate) nécessaire à la contraction myocardique. La proportion de la forme réduite varie également selon les organes, mais elle est majoritaire dans la plupart des tissus chez l'homme, excepté le cerveau et les poumons.

	Homme			Rat		
	CoQ ₁₀ (µg/g de tissu)	CoQ ₉ (µg/g de tissu)	Forme réduite (%)	CoQ ₁₀ (µg/g de tissu)	CoQ ₉ (µg/g de tissu)	Forme réduite (%)
Cœur	114	3	47	17	202	22
Rein	67	3	73	22	124	42
Foie	55	2	95	21	131	87
Muscles	40	1	60	3	43	40
Pancréas	33	2	100	3	37	62
Rate	25	1	87	9	23	18
Thyroïde	25	1	68	7	44	45
Cerveau	13	1	23	19	37	27
Ventricule	12	n.d.	59	5	56	52
Intestin	12	1	93	19	51	67
Colon	11	1	83	8	48	52
Testicules	11	1	78	5	32	49
Poumons	8	1	24	2	17	12

Tableau 1. Teneur (en µg/g de tissu) en CoQ₁₀, en CoQ₉ et proportion de la forme réduite dans différents tissus chez l'homme et le rat (adapté de Åberg et al.⁵) – n.d. : non déterminé.

Les taux de CoQ varient également selon les compartiments cellulaires. Tous les organites isolés à partir de différentes fractions cellulaires de foie de rat contiennent du CoQ. Cependant, les taux les plus importants sont retrouvés dans les mitochondries, les lysosomes et les vésicules de Golgi (Tableau 2).¹⁰

Organite	CoQ ₉
Membrane externe mitochondriale	3,4
Membrane interne mitochondriale	2,5
Lysosomes	1,1
Vésicules de Golgi	0,8
Membranes plasmiques	0,4
Microsomes	0,1
Peroxisomes	0,1

Tableau 2. Teneur en CoQ₉ (µmol/g de protéine) dans les organites du foie chez le rat (adapté de Zhang et al.¹⁰).

b) Pool sanguin

Le CoQ se retrouve aussi dans le plasma où il participe à la composition des lipoprotéines. Les résultats d'une étude de la distribution du CoQ₁₀ dans le sang et les lipoprotéines chez 83 donneurs sains sont indiqués dans le Tableau 3. La

concentration en CoQ₁₀ est plus élevée dans le plasma que dans le sang total. Dans le sang total, le CoQ₁₀ se répartit à 76% dans la fraction plasmatique et à 24% dans la fraction cellulaire. Dans le plasma, 58% du CoQ₁₀ se retrouvent associés aux lipoprotéines de basse densité (LDL), 26% aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et 16% aux autres lipoprotéines. Les taux plasmatiques de CoQ₁₀ sont corrélés positivement avec les taux de cholestérol total ($r=0,63$, $p<0,001$) et de LDL-cholestérol ($r=0,57$, $p<0,001$), mais pas avec le taux de HDL-cholestérol.¹¹

Fraction du sang	CoQ ₁₀ (µmol/L)
Plasma	1,11
Sang total	0,70
Fraction plasmatique	0,53 (soit 76%)
Fraction cellulaire	0,17 (soit 24%)
Lipoprotéines	
LDL	0,71 (soit 58%)
HDL	0,32 (soit 26%)
Autres lipoprotéines	0,24 (soit 16%)

Tableau 3. Distribution du CoQ₁₀ dans le sang total, le plasma et les lipoprotéines (adapté de Tomasetti et al.¹¹).

Mohr *et al.* ont évalué l'impact de la supplémentation alimentaire en CoQ₁₀ chez des volontaires sains âgés de 31 à 35 ans. Après 11 jours de supplémentation par trois fois 100mg de CoQ₁₀ par jour, la concentration en coenzyme augmente d'un facteur 4 dans le plasma et dans les LDL.¹² Dans le plasma, environ 90% du CoQ se retrouvent sous la forme ubiquinol ; le ratio CoQH₂/CoQ n'est pas affecté par l'apport exogène de CoQ, suggérant un contrôle strict de l'état redox de la molécule dans le sang nécessaire à ses fonctions.

4. Localisation membranaire

Dans les tissus et les cellules, le CoQ se trouve notamment associé aux membranes plasmiques. Cependant, sa localisation intramembranaire précise n'est pas complètement élucidée et différentes études ont conduit à différents résultats. De par son caractère amphiphile, le CoQ adopte probablement une configuration semblable aux phospholipides, le noyau benzoquinone s'orientant vers la surface intra- ou extra-cellulaire polaire des bicouches lipidiques et la chaîne isoprénoïde vers la partie hydrophobe interne (Figure 3A).^{13,14} Il semble également que le CoQ peut se localiser au cœur de la région hydrophobe, parallèlement au plan de la bicouche lipidique (Figure 3B).¹⁵

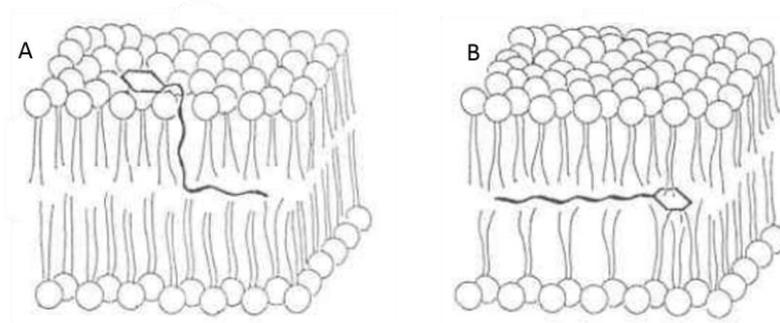


Figure 3. Localisations intramembranaires possibles du CoQ (adapté de Lenaz et al.).¹³

Une étude récente par simulation de la dynamique moléculaire sur des modèles de bicouches lipidiques mimant la membrane interne des mitochondries a confirmé ces deux hypothèses.¹⁶ Kaurola *et al.* ont montré que la localisation du CoQ dépend de son état d'oxydation : la forme réduite oriente préférentiellement son noyau quinone vers le cytosol ou vers le milieu extracellulaire, plus précisément au niveau de la partie glycérol des phospholipides qui stabilisent l'ubiquinol grâce à des liaisons hydrogènes.¹⁷ La forme oxydée peut également adopter cette configuration mais se retrouve majoritairement au centre de la bicouche lipidique, ce qui est en accord avec son caractère moins polaire que l'ubiquinol. Les auteurs ont également évalué la dynamique du CoQ au sein de la membrane : les deux formes se déplacent librement par translocation du noyau benzoquinone d'un bord à l'autre de la bicouche (Figure 4). La vitesse de déplacement du CoQ est de l'ordre de 10 à 100ns, soit dix à cent fois plus rapide que le CoQH₂ (1000ns). Cette dynamique permet au CoQ d'optimiser ses interactions avec les substrats et les enzymes de la CRmt afin de maximiser la synthèse d'ATP.

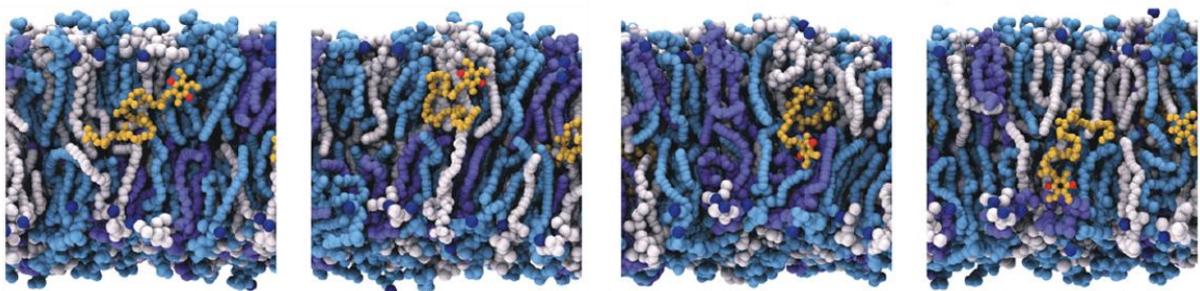


Figure 4. Localisation et translocation de l'ubiquinol (en jaune) dans la bicouche lipidique (en blanc : cardiolipide, en bleu : phosphatidylcholine, en violet : phosphatidylethanolamine).¹⁶

II. Biosynthèse du Coenzyme Q

Le CoQ tissulaire provient principalement de sa synthèse *de novo* dans toutes les cellules de l'organisme. La plupart des connaissances relatives à sa biosynthèse proviennent d'études chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* à partir de mutants déficients en CoQ.^{18,19} La synthèse du CoQ est un processus complexe, impliquant de nombreuses enzymes et plusieurs voies métaboliques dans différents compartiments cellulaires. La Figure 5 représente les 3 étapes principales de la synthèse du CoQ : la condensation de l'acide 4-hydroxybenzoïque avec la chaîne polyprényl-pyrophosphate issue de la voie du mévalonate conduit à l'acide polyprényl-4-hydroxybenzoïque. Ce dernier subit ensuite plusieurs modifications au niveau du noyau benzoquinone pour donner le CoQ.

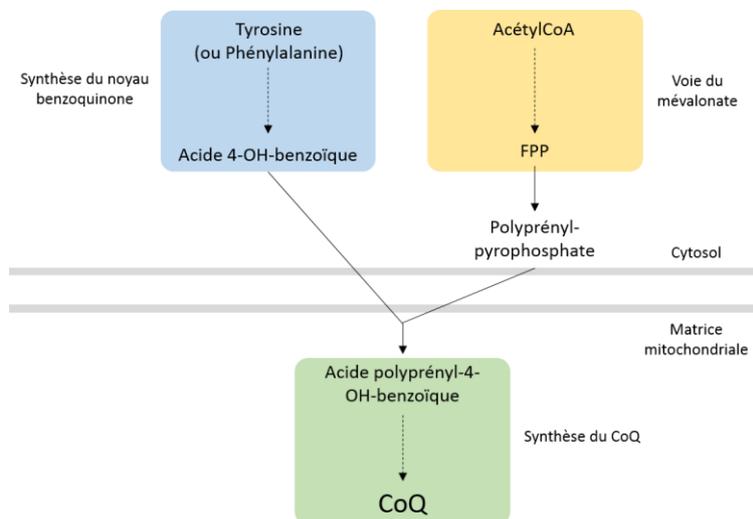


Figure 5. Schéma général de la synthèse du CoQ (FPP : Farnésyl pyrophosphate).

1. Biosynthèse de l'acide 4-hydroxybenzoïque

Les différentes étapes de la synthèse de l'acide 4-hydroxybenzoïque (4HB) chez *S. cerevisiae* (enzymes indiquées en vert) et l'homme (enzymes indiquées en bleu) sont représentées dans la Figure 6. Chez les eucaryotes, le 4HB dérive de la tyrosine. Chez l'homme, les cellules possèdent la phénylalanine hydroxylase (PAH) qui leur permet d'utiliser également la phénylalanine comme précurseur.²⁰ Les levures et les bactéries peuvent quant à elles générer le 4HB à partir du chorismate *via* la voie du shikimate.

Payet *et al.* ont identifié deux intermédiaires dans la synthèse du 4HB chez *S. cerevisiae* : le 4-hydroxyphénylpyruvate (4HPP) issu de la transamination de la

tyrosine par les aminotransférases Aro8 et Aro9 ; et le 4-hydroxybenzaldéhyde (4HBz) dont l'oxydation par l'aldéhyde déshydrogénase Hdf1 conduit au 4HB. L'enzyme impliquée dans la conversion du 4HPP en 4HBz reste à élucider.²¹

Chez l'homme, les protéines homologues permettant la conversion de la tyrosine en 4HB demeurent incertaines. La transamination de la tyrosine en 4HPP serait catalysée par la tyrosine aminotransférase TAT ou l'alpha-aminoacide aminotransférase AADAT.²² Des analyses phylogénétiques et multi-omiques ont révélé une analogie entre Hdf1 et les aldéhydes déshydrogénases humaines ALDH3, mais seule l'isoforme ALDH3A1 permet l'oxydation du 4HBz en 4HB *in vitro*. L'expression de l'ALDH3A1 dans des mutants déficients en Hdf1 restaure la synthèse du CoQ chez la levure.²³ Cependant, la participation de l'ALDH3A1 dans la biosynthèse endogène du CoQ₁₀ chez l'homme reste à établir.

L'enzyme Hdf1 est localisée dans la membrane mitochondriale externe ce qui indiquerait que la synthèse du 4HB a lieu dans le cytosol. En revanche, l'incorporation du 4HB dans la synthèse du CoQ a lieu dans la matrice mitochondriale. Il existerait donc un transporteur du 4HB à travers la membrane mitochondriale qu'il reste à identifier (voir schéma récapitulatif Figure 10).²²

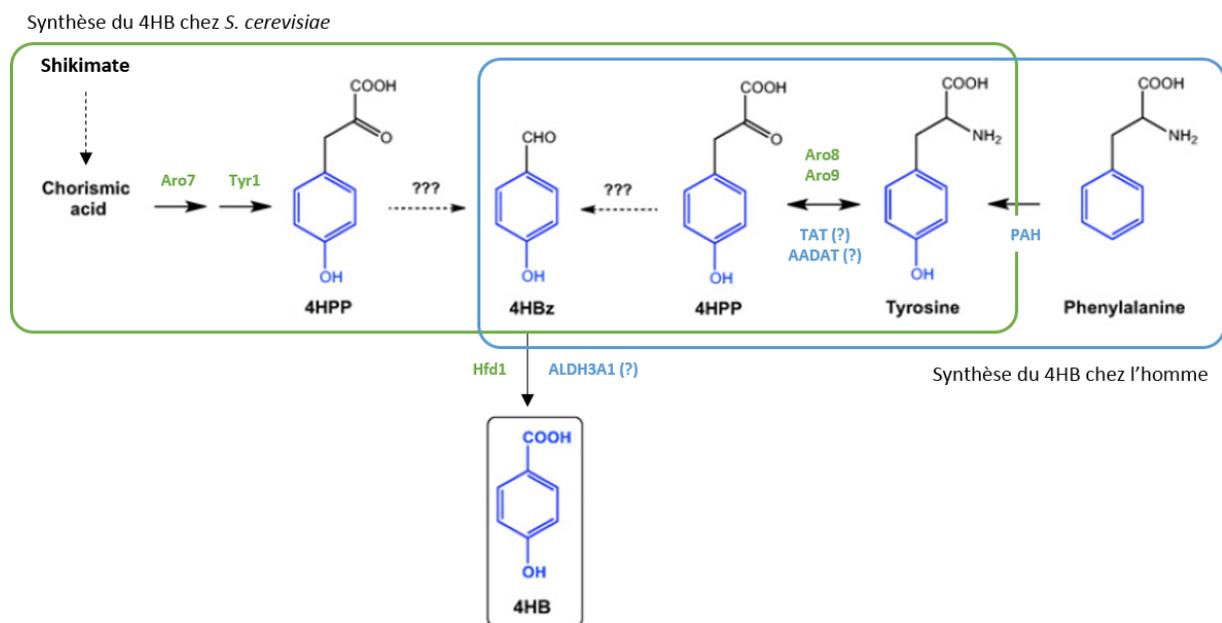


Figure 6. Synthèse du 4HB chez *S. cerevisiae* et l'homme ; (?) indique que les enzymes demeurent imprécises (adapté de Awad et al.¹⁹).

D'autres précurseurs aromatiques naturels du 4HB peuvent être utilisés pour la synthèse du CoQ (Figure 7). Chez la levure, il a ainsi été montré que l'acide *para*-aminobenzoïque (pABA), l'acide *p*-coumarique, le resveratrol et, dans une moindre

mesure, le kaempferol, étaient efficacement incorporés dans la synthèse du CoQ₆.^{24,25} Chez l'homme, le pABA n'est pas utilisé comme précurseur et inhibe au contraire l'incorporation du 4HB dans le CoQ₁₀.²⁶ Le kaempferol est en revanche un précurseur très efficace capable d'augmenter la synthèse du CoQ₁₀.²⁷ Ces molécules naturelles apportées par l'alimentation sont métabolisées en 4HB et offrent une alternative pour la synthèse du CoQ en cas de déficit en 4HB endogène.

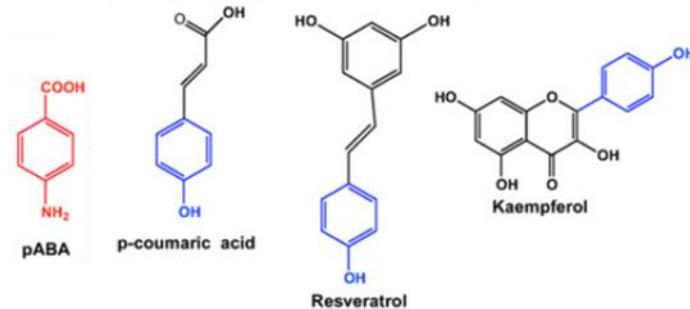


Figure 7. Structure des autres précurseurs naturels du CoQ.

2. Biosynthèse de la chaîne latérale polyisoprényle : la voie du mévalonate

La voie du mévalonate correspond à l'ensemble des réactions permettant la synthèse du farnésyl pyrophosphate (FPP) à partir de l'acétyl-CoA (Figure 8).²⁸ Le FPP est le précurseur commun à la biosynthèse du CoQ, du cholestérol, du dolichol et des protéines isoprénylées. Une étape importante est la conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate par l'HMG-CoA réductase. Le mévalonate subit ensuite différentes réactions de décarboxylation et phosphorylation conduisant au FPP.

L'HMG-CoA réductase est la principale enzyme régulant la voie du mévalonate et constitue la cible des statines qui sont largement utilisées dans le traitement de l'hypercholestérolémie par inhibition de la synthèse du cholestérol.²⁹ L'inhibition de cette enzyme par les statines conduit également à la réduction de la synthèse du CoQ₁₀ par réduction de la synthèse du FPP. Il a ainsi été proposé que la diminution des taux de CoQ₁₀ serait responsable d'une altération des fonctions mitochondriales et, donc, des atteintes musculaires parfois observées lors du traitement par statines (voir page 52).^{30,31}

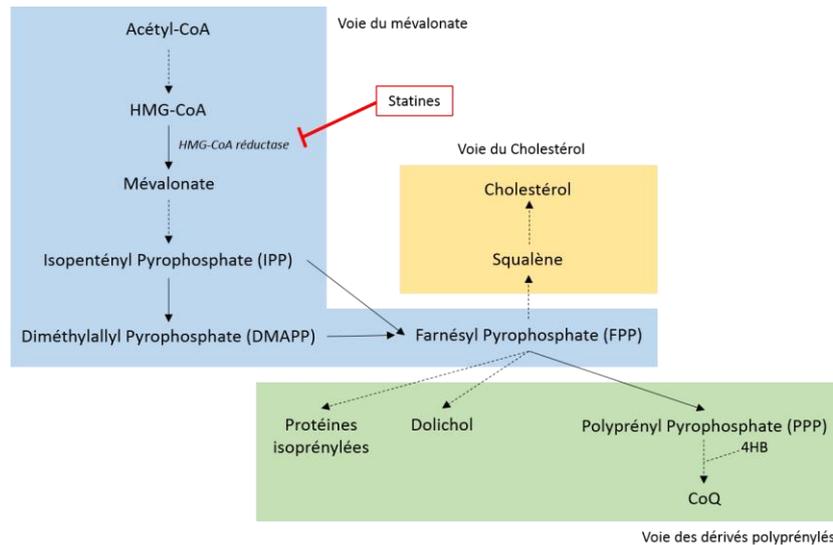


Figure 8. Implication de la voie du mévalonate (en bleu) dans la synthèse du CoQ, du cholestérol, du dolichol et des protéines prénylées (adapté de Tricarico et al.²⁸).

La longue chaîne latérale du CoQ (qui contient de 6 à 10 unités isoprène) est apportée par le polyprényl pyrophosphate (PPP). Celui-ci résulte de la condensation d'une molécule de diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) ou de FPP avec plusieurs molécules d'IPP par une *trans*-prényl transférase (Figure 10, étape ①). Cette enzyme détermine la longueur de la chaîne isoprényle spécifique aux espèces. Chez *S. cerevisiae*, cette réaction est catalysée par l'enzyme Coq1 qui permet la synthèse de l'hexaprényl pyrophosphate ($n=6$).³² Chez l'homme, le décaprényl pyrophosphate ($n=10$) est synthétisé par un hétérotétramère constitué de deux sous-unités protéiques **PDSS1** et **PDSS2** (*decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1 and 2*).³³

3. Biosynthèse du Coenzyme Q

Les enzymes qui interviennent dans la biosynthèse du Coenzyme Q₁₀ sont regroupées au sein d'un complexe protéique appelé complexe Q ou « CoQ-synthome », localisé à la face matricielle de la membrane mitochondriale interne.¹⁹ La nomenclature retenue pour nommer ces enzymes sera « CoqX » chez *S. cerevisiae* et « **COQX** » chez l'homme. L'organisation du complexe Q sera développée dans le paragraphe II.4 (page 34).

a) Prénylation du 4HB par Coq2/COQ2

L'étape suivante de la synthèse du CoQ consiste en l'attachement de la chaîne polyisoprényle sur le 4HB conduisant au polyprényl hydroxybenzoate (PPHB), le

premier précurseur du CoQ. La réaction est catalysée par la polyprényl-4-hydroxybenzoate transférase Coq2/**COQ2** chez l'homme (Figure 10, étape ②).^{34,35} Les enzymes Coq1 (PDSS1 et PDSS2) et Coq2 (COQ2) sont localisées dans la membrane mitochondriale interne et marquent la transition de la synthèse cytosolique des précurseurs vers la synthèse mitochondriale du CoQ. La disponibilité du 4HB endogène détermine la vitesse de cette réaction et constitue une étape limitante dans la synthèse du CoQ. L'enzyme Coq2/COQ2 est peu spécifique et capable de prényler d'autres substrats comme les acides 2,4-dihydroxy et 3,4-dihydroxybenzoïque (2,4-diHB et 3,4-diHB), ainsi que l'acide vanillique (Figure 9). Ces analogues déjà hydroxylés ou méthoxylés du 4HB permettent de passer outre certains déficits enzymatiques de la voie de biosynthèse du CoQ.²⁶ Les résultats des expériences avec des analogues du 4HB ont permis d'établir les caractéristiques structurales nécessaires à la prénylation par Coq2/COQ2 : la présence d'un groupement donneur d'électrons (OH, NH₂ ou OCH₃) en position 4 du cycle aromatique combiné à un fort groupement électroattracteur (COOH) en position 1. En revanche, les acides *p*-chloro et *p*-nitrobenzoïque, substitués par un groupement électroattracteur en position 4, inhibent l'enzyme CoQ2/COQ2.³⁶



Figure 9. Structure des analogues du 4HB pouvant être prénylés par COQ2.¹⁹

La voie de biosynthèse comprend ensuite plusieurs modifications du noyau benzoquinone : 3 réactions de méthylation, 3 réactions d'hydroxylation et 1 réaction de décarboxylation. Chez la levure et les bactéries, les groupements méthyle proviennent de la S-adénosyl méthionine (SAM) et les groupements hydroxyle dérivent de l'O₂ ; il semble qu'il en soit de même chez l'homme.^{37,38} A noter que la numérotation des substituants est différente de la dénomination IUPAC de la molécule (Figure 1) car elle est basée sur la structure du 4HB (Figure 10).

b) Hydroxylations en C5, C6 et C1

La première étape d'hydroxylation du PPHB en position C5 est catalysée par l'enzyme Coq6/**COQ6** (Figure 10, étape ③). Il s'agit d'une monooxygénase flavine-

dépendante qui utilise la FAD comme cofacteur et le NAD(P)H comme coenzyme pour réduire la FAD.^{39,40} Chez la levure, Coq6 utilise le système ferrédoxine Yah1p/ferrédoxine réductase Arh1p comme pourvoyeur d'électrons.⁴¹ Chez l'homme, FDX1/2 et FDXR ont été identifiées comme enzymes orthologues de Yah1p et Arh1p mais leur implication dans la synthèse du CoQ₁₀ n'est pas certaine. Chez la levure, Coq6 est également nécessaire à la désamination du cycle en C4 lorsque le pABA est utilisé comme précurseur. Les analogues du 4HB déjà hydroxylés (3,4-diHB) ou méthoxylés (acide vanillique) en position C5 restaurent la synthèse du CoQ₆ chez *S. cerevisiae* déficiente en Coq6.⁴¹

Les enzymes impliquées dans l'étape de décarboxylation et d'hydroxylation en C1 ne sont pas encore connues chez les eucaryotes.²²

La troisième étape d'hydroxylation en C6 est catalysée par l'enzyme Coq7/**COQ7** (Figure 10, étape ⑦). Le site actif contient deux atomes de Fer pontés par un groupement carboxylate permettant l'activation du dioxygène et l'hydroxylation du substrat.^{42,43}

c) O-méthylation en C5 et C6 par Coq3/COQ3

Les groupements hydroxyle précédemment introduits en C5 et C6 sont ensuite méthylés par l'enzyme Coq3/**COQ3** (Figure 10, étapes ③). Ce sont des méthyltransférases dépendantes de la S-adénosylméthionine.^{44,45}

d) Méthylation en C2 par Coq5/COQ5

La méthylation en C2 est catalysée par l'enzyme Coq5/**COQ5** (Figure 10, étape ⑤).^{46,47} La réaction nécessite la S-adénosylméthionine et le NADH ; ce dernier permettrait de maintenir le groupement hydroxyle en C1 à l'état réduit afin de favoriser la substitution électrophile aromatique en position C2.²²

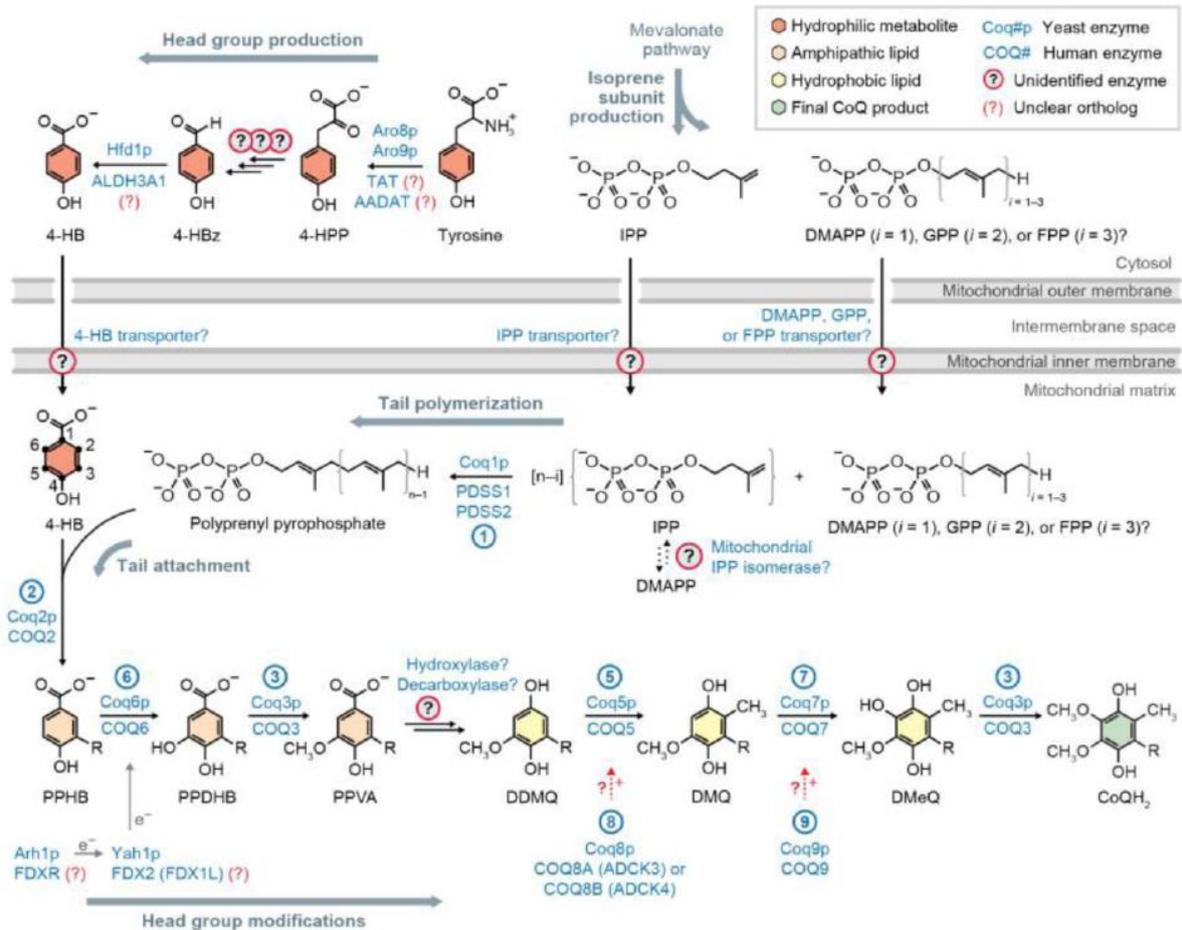


Figure 10. Schéma récapitulatif de la synthèse du CoQ chez *S. cerevisiae* et chez l'homme.²²

e) Protéines non caractérisées

Un certain nombre de protéines nécessaires à la synthèse du CoQ n'ont pas encore de fonction clairement identifiée. Coq4/**COQ4** semble jouer le rôle de protéine chaperonne du complexe Q : elle y occupe une position centrale et serait impliquée dans la stabilisation et l'organisation du complexe.^{48,49} Aucune activité enzymatique n'a été associée à cette protéine ; sa fonction serait d'ancrer la chaîne latérale isoprénoïde du CoQ et de ses intermédiaires afin de faciliter l'action des enzymes qui modifient le noyau benzoquinone.⁵⁰

Chez l'homme, deux protéines orthologues de Coq8 ont été identifiées : **COQ8A** et **COQ8B** (anciennement ADCK3 et ADCK4). Ces protéines partagent une homologie de structure avec celles de la superfamille des protéines kinase-like. Chez la levure, il a été montré que Coq8 est nécessaire à la phosphorylation de Coq3, Coq5 et Coq7 et que l'expression de COQ8A dans des souches déficientes pour le gène *coq8* restaure la phosphorylation et la biosynthèse du CoQ.⁵¹ Par ailleurs, la surexpression de Coq8 chez différents mutants déficients en gènes *coq* restaure les taux de Coq4, Coq7 et

Coq9, et stabilise la formation du complexe Q.⁵² Chez l'homme, on n'observe pas d'activité protéine kinase *in vitro* de COQ8A mais elle conserve une activité ATPase déclenchée par la liaison aux cardiolipines de la membrane mitochondriale. L'hydrolyse de l'ATP serait ensuite couplée au recrutement des précurseurs du CoQ et à la formation du complexe Q.⁵³

Coq9 est une protéine multi-fonctionnelle impliquée dans le bon fonctionnement des hydroxylases Coq6 et Coq7, dans la désamination du carbone C4 lorsque le pABA est utilisé comme précurseur du CoQ et dans l'assemblage du complexe Q.⁵⁴ Chez l'homme, il a été montré que la protéine **COQ9** interagit physiquement avec COQ7 et qu'elle comporte un site de liaison hydrophobe capable de lier plusieurs lipides dont le CoQ. Il a ainsi été proposé que COQ9 pourrait agir comme un transporteur du CoQ entre les différentes enzymes COQ, ou comme un régulateur allostérique du complexe Q selon le lipide lié.⁵⁵

A la différence des mutants déficients pour les gènes *coq1-coq9* dont la synthèse du CoQ est complètement inhibée, la délétion du gène *coq10* chez la levure maintient une biosynthèse du CoQ subnormale. En revanche, malgré un taux de CoQ comparable à une souche sauvage, on observe un déficit de la respiration mitochondriale et une sensibilité accrue à la peroxydation lipidique qui peut être rétablie par apport de Coenzyme Q₆ exogène.⁵⁶ Ceci indique que le CoQ₆ endogène ne fonctionne pas correctement comme transporteur d'électrons et anti-oxydant. Coq10 contient un domaine *START* (*steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer*) : une large poche hydrophobe capable de lier le cholestérol mais aussi le CoQ₆ et ses derniers intermédiaires de synthèse. Il a ainsi été proposé que Coq10 fonctionnerait comme une protéine chaperonne facilitant la biosynthèse *de novo* du CoQ₆ et permettant le transport ou l'adressage du CoQ₆ endogène à son emplacement correct dans la chaîne respiratoire mitochondriale.⁵⁷ Coq10 ne fait pas partie du complexe Q.

L'homme possède 2 isoformes **COQ10A** et **COQ10B** dont l'expression chez *S. cerevisiae* déficiente pour le gène *coq10* restaure la respiration mitochondriale et les capacités anti-oxydantes, mais ne permet pas de retrouver une biosynthèse du CoQ optimale. Il est possible que l'implication de Coq10 dans la biosynthèse du CoQ chez la levure dépende de son interaction avec Coq11, qui n'est pas encore retrouvée chez l'homme.⁵⁸ Coq11 est la protéine la plus récemment découverte nécessaire à la synthèse du CoQ₆. Elle appartient à la superfamille des déshydrogénases à chaîne courte (SDR pour *short-chain dehydrogenase*) et contient un domaine structural

capable de lier des co-facteurs comme la FAD, la FMN et le NAD(P). Cependant, son rôle précis dans la biosynthèse du CoQ₆ n'est pas encore élucidé.⁵⁹ La protéine **NDUFA9**, une sous-unité nécessaire à la stabilisation du complexe I de la chaîne respiratoire chez l'homme, appartient également à la famille des SDR et a été proposée comme homologue de Coq11.⁶⁰

4. Le complexe Q

La plupart des enzymes précédemment décrites qui participent à la biosynthèse du Coenzyme Q₁₀ sont regroupées au sein du complexe Q. L'existence de ce complexe a été mise en évidence chez la levure par des études qui ont suggéré une interdépendance entre certaines protéines Coq : la délétion d'un des gènes *coq3* à *coq9* entraîne la déplétion de plusieurs protéines Coq et l'accumulation du PPHB, le premier précurseur du CoQ.⁶¹ Ce complexe multiprotéique comprend les enzymes Coq3 à Coq9 et Coq11, ainsi que des lipides dont le CoQ lui-même et ses intermédiaires de synthèse. Coq1, Coq2 et Coq10 fonctionnent individuellement.

Des expériences d'électrophorèse en conditions natives et de co-précipitation des protéines ont permis de déterminer une organisation du complexe Q chez *S. cerevisiae* (Figure 11).⁵⁹ Coq1 et Coq2 synthétisent le premier intermédiaire PPHB qui est ensuite transféré à Coq6 pour modification du noyau benzoquinone. Coq8 est nécessaire à la phosphorylation de Coq3, Coq5 et Coq7 et co-précipite avec Coq6. Coq4 occupe une position centrale et lie la chaîne latérale isoprénoïde du CoQ tout en présentant le noyau benzoquinone aux autres enzymes. Coq11 est physiquement associée à Coq5, Coq4 et Coq7.

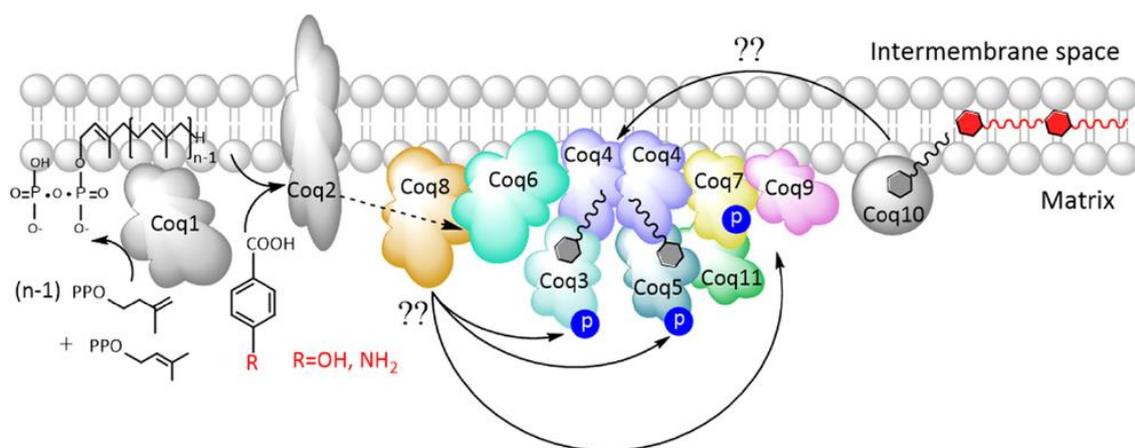


Figure 11. Organisation du complexe Q chez *S. cerevisiae*.⁵⁹

III. Apport exogène, pharmacocinétique

1. Sources alimentaires de CoQ₁₀

Bien que la majeure partie du CoQ₁₀ provienne de sa synthèse endogène, une faible quantité est également apportée par l'alimentation. Une étude danoise a évalué l'apport alimentaire quotidien de CoQ₁₀ à 3-5mg dont 64% proviennent de sources carnées. Les aliments les plus riches en CoQ₁₀ sont en effet la viande rouge, la volaille et les poissons gras ; on en retrouve également dans les œufs, les oléagineux, le brocoli, le chou-fleur et les épinards, les oranges et les fraises.⁶² L'alimentation peut contribuer jusqu'à 25% du pool plasmatique de CoQ₁₀.⁶³

2. Absorption

De par son caractère hydrophobe et son poids moléculaire important, l'absorption intestinale du CoQ₁₀ est faible, de l'ordre de 2 à 3%. Comme pour les vitamines liposolubles, l'absorption intestinale du CoQ₁₀ est favorisée en présence de lipides et suit le métabolisme des lipoprotéines.⁶⁴ Dans l'intestin grêle, les sécrétions pancréatiques et biliaires facilitent l'émulsification et la formation de micelles contenant le CoQ₁₀. Celles-ci sont absorbées par les entérocytes par un mécanisme de diffusion passive. Le CoQ₁₀ est ensuite incorporé dans les chylomicrons qui rejoignent la circulation sanguine *via* le système lymphatique. Sous l'action de la lipoprotéine lipase, les chylomicrons sont transformés en remnants qui sont rapidement pris en charge par le foie où le CoQ₁₀ est redistribué dans les VLDL avant de rejoindre la circulation sanguine et les tissus périphériques (voir schéma récapitulatif Figure 13).⁶⁵ La présence du CoQ₁₀ dans le sang majoritairement sous sa forme réduite ubiquinol implique la réduction de l'ubiquinone alimentaire pendant la phase d'absorption. La réduction semble avoir lieu dans les entérocytes ou dans la lymphe.^{64,66}

La concentration maximale plasmatique est généralement atteinte en 6-8h ; une partie du CoQ₁₀ rentre également dans le cycle entéro-hépatique entraînant un second pic plasmatique à 24h.⁶⁷ La cinétique d'absorption du CoQ₁₀ suit un processus non linéaire, c'est-à-dire que les concentrations plasmatiques sont proportionnellement moindres à mesure que la posologie augmente. Dans une étude à doses multiples de 4 semaines, Hosoe *et al.* ont montré que l'administration quotidienne de 90mg, 150mg ou 300mg de CoQ₁₀ entraîne une augmentation de la concentration plasmatique d'un facteur 2,6 ; 5,7 et 5,9 à 14 jours et d'un facteur 3,9 ; 9,9 et 11,1 à 28 jours. L'état

d'équilibre est ainsi atteint au bout de 2 semaines, puis les concentrations plasmatiques retournent à leur niveau basal 2 semaines après la fin du traitement, ce qui suggère qu'aucune accumulation plasmatique de CoQ₁₀ ne s'est produite pendant les 4 semaines de traitement (Figure 12).⁶⁸

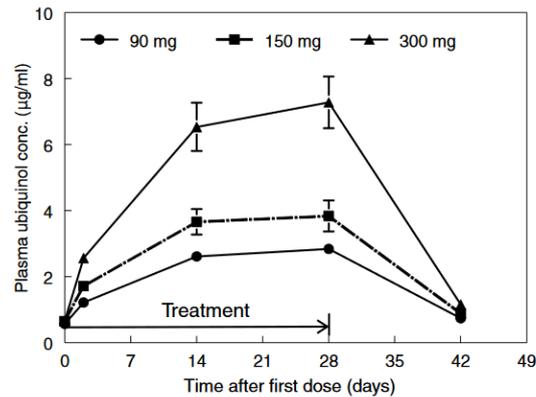


Figure 12. Evolution de la concentration plasmatique en CoQ₁₀ en fonction de la posologie pendant 4 semaines de traitement et 2 semaines après l'arrêt du traitement.⁶⁸

3. Distribution

La distribution tissulaire du CoQ₁₀ à partir d'un apport exogène dépend de deux paramètres : la quantité de CoQ₁₀ apportée et le statut de l'organisme en CoQ₁₀.

Des études de supplémentation en CoQ marqué au Tritium chez le rat révèlent une faible distribution tissulaire : la majorité se retrouve dans la circulation sanguine (à noter que de fortes concentrations se retrouvent dans les globules blancs), dans le foie et dans la rate, à de faibles concentrations dans le cœur et le thymus mais aucune absorption n'est observée dans les muscles, le cerveau et les reins.⁶⁹ Il est nécessaire d'administrer de fortes doses de CoQ₁₀ pour observer une diffusion de la molécule dans ces tissus (cœur > cerveau > muscles) et dans les mitochondries.⁶⁷ Chez l'homme, des concentrations plasmatiques en CoQ₁₀ supérieures aux valeurs normales semblent nécessaires à atteindre pour permettre le passage tissulaire et le passage de la barrière hémato-encéphalique. Par exemple, chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque congestive et supplémentés en CoQ₁₀, le bénéfice thérapeutique de la molécule est observé pour des concentrations plasmatiques supérieures à 2,78µmol/L ou 4,05µmol/L selon les études.⁶⁷

Le CoQ₁₀ étant synthétisé de manière endogène dans tous les tissus, il apparaît donc qu'en conditions physiologiques le pool tissulaire ne dépend pas des apports exogènes en CoQ₁₀ qui contribuent principalement au pool plasmatique. Zierz *et al.* ont évalué l'influence d'une supplémentation en CoQ₁₀ chez deux patients présentant

une myopathie mitochondriale sans déficit musculaire en CoQ₁₀. Après 1 an de traitement, les taux de CoQ₁₀ sériques ont augmenté d'un facteur 1,4 et 2 chez les deux patients. En revanche, la biopsie musculaire réalisée après supplémentation n'a montré aucune augmentation des taux tissulaire de CoQ₁₀ par rapport aux concentrations basales. Ces données montrent que le CoQ₁₀ exogène n'augmente pas les concentrations musculaires lorsqu'il n'existe pas de déficit tissulaire.⁷⁰

En revanche, il existe quelques situations pathologiques pour lesquelles la synthèse endogène de CoQ₁₀ peut ne plus suffire aux besoins de l'organisme. La contribution de l'apport exogène devient alors significative pour maintenir le pool tissulaire. C'est en particulier le cas des déficits primaires en CoQ₁₀ causés par des mutations des gènes impliqués dans la biosynthèse de la molécule et caractérisés par des manifestations cliniques très variables (voir paragraphe V page 49).⁸ Dans certains cas, le déficit tissulaire en CoQ₁₀ peut être partiellement normalisé par une supplémentation orale en ubiquinol, c'est-à-dire qu'un déficit profond stimule la distribution tissulaire du CoQ₁₀ à partir du pool plasmatique.⁷¹

4. Métabolisme et élimination

Chez le rat, la demi-vie plasmatique du CoQ₁₀ varie de 49 à 125h selon les tissus⁷² ; chez l'homme, la demi-vie globale est estimée à 33h.⁷³ L'élimination du CoQ₁₀ se fait principalement (90-95%) par voie biliaire et fécale, sous forme inchangée ou après glucurono-conjugaison par le foie.⁷⁴ Cette voie concerne en particulier l'excès de CoQ₁₀ alimentaire qui est directement éliminé dans les selles et le CoQ₁₀ plasmatique qui transite par le foie. Une faible partie (5-10%) est également éliminée par voie rénale sous forme inchangée et métabolisée. Deux métabolites urinaires principaux ont été identifiés : ils sont constitués d'une chaîne latérale raccourcie à 7 carbones dont l'extrémité est carboxylée, et d'un noyau benzoquinone phosphorylé en position 1 ou 4.⁶⁹ Cette voie concerne plus particulièrement le CoQ₁₀ tissulaire : les métabolites sont phosphorylés pour augmenter leur solubilité aqueuse, transportés dans le sang jusqu'aux reins puis éliminés dans les urines.

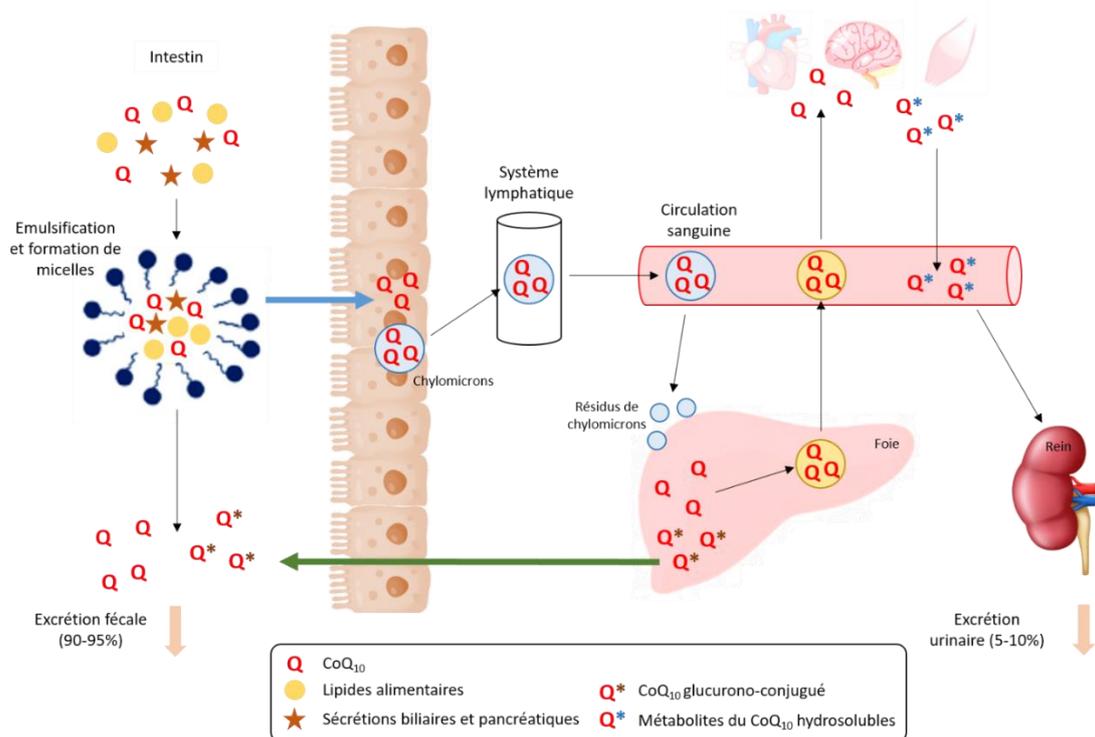


Figure 13. Pharmacocinétique du Coenzyme Q₁₀ (adapté de Martelli et al.).⁶⁵

IV. Fonctions du Coenzyme Q₁₀

1. Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale

Depuis sa découverte dans les années 1960, la fonction du CoQ₁₀ comme transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale reste son rôle le plus étudié même si d'autres fonctions lui ont depuis été attribuées.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires que l'on peut considérer de façon simplifiée comme les centrales énergétiques de l'organisme. Elles contribuent en effet à l'essentiel de la production d'ATP cellulaire qui fournit l'énergie nécessaire à la plupart des réactions chimiques du métabolisme. Dans les mitochondries, l'ATP est produit grâce à la phosphorylation oxydative qui permet, à partir de l'énergie libérée par des réactions d'oxydation, de phosphoryler l'ADP intra-mitochondrial en ATP. La phosphorylation oxydative est réalisée dans la chaîne respiratoire mitochondriale (CRmt) localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne.⁷⁵ Les mitochondries assurent également la bêta-oxydation des acides gras et le cycle de Krebs qui fournissent les substrats nécessaires à la CRmt (Figure 14). Le CoQ₁₀ joue un rôle central dans la CRmt car il assure le transfert des électrons des complexes I et II vers le complexe III.

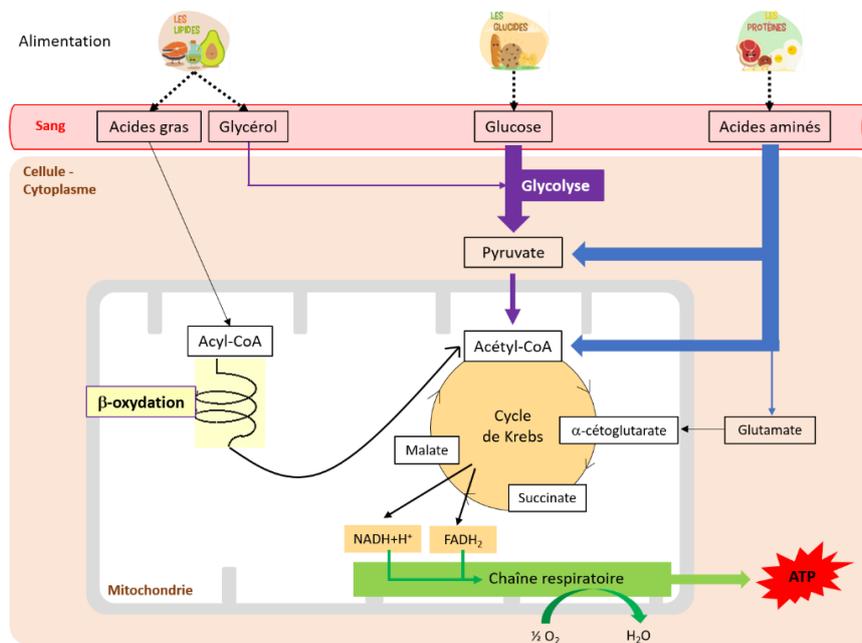


Figure 14. Place de la mitochondrie dans la production énergétique cellulaire à partir de l'alimentation.

La CRmt est constituée de 5 complexes dont les 4 premiers fonctionnent comme des transporteurs d'électrons.

- Le **complexe I**, ou NADH-Coenzyme Q-oxydoréductase, est un très gros complexe, constitué de 46 sous-unités codées à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial. C'est une flavoprotéine (la Flavine Mononucléotide ou FMN) contenant un ensemble de 8 clusters fer-soufre qui catalyse le transfert de 2 électrons du NADH (formé notamment au cours du cycle de Krebs) au CoQ qui est alors réduit en CoQH₂. Le complexe I est la première pompe à protons de la CRmt : pendant que les électrons circulent à travers le complexe, 4 protons sont pompés hors de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, générant un gradient de concentration de protons (Figure 15).⁷⁶

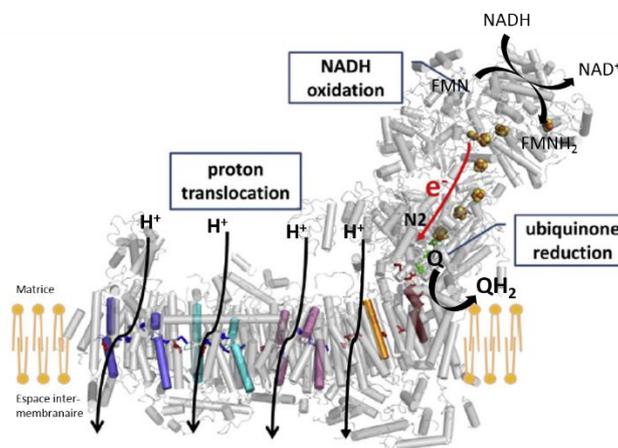


Figure 15. Schéma représentatif du complexe I (adapté de Wirth et al.⁷⁶)

• Le **complexe II**, ou Succinate-Coenzyme Q-oxydoréductase, est composé de 4 sous-unités (SDHA, B, C et D) toutes codées par le génome nucléaire. Cette enzyme appartient à la fois à la CRmt et au cycle de Krebs, dans lesquels elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate avec réduction concomitante du FAD en FADH₂. Deux électrons sont alors transférés au CoQ (réduit en CoQH₂) par l'intermédiaire de 3 centres fer-soufre mais la réaction ne contribue pas au gradient de protons (Figure 16).⁷⁷

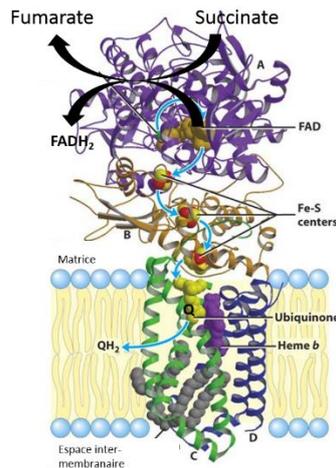


Figure 16. Schéma représentatif du complexe II (adapté de Nelson et al.⁷⁹)

• Le **complexe III**, ou Coenzyme Q-cytochrome *c*-oxydoréductase, est un dimère de 2 complexes constitués chacun de 11 sous-unités, d'un centre fer-soufre, d'un cytochrome *c*₁ et de 2 cytochromes *b* (*b*_L et *b*_H). Le trajet des électrons dans le complexe III suit un trajet circulaire, appelé cycle Q, permettant l'oxydation du CoQH₂ provenant des complexes I et II, et la réduction de 2 cytochromes *c*. Dans un premier cycle, les 2 électrons cédés par le CoQH₂ pour redonner le CoQ sont distribués de façon divergente : l'un permet la réduction du cytochrome *c* via le centre fer-soufre et le cytochrome *c*₁ ; l'autre réduit une molécule de CoQ en forme semi-ubiquinone CoQ• par l'intermédiaire des 2 cytochromes *b*. L'oxydation du CoQH₂ génère 2 protons vers l'espace intermembranaire. Un second cycle est nécessaire, à partir d'une autre molécule de CoQH₂ pour compléter la réduction du CoQ• en CoQH₂ et réduire une seconde molécule de cytochrome *c*. Les deux protons nécessaires à la réduction du CoQ• sont pris dans la matrice mitochondriale. Le CoQ produit au cours de ce second cycle retourne vers les complexes I et II (Figure 17). L'oxydation d'une molécule de CoQH₂ permet ainsi de réduire 2 molécules de cytochromes *c*.⁷⁸

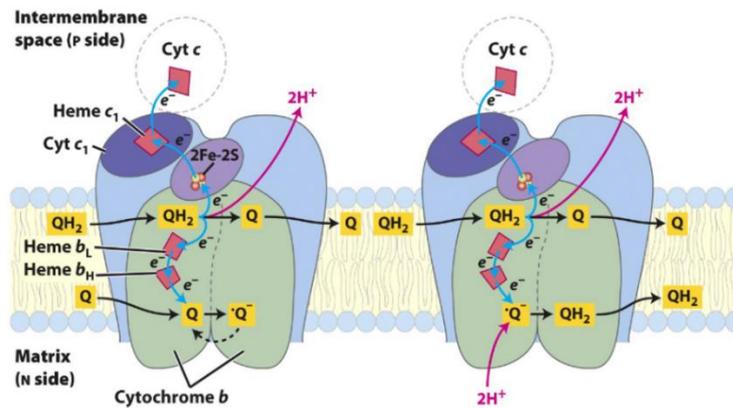


Figure 17. Représentation du cycle Q dans le complexe III.⁷⁹

- Le **complexe IV**, ou Cytochrome c oxydase (COX), est constitué de 13 sous-unités, 2 cytochromes a et a₃, et 2 atomes de cuivre (Figure 18). Elle catalyse la dernière étape de la CRmt en transférant les électrons des cytochromes c réduits vers l'accepteur final qu'est le dioxygène O₂. Deux molécules d'eau sont produites pour chaque molécule d'O₂ réduite, tandis que 4 protons sont pompés vers l'espace intermembranaire.⁸⁰

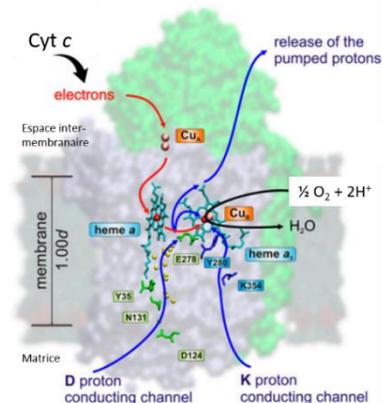


Figure 18. Schéma représentatif du complexe IV (adapté de Belevich et al.⁸¹).

- Le **complexe V**, ou F₁F₀-ATP synthase, utilise l'énergie du gradient de protons généré par les complexes I, III et IV pour catalyser la synthèse d'ATP à partir d'ADP et du phosphate inorganique. L'ATP synthase est constituée de deux domaines protéiques : un domaine membranaire F₀ (pour « Fraction Oligomycine », un inhibiteur sélectif de l'ATP synthase) qui assure le retour des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, et un domaine matriciel F₁ qui porte les sous-unités catalytiques de l'enzyme.⁸² L'ATP synthase peut être considérée comme un complexe de deux « moteurs » partageant un « rotor » commun et stabilisés par un « stator » périphérique. Le flux de protons à travers F₀ entraîne sa rotation, ce qui provoque des

changements conformationnels du domaine F₁ qui passe successivement par des états « lâche », « serré » et « ouvert » permettant la liaison des substrats (ADP et phosphate inorganique) puis la synthèse et la libération de l'ATP (Figure 19).⁸³

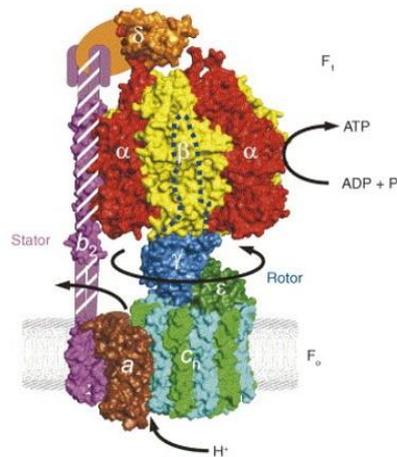


Figure 19. Schéma représentatif du complexe V.⁸³

L'organisation globale de la CRmt et la place du CoQ₁₀ dans la CRmt sont indiquées en Figure 20.⁸⁴ Les schémas illustratifs de la CRmt représentent généralement les complexes indépendamment les uns des autres. Il a cependant été montré que les complexes I, III et IV étaient organisés en structures supramoléculaires (supercomplexes SC) appelés respirasomes dont la composition et l'abondance varient selon les tissus en fonction de leurs besoins métaboliques. Chez les mammifères, le supercomplexe le plus abondant est constitué d'un complexe I lié à un dimère du complexe III et à un complexe IV (SC I+III₂+IV₁). Il existe également des supercomplexes SC I+III₂+IV₂₋₄, SC I+III₂ et SC III₂+IV₁₋₂.⁸⁵ Plusieurs avantages ont été attribués à la formation de ces respirasomes : l'optimisation du flux d'électrons à travers la CRmt, la stabilisation des différents complexes (en particulier le complexe I) et la protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species* – voir également le paragraphe suivant).⁸⁶

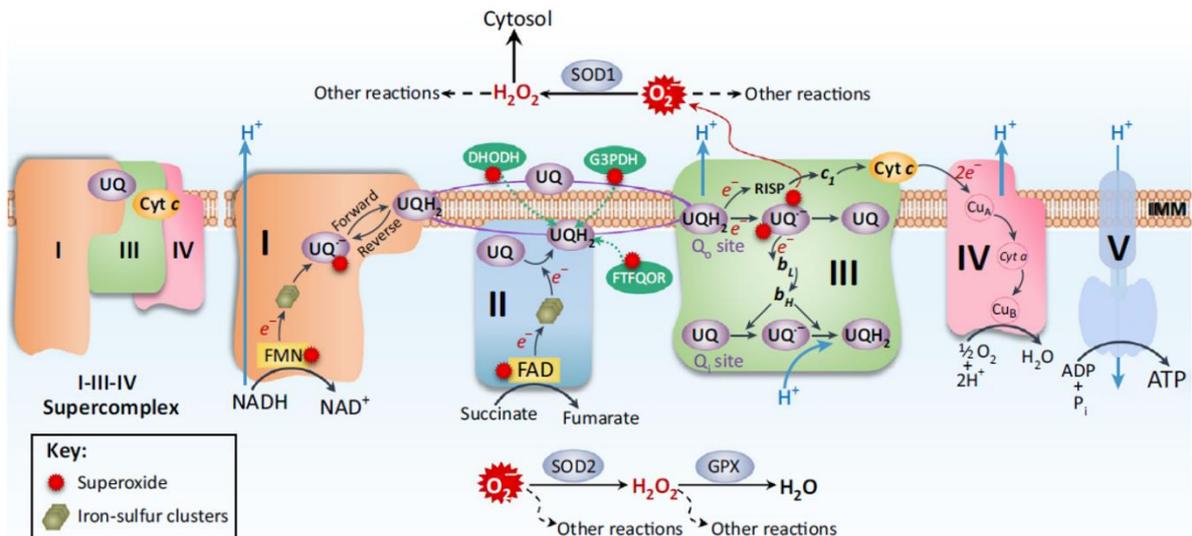


Figure 20. Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de ses différents complexes.⁸⁴

Au sein de la CRmt, le CoQ₁₀ reçoit également les électrons provenant d'autres déshydrogénases, ce qui implique le CoQ₁₀ dans de nombreuses voies métaboliques (Figure 21).⁸⁷ Les conséquences physiologiques d'un déficit en CoQ₁₀ ne se limitent donc pas à un simple déficit énergétique. Il reçoit ainsi 2 électrons de la Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G₃PDH) mitochondriale, navette qui relie le métabolisme des glucides et des lipides à la CRmt et qui permet de faire rentrer les électrons du NADH,H⁺ cytosolique à l'intérieur de la mitochondrie. Le CoQ₁₀ reçoit également des électrons de l'ETF-Ubiquinone oxydoréductase (ETF₂UQOR) qui assure l'oxydation des flavoprotéines de transfert des électrons impliquées dans le métabolisme des acides gras.⁸⁴ Le CoQ₁₀ participe également au métabolisme des acides aminés *via* la choline déshydrogénase (CHDH) et la proline déshydrogénase (PRODH), et assure la détoxification du sulfure d'hydrogène grâce à la sulfide-quinone oxydoréductase (SQOR). Enfin, en tant qu'accepteur d'électrons de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), le CoQ₁₀ participe à la biosynthèse des pyrimidines (voir paragraphe IV.3. page 46).

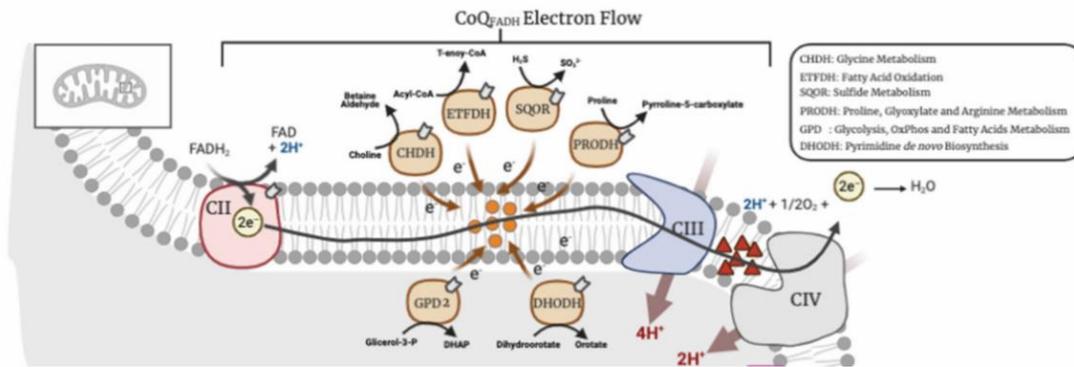


Figure 21. Les différentes voies métaboliques utilisant le CoQ₁₀ comme accepteur d'électrons (CHDH : Choline désydrégénase ; ETFDH : electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxydorégénase ; SQOR : Sulfide-quinone oxydorégénase ; PRODH : Proline désydrégénase ; GPD2 : Glycérol-3-phosphate désydrégénase ; DHODH : dihydroorotate désydrégénase).⁸⁷

2. Antioxydant endogène

La consommation d'oxygène par la mitochondrie pour produire de l'ATP s'accompagne de la production de ROS. On estime que 1 à 2% de l'oxygène consommés par la mitochondrie sont convertis en ROS au niveau de la chaîne de transport des électrons, principalement au niveau des complexes I et III.⁸⁸ La « fuite des électrons », c'est-à-dire le transfert prématuré d'un seul électron généré par les complexes I, II ou III vers une molécule d'oxygène, conduit en effet à la formation d'ions superoxyde O₂^{•-} et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ces radicaux libres instables sont toxiques pour les lipides, les protéines et l'ADN générant ce qu'on appelle le stress oxydant.⁸⁴

La peroxydation lipidique est le processus le plus étudié. Dans la première étape, appelée phase d'initiation, un radical hydrogène est arraché au lipide LH pour donner un radical alkyle LH[•] (Figure 22). L'attaque de ce radical par une molécule d'O₂ conduit à la formation d'un radical peroxyde LOO[•], lequel réagit à son tour avec un autre lipide LH pour donner un nouveau radical LH[•] et ainsi de suite, constituant la phase de propagation de la peroxydation lipidique.⁸⁹ Pour lutter contre le stress oxydant, le corps humain possède un certain nombre de composés antioxydants qui vont pouvoir « quencher » ces radicaux dans la phase de terminaison. Il s'agit d'enzymes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...), ou d'agents non enzymatiques comme les vitamines C et E et l'ubiquinol. Ce dernier est le seul antioxydant endogène synthétisé par les cellules de l'organisme.

Différentes études menées *in vitro* sur des émulsions d'acides gras ou des fractions mitochondriales ont montré que l'ubiquinol inhibe efficacement la

peroxydation lipidique des phospholipides membranaires et des lipoprotéines plasmatiques.^{90,91,92} L'efficacité du CoQH₂ comme antioxydant provient du fait qu'il interfère sur les 2 étapes de la peroxydation, contrairement à la vitamine E, par exemple, qui inhibe seulement la phase de propagation. La principale action du CoQH₂ est de prévenir la formation du radical lipidique L• lors de l'étape d'initiation ou de l'éliminer directement pour empêcher la formation du radical peroxyde LOO•. Sa seconde action probable est de neutraliser LOO• et de régénérer la vitamine E à partir du radical tocophéryle pour empêcher le processus de propagation (Figure 22).⁹³ Dans la circulation sanguine, où il circule majoritairement associé aux lipoprotéines, le CoQ₁₀ joue ainsi un rôle important dans la prévention du risque athérogène en empêchant l'oxydation des LDL.⁹⁴

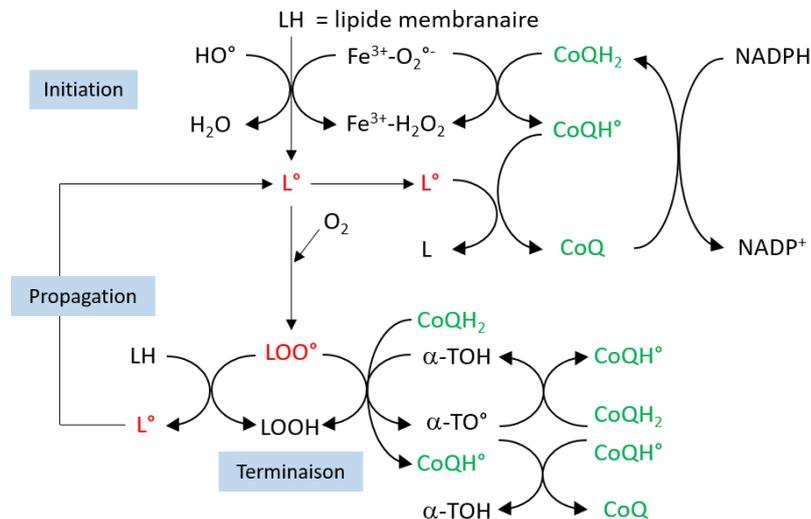


Figure 22. Sites d'action du CoQ sur la peroxydation lipidique. LH : acide gras polyinsaturé ; HO• : radical hydroxyle ; Fe³⁺-O₂[•] : radical perferryl, CoQH• : semiubiquinone ; L• : radical lipidique alkyle ; LOO• : radical lipidique peroxyde ; LOOH : hydroperoxyde lipidique ; α-TOH : vitamine E ; α-TO• : radical tocophéryle (adapté de Bentinger et al.).⁹³

Concernant l'oxydation des protéines, plusieurs mécanismes ont été décrits : l'oxydation directe, la glycoxydation et la carbonylation.⁹⁵ L'oxydation directe des chaînes latérales des acides aminés par les ROS génère des dérivés carbonylés qui peuvent engendrer leur fragmentation ainsi que la formation de liaisons croisées inter- ou intra-chaînes. Les dérivés carbonylés peuvent également être produits par oxydation des sucres ou lors de la peroxydation lipidique qui conduit à la formation de composés comme le dialdéhyde malonique (MDA) ou le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (produits de fragmentation des hydroperoxydes lipides). Ces composés vont alors se fixer de manière irréversible sur les chaînes latérales des acides aminés, générant des

produits de lipoxydation avancée.⁹⁶ De par son action directe sur les ROS et sur la propagation des radicaux lipidiques, l'ubiquinol prévient également l'oxydation des protéines liée à la peroxydation lipidique.⁹⁷

Enfin, les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent être mesurés par la formation de 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) ou de cassures simple ou double-brin. Il a été montré que l'ubiquinol était efficace sur ces deux mécanismes *in vitro* dans des mitochondries de foie de rat, mais aussi *in vivo* sur lymphocytes humains après supplémentation en CoQ₁₀.^{98,99}

3. Autres fonctions proposées du CoQ₁₀

Au-delà de ses deux rôles principaux comme transporteur d'électrons et antioxydant, d'autres fonctions importantes du CoQ₁₀ ont été décrites (Figure 23).

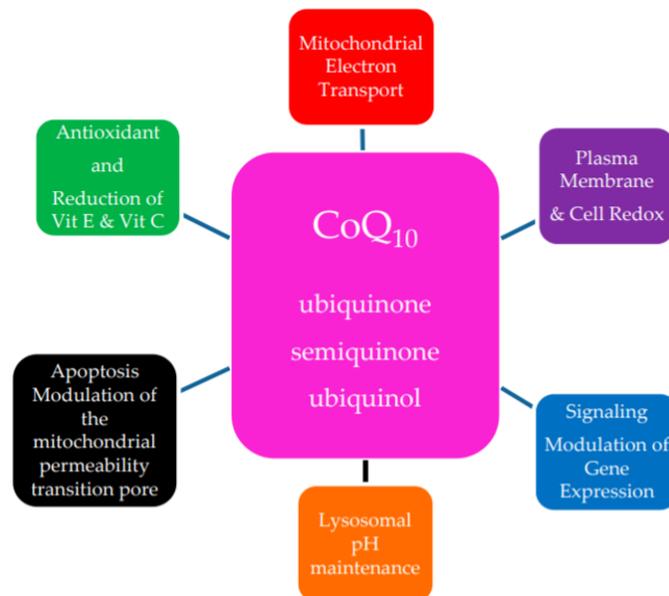


Figure 23. Rôles du CoQ₁₀ dans les cellules.¹⁰⁰

a) Métabolisme des pyrimidines

La dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) est une enzyme de la voie de biosynthèse *de novo* des bases pyrimidiques (cytosine, uracile, thymine) qui catalyse la conversion du dihydroorotate en orotate. C'est la seule enzyme mitochondriale intervenant dans la synthèse des acides nucléiques, localisée dans la membrane interne. Comme le complexe I, c'est une flavoprotéine qui transfère les électrons du dihydroorotate au CoQ₁₀ *via* la FMN.¹⁰¹ Ceci implique que la synthèse des bases pyrimidiques est directement liée à la CRmt (Figure 24). Ainsi, tout dysfonctionnement

de la CRmt, tel que l'hypoxie, les déficits des complexes ou les déficits en CoQ₁₀, est susceptible de perturber la synthèse des nucléotides pyrimidiques et, par conséquent, de l'ADN et de l'ARN. Au-delà de leur fonction essentielle dans les acides nucléiques, l'UTP est également nécessaire au métabolisme des sucres, et le CTP au métabolisme des lipides.¹⁰²

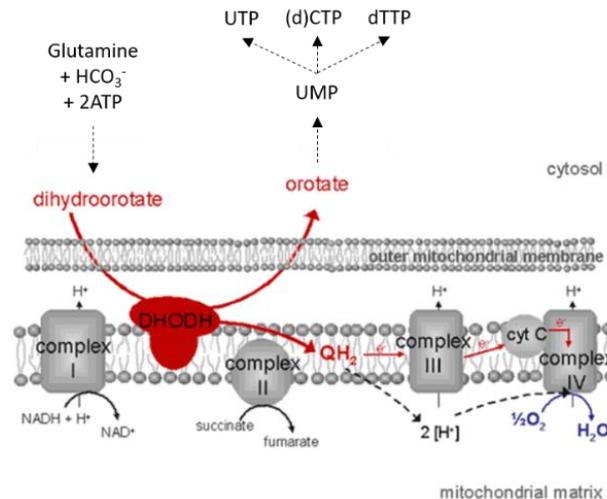


Figure 24. Implication du CoQ₁₀ et de la CRmt dans le fonctionnement de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH).¹⁰³

b) Le système redox des membranes plasmiques (PMRS)

Le PMRS (pour *Plasma membrane redox system*) est un système de transport d'électrons extra-mitochondrial présent dans toutes les cellules au sein duquel le CoQ₁₀ assure le transfert d'électrons depuis des équivalents réduits cytosoliques vers des accepteurs extracellulaires. La structure du PMRS est indiquée en Figure 25 : du côté cytosolique, le CoQ₁₀ est réduit par la cytochrome *b5* réductase ou par la NAD(P)H:quinone oxydoréductase NQO1, puis l'ubiquinol transfère les électrons vers la NADH oxydase (NOX) extracellulaire. Plusieurs accepteurs d'électrons ont été proposés comme les radicaux ascorbyle ou tocophéryle.¹⁰⁴ Le PMRS joue ainsi un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant en assurant la régénération des principaux antioxydants que sont l'ubiquinol, la vitamine C et la vitamine E.¹⁰⁵ Il contribue à la régulation de l'homéostasie redox cellulaire par le maintien du ratio NAD⁺/NADH cytosolique. Le PMRS semble également intervenir dans la croissance et la différenciation cellulaire, et dans l'activité des canaux ioniques.¹⁰⁶ Enfin, au niveau de la membrane lysosomale, ce système serait impliqué dans le transfert intraluminal de protons afin de maintenir le pH acide nécessaire à l'activité des lysosomes.¹⁰⁷

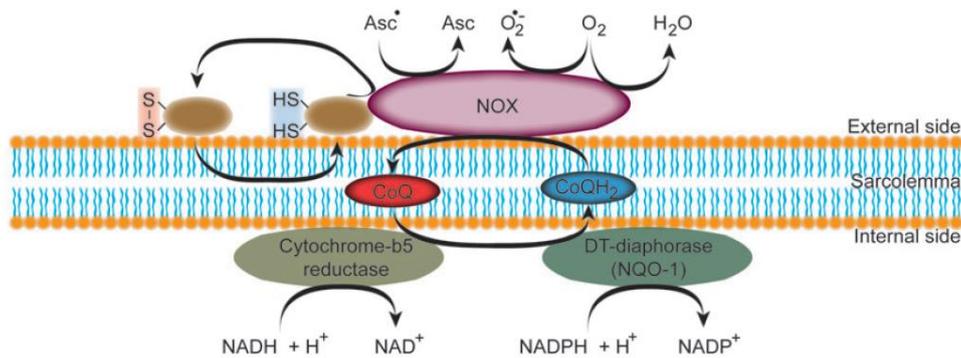


Figure 25. Schéma représentatif du système redox de la membrane plasmique. NOX : NADH oxydase, NQO-1 : NAD(P)H:quinone oxydoréductase, Asc : acide ascorbique, Asc° : radical ascorbyle.¹⁰⁴

c) Régulation des pores de transition de perméabilité mitochondriale

Les pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) sont de larges complexes protéiques de la membrane mitochondriale à la fois interne et externe, dont l'ouverture est un élément clé du déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. En conditions physiologiques, la membrane interne des mitochondries est très peu perméable afin de maintenir le gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP. Sous l'effet de certains stimuli pathologiques (afflux de calcium intracellulaire, augmentation du stress oxydant, déplétion nucléotidique), l'ouverture des mPTP conduit à la fuite de molécules hors de la matrice, entraînant un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial, une hydrolyse de l'ATP, un gonflement osmotique des mitochondries et la rupture de leur membrane externe. Il en résulte une libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques, en particulier le cytochrome c, qui va provoquer l'apoptose cellulaire par l'activation de la voie des caspases.¹⁰⁸ En particulier, l'ouverture pathologique des mPTP semble jouer un rôle important dans les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique et dans l'insuffisance cardiaque.¹⁰⁹

Fontaine *et al.* ont montré que le CoQ₁₀ et d'autres analogues structuraux de l'ubiquinone sont capables de moduler l'ouverture des mPTP par inhibition ou par activation. Ils ont également identifié un groupe d'analogues sans activité intrinsèque mais capable de contrer l'effet des inhibiteurs ou des activateurs.^{110,111} Les relations structure-activité révèlent que des modifications minimales de la chaîne latérale isoprényle peuvent faire basculer un inhibiteur vers un activateur et que les groupements méthoxy du noyau benzoquinone ne sont pas nécessaires à l'activité. Ces résultats suggèrent l'existence d'un site de liaison commun aux quinones impliqué dans la régulation des mPTP.¹¹²

d) Amélioration de la fonction endothéliale

L'endothélium vasculaire joue un rôle clé dans le contrôle de la vasomotricité par la production de substances vasoactives, en particulier le monoxyde d'azote (NO), dont l'effet vasodilatateur prévient la survenue de maladies cardiovasculaires. Des études cliniques de supplémentation en CoQ₁₀ chez des patients atteints de diabète, de dyslipidémie ou de coronaropathie ont montré un effet bénéfique de l'ubiquinone sur la fonction endothéliale.^{113,114} Le CoQ₁₀ exercerait son action par stimulation de la libération endothéliale de NO.⁸⁸

e) Régulation de l'expression génique

Quelques études suggèrent que le CoQ₁₀ pourrait également exercer ses différentes actions en régulant l'expression de certains gènes. Groneberg *et al.* ont observé l'augmentation de l'expression de 690 gènes d'un facteur 2 ou plus dans des cellules CaCo-2 (cellules d'adénocarcinome colorectal humain) après 24h d'exposition au CoQ₁₀. Les gènes identifiés ont pu être classés en 8 groupes fonctionnels : les gènes impliqués dans la signalisation cellulaire (n=79), le métabolisme (n=58), le transport (n=47), la transcription (n=32), la phosphorylation (n=19), le développement embryonnaire (n=13), les protéines de liaison (n=9) et les gènes dont des mutations sont impliquées dans certaines pathologies (n=24) ; parmi les autres gènes, 111 codent pour des protéines aux fonctions diverses et 298 pour des protéines aux fonctions inconnues.¹¹⁵ Des études complémentaires *in silico* ont suggéré que plusieurs protéines de l'inflammation (IL5, thrombine, vitronectine, CRP) étaient régulées par le CoQ₁₀ via le facteur de transcription NFκB1. Les propriétés anti-inflammatoires de l'ubiquinone sur la réponse du TNFα ont ensuite été confirmées *in vitro* sur modèle cellulaire.¹¹⁶ Ceci pourrait en partie expliquer les effets bénéfiques d'une supplémentation en CoQ₁₀ dans les maladies cardiovasculaires.¹¹⁷

V. Les déficits en CoQ₁₀

Les déficits en CoQ₁₀ se définissent par un déficit tissulaire en ubiquinone et font partie des maladies mitochondriales au sens large, caractérisées par un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative. On distingue les déficits primaires résultant de mutations dans les gènes nécessaires à la biosynthèse du CoQ₁₀, et les déficits secondaires qui ne touchent pas directement la synthèse de la molécule.⁸

1. Les déficits primaires

a) Clinique

Les déficits primaires en CoQ₁₀ sont des pathologies rares, principalement causées par des mutations autosomiques récessives. Leur prévalence est inférieure à 1/100 000 ; environ 200 patients issus de 130 familles ont été rapportés dans la littérature. A ce jour, des variants pathogènes ont été identifiés dans dix gènes impliqués dans la biosynthèse du CoQ₁₀ : **PDSS1**, **PDSS2**, **COQ2**, **COQ4**, **COQ5**, **COQ6**, **COQ7**, **COQ8A**, **COQ8B** et **COQ9**.¹¹⁸ La symptomatologie des déficits en CoQ₁₀ est très variable, avec une atteinte généralement multisystémique, incluant les systèmes nerveux central et périphérique, le cœur, les reins, les muscles et le système sensoriel (vue et audition). Les principales manifestations cliniques et les gènes impliqués sont représentés dans la Figure 26. L'âge de révélation de la maladie est également très variable, avec un début néonatal dans les formes sévères, ou plus tardive dans l'enfance voire même à l'âge adulte.⁸

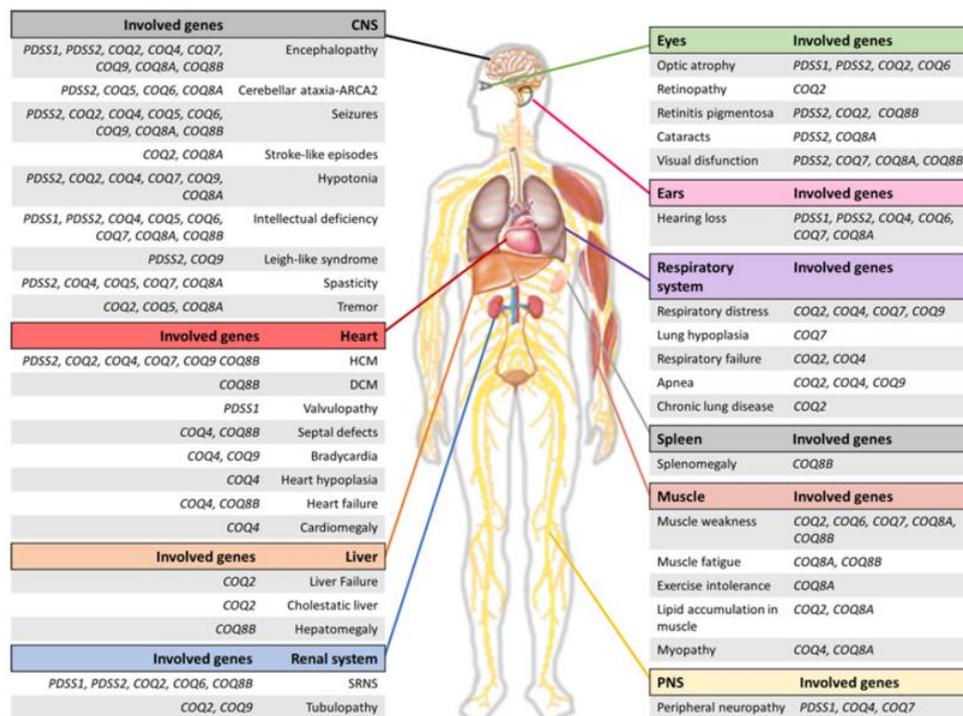


Figure 26. Manifestations cliniques et gènes impliqués dans les déficits primaires en CoQ₁₀.⁸

Le système nerveux central (SNC) est l'organe le plus touché dans les déficits primaires en CoQ₁₀, entraînant des encéphalopathies, des troubles du tonus (hypotonie, dystonie, spasticité), des ataxies cérébelleuses avec ou sans épilepsie et un retard mental plus ou moins important. Ces symptômes se retrouvent généralement quel que soit le gène impliqué mais semblent moins prononcés pour les variants de

COQ6 et *COQ8B*. Inversement, les variations de *COQ4* et *COQ8A* sont associées à des atteintes plus sévères du SNC. Les mutations de *COQ4* provoquent une encéphalomyopathie mitochondriale néonatale avec convulsions, hypotonie et hypoplasie cérébelleuse, souvent fatale dès les premières semaines de vie.¹¹⁹ Les patients avec des mutations de *COQ8A* développent une ataxie et une atrophie cérébelleuse progressive avant l'âge de 10 ans, associées à un retard de développement, des crises épileptiques et des troubles du mouvement (tremblements, dystonie, dysarthrie, mouvements oculaires anormaux...)¹²⁰

Parmi les manifestations rénales liées aux déficits primaires en CoQ₁₀, le syndrome néphrotique résistant aux stéroïdes est fréquent, en particulier chez les patients ayant des variants des gènes *COQ2*, *COQ6* et *COQ8B*. Les symptômes débutent par une protéinurie et évoluent rapidement vers une insuffisance rénale terminale secondaire à une hyalinose segmentaire et focale des glomérules rénaux.¹²¹ Les mutations de *COQ2* et *COQ6* entraînent un syndrome néphrotique précoce de l'enfance pouvant être isolé ou associé à une encéphalopathie (*COQ2*) ou une perte auditive neurosensorielle (*COQ6*).^{122,123} Les mutations de *COQ8B* sont associées à un syndrome néphrotique à début généralement plus tardif, dans l'adolescence.¹²⁴

Les troubles du système nerveux périphérique et neurosensoriel se manifestent par des neuropathies périphériques et des troubles de la vue (atrophie optique, rétinopathies, cataracte, rétinites pigmentaires) et de l'ouïe (perte auditive neurosensorielle à début précoce).⁸ Bien que les manifestations musculaires se retrouvent surtout dans les déficits secondaires en CoQ₁₀, certains symptômes ont été décrits dans les déficits primaires : myopathie, faiblesse et fatigue musculaire, intolérance à l'effort.¹¹⁸ Enfin, des atteintes cardiaques peuvent également être rapportées dans certains cas, à titre de cardiomyopathie hypertrophique, valvulopathies, insuffisance cardiaque et bradycardie.¹²⁵

b) Physiopathologie

La physiopathologie des déficits primaires en CoQ₁₀ est complexe et non complètement élucidée. Le déficit énergétique par défaut de production de l'ATP par la chaîne respiratoire, et l'augmentation de la production des ROS jouent un rôle de premier plan dans les différentes atteintes cellulaires. Cependant, la très grande variabilité phénotypique observée suggère que d'autres mécanismes sont impliqués.

Dans des études sur cultures cellulaires, Quinzii *et al.* ont montré que l'importance du déficit en CoQ₁₀ était corrélé au déficit énergétique mais pas au stress oxydant.^{126,127} Les fibroblastes avec un déficit sévère en CoQ₁₀ (<20% de la normale) présentent un déficit énergétique important par diminution de la production d'ATP, sans augmentation du stress oxydant et sans mort cellulaire. En revanche, un déficit modéré en CoQ₁₀ (30-40% de la normale) entraîne un déficit énergétique modéré mais un taux accru de production de ROS, de peroxydation lipidique et de mort cellulaire. Enfin, un taux de CoQ₁₀ > 60% de la normale n'entraîne ni production de ROS, ni dommage oxydatif. Ces résultats suggèrent qu'un déficit partiel en CoQ₁₀ peut s'avérer plus délétère qu'un déficit sévère pour certaines fonctions cellulaires.

L'implication du CoQ₁₀ dans de nombreuses voies métaboliques, en particulier celles des nucléotides, des sucres et des lipides, rendent les conséquences d'un déficit complexes et difficiles à prédire. Du fait de son rôle comme accepteur d'électrons de la dihydroorotate déshydrogénase, les déficits en CoQ₁₀ interfèrent notamment avec la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques et donc le renouvellement cellulaire. Lopez-Martin *et al.* ont ainsi montré que la supplémentation en uridine de cultures de fibroblastes issus d'un patient porteur de mutations du gène *COQ2* permettait de restaurer leur croissance.¹²⁸ Il a également été montré que la dégradation des mitochondries par autophagie (mitophagie) semblait jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en éliminant les mitochondries déficitaires en CoQ₁₀.¹²⁹

2. Les déficits secondaires

Des déficits secondaires en CoQ₁₀ s'observent également dans des situations qui n'affectent pas directement la biosynthèse de la molécule. Du fait de la grande diversité des fonctions biologiques et des voies métaboliques dans lesquelles le CoQ₁₀ est impliqué, ces déficits sont plus fréquents que les déficits primaires. On les retrouve notamment dans les désordres de la phosphorylation oxydative : déplétion ou délétion de l'ADN mitochondrial,¹³⁰ syndrome MELAS (encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique, épisodes déficitaires neurologiques),¹³¹ syndrome MERRF (épilepsie myoclonique associée à la myopathie des fibres rouges en haillons),¹³² syndrome de Leigh,¹³³ déficits isolés ou combinés des complexes de la CRmt.¹³⁴ Ces déficits peuvent également apparaître dans des maladies métaboliques telles que le déficit multiple en Acyl-CoA déshydrogénase, certaines mucopolysaccharidoses, la

phénylcétonurie, l'acidurie méthylmalonique...¹³⁵ Il est à noter que les prévalences des déficits secondaires en CoQ₁₀ sont similaires qu'ils soient liés ou non à la phosphorylation oxydative.¹³⁴

Comme pour les déficits primaires, les mécanismes sous-jacents aux déficits secondaires en CoQ₁₀ ne sont pas complètement connus mais plusieurs explications ont été avancées. Dans les atteintes de la CRmt, ils résultent probablement d'une augmentation de la dégradation oxydative du CoQ₁₀, conséquence d'une élévation du stress oxydant dans la mitochondrie, ou alors d'une altération globale du fonctionnement de la mitochondrie. Lorsqu'un dysfonctionnement de la CRmt n'est pas en cause, le déficit semble résulter d'une interférence avec les voies de biosynthèse, ou d'une réduction de la stabilité du complexe biosynthétique du CoQ₁₀.¹³⁶

Au-delà des déficits secondaires liés à des désordres de la phosphorylation oxydative ou à des maladies métaboliques, des déficits en CoQ₁₀ ont été décrits dans le syndrome d'ataxie-apraxie oculo-motrice,¹³⁷ et dans le syndrome cardio-facio-cutané.¹³⁸ Ils s'observent également dans un certain nombre de situations pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires (le déficit en CoQ₁₀ est particulièrement bien documenté dans l'insuffisance cardiaque), le diabète de type II, le syndrome métabolique, les maladies rénales chroniques, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'infertilité masculine...^{135,139,140} Il existe aussi un déficit secondaire en CoQ₁₀ lié au traitement par statines qui inhibent l'HMG-CoA réductase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'ubiquinone et du cholestérol (voir page 28). Ce déficit serait responsable des effets secondaires musculaires parfois observés lors d'un traitement par statines. Cependant, si plusieurs études objectivent une réduction des concentrations plasmatiques en CoQ₁₀, celles-ci ne sont pas le reflet des concentrations musculaires. La supplémentation en CoQ₁₀ rétablit les concentrations sanguines mais n'a pas montré de bénéfice clinique significatif sur la prévention des douleurs musculaires liées aux statines.^{30,31} Enfin, il existe une diminution physiologique des taux de CoQ₁₀ plasmatiques et tissulaires avec l'âge : la biosynthèse de la molécule semble optimale autour de 25 ans, puis la production diminue progressivement de moitié vers 65 ans.¹⁴¹

3. Supplémentation en CoQ₁₀ dans les déficits primaires et secondaires

a) Profil de sécurité et posologie

Toutes les études pré-cliniques et cliniques indiquent que le CoQ₁₀ est une molécule non toxique et très bien tolérée. Les études de toxicité aiguë, subaiguë et chronique chez le rat, la souris et le lapin n'ont pas révélé d'effets toxiques jusqu'à 1200mg/kg/jour (NOAEL : *No Observable Adverse Effect Level*). La dose létale chez le rat a été estimée à plus de 5000mg/kg/jour. Aucun effet reprotoxique ni génotoxique n'ont été mis en évidence.¹⁴² Chez l'homme, de nombreuses études de supplémentation en CoQ₁₀ montrent une bonne tolérance clinique pour des doses de 300, 600 et 1200mg/jour. Deux études d'escalade de doses ont également montré un bon profil de sécurité jusqu'à 3000mg/jour.¹⁴³ Sur la base de la NOAEL, la dose journalière admissible de CoQ₁₀ a été évaluée à 12mg/kg/jour, soit 720mg/jour pour un adulte de 60kg.

La posologie du CoQ₁₀ n'est pas parfaitement définie et dépend de l'indication clinique. Si, dans les pathologies cardiovasculaires, la posologie est généralement comprise entre 100 et 300mg/jour, il est recommandé d'utiliser de fortes doses dans les déficits en CoQ₁₀, de 1200 à 2400mg/jour chez l'adulte et de 10 à 30mg/kg/jour chez l'enfant.¹⁴⁴ Le suivi des concentrations plasmatiques de CoQ₁₀ doit s'envisager au bout de 3 à 4 semaines, lorsque l'état d'équilibre est atteint ; les concentrations atteignent alors entre 5 et 10µg/mL (5,8 et 11,6µmol/L).⁶⁷

b) Efficacité clinique

Les déficits primaires en CoQ₁₀ sont les seules pathologies mitochondriales pour lesquelles une supplémentation en ubiquinol peut s'avérer efficace. L'utilisation du CoQ₁₀ pour cette indication a été approuvée par l'Agence Européenne du Médicament en 2016.¹⁴⁵ Les 2 premières patientes (âgées de 12 et 14 ans) présentant un déficit musculaire en CoQ₁₀ ont été rapportées dans la littérature en 1989 par Ogasahara *et al.* A l'âge de 3 ans, ces deux sœurs ont développé une faiblesse musculaire, une fatigabilité à l'effort et un retard du développement, accompagnés de crises d'épilepsie chez la plus jeune et d'un syndrome cérébelleux chez l'aînée. Les auteurs rapportent une amélioration des symptômes après 3 mois de supplémentation à 50mg de CoQ₁₀ trois fois par jour.¹⁴⁶ Depuis, un certain nombre d'études ont rapporté l'efficacité du traitement par CoQ₁₀ dans les déficits primaires, en particulier sur la symptomatologie musculaire, l'ataxie et la fonction rénale, lorsque le traitement est introduit de manière

précoce et à forte dose.^{147,148,149} Les effets sur l'encéphalopathie sont plus variables et dépendent de la présence de lésions cérébrales irréversibles avant la mise en place du traitement, et du passage de la molécule à travers la barrière hémato-encéphalique.¹⁵⁰

L'efficacité de la supplémentation en CoQ₁₀ dans les déficits secondaires reste controversée. Certaines études ont montré un accroissement de la force musculaire et de la consommation d'oxygène, ainsi qu'une diminution des taux de lactate et de pyruvate chez des patients atteints d'un syndrome de Kearns-Sayre ou d'un syndrome MELAS.^{151,152,153} D'autres études n'ont en revanche mis en évidence aucun bénéfice clinique.^{154,155}

Dans tous les cas, il semble important d'évaluer les pools plasmatique et musculaire de CoQ₁₀ avant de mettre en place un traitement substitutif par ubiquinone, et de suivre les concentrations plasmatiques pour s'assurer de la bonne biodisponibilité de la molécule (voir page 57).

VI. Intérêt du dosage du CoQ₁₀ dans les milieux biologiques

1. Choix du milieu biologique

Comme pour les cytopathies mitochondriales au sens large du terme, les déficits en CoQ₁₀ sont des pathologies rares, caractérisées par une grande variabilité d'expression clinique ainsi qu'une variabilité de l'âge de révélation. Leur diagnostic reste donc complexe et peut parfois être retardé du fait de l'absence de signe pathognomonique ou de marqueurs biologiques spécifiques. Cependant, ces maladies pouvant potentiellement bénéficier d'une supplémentation en CoQ₁₀, l'identification précoce d'un déficit apparaît nécessaire afin d'initier rapidement le traitement. La mise en évidence d'un déficit en CoQ₁₀ repose sur son dosage quantitatif dans les milieux biologiques, principalement le plasma (ou sérum), le muscle squelettique et les fibroblastes, mais aussi les leucocytes, l'urine et le LCR. Les déficits en CoQ₁₀ peuvent être spécifiques d'un tissu ; dans la mesure du possible, il faut étudier le tissu atteint et le choix du prélèvement peut être orienté par la symptomatologie clinique et par sa facilité d'accès, chaque tissu ayant ses avantages et ses inconvénients (Tableau 4).¹⁵⁶ Il peut être important d'évaluer le taux de CoQ₁₀ dans différents milieux, un résultat normal dans un tissu n'excluant pas un déficit dans un autre tissu.

Tissu	Avantages	Inconvénients	Intérêt clinique
Muscle	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluation directe du pool tissulaire - Etudes histologiques - Etudes enzymatiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement invasif - Matériel biologique limité 	Bon rendement diagnostique des déficits en CoQ ₁₀
Fibroblastes	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluation correcte du pool tissulaire - Etudes fonctionnelles (respiration cellulaire, biosynthèse du CoQ₁₀) - Matériel biologique illimité 	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement invasif 	Bon rendement diagnostique des déficits en CoQ ₁₀
Plasma	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement peu invasif 	<ul style="list-style-type: none"> - Influencé par l'alimentation - Non corrélé au pool tissulaire 	Plutôt indiqué pour le suivi thérapeutique des patients
Leucocytes	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement peu invasif - Corrélé au pool tissulaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement pré-analytique complexe - Peu de données dans la littérature 	Reste à évaluer
Urine	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement non invasif 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu de données dans la littérature 	Reste à évaluer

Tableau 4. Avantages et inconvénients des différents milieux biologiques pour le dosage du CoQ₁₀ (adapté de Yubero et al.).¹⁵⁶

a) Muscle

La biopsie musculaire reste le prélèvement de choix pour rechercher un déficit en CoQ₁₀ car les taux mesurés reflètent directement l'état de la synthèse endogène (voir page 22). Les muscles les plus couramment prélevés sont le deltoïde (épaule) et le muscle quadriceps (cuisse) dont le choix peut être orienté en fonction de la localisation des déficits moteurs du patient. Il faut toutefois garder en tête qu'un taux normal de CoQ₁₀ sur un prélèvement musculaire n'exclut pas un déficit dans un autre muscle. En parallèle, d'autres études enzymatiques et histologiques peuvent être menées sur les biopsies pour évaluer le fonctionnement de la mitochondrie.¹⁵⁷ On recherchera en particulier la présence de « *ragged-red fibers* » (RRF), ou fibres rouges déchiquetées, sur la coloration au Trichrome de Gomori, qui correspondent à l'accumulation de mitochondries anormales sous la membrane plasmique. La double réaction histoenzymatique COX-SDH est la plus caractéristique avec la présence de fibres COX négatives mais réactives en SDH.¹⁵⁸

Les déficits en CoQ₁₀ musculaire s'observent couramment dans les pathologies mitochondriales. Ils sont généralement associés à un déficit enzymatique des complexes I+III et II+III dans les déficits primaires, alors que les autres complexes de la CRmt peuvent également être affectés dans les déficits secondaires. Cependant, tous les déficits musculaires en CoQ₁₀ ne s'accompagnent pas forcément d'anomalies

de la CRmt.¹⁵⁹ Le principal inconvénient de la biopsie musculaire réside dans le fait qu'il s'agit d'un prélèvement invasif, réalisé sous anesthésie locale, épuisable en quantité (pas de mise en culture possible) et non renouvelable (non adapté au suivi thérapeutique).

b) Fibroblastes

Les fibroblastes sont également un bon échantillon biologique pour la mise en évidence des déficits en CoQ₁₀ bien que certains patients présentant des déficits musculaires aient des taux normaux de CoQ₁₀ dans les fibroblastes.¹⁶⁰ Les fibroblastes présentent néanmoins de nombreux avantages. La biopsie cutanée qui permet de les obtenir est un geste beaucoup moins invasif que la biopsie musculaire. Les fibroblastes représentent un matériel quasi-illimité, pouvant être congelés dans l'azote liquide puis remis en culture pour d'autres investigations. En particulier, les cultures de fibroblastes peuvent être utilisées pour étudier *in vitro* les voies de biosynthèse du CoQ₁₀ en analysant l'incorporation de substrats radiomarqués dans la molécule.¹⁶¹ Il est également possible d'étudier l'impact du déficit en CoQ₁₀ sur d'autres processus physiologiques tels que la synthèse d'ATP, la production de ROX, la synthèse des pyrimidines ou la mitophagie.^{126, 128}

c) Plasma

Bien que le prélèvement sanguin présente l'avantage d'être peu invasif, il semble cependant mal adapté au diagnostic des déficits en CoQ₁₀. Le taux de CoQ₁₀ plasmatique dépend en effet de la synthèse hépatique, des taux de lipoprotéines et de l'alimentation (voir page 23). Il est relativement indépendant de la biosynthèse endogène du CoQ₁₀ et n'est pas corrélé aux taux tissulaires, ce qui le rend peu contributif pour le diagnostic des déficits primaires qui affectent la biosynthèse de la molécule. Les déficits plasmatiques apparaissent davantage dans les déficits secondaires. Si un taux plasmatique de CoQ₁₀ normal n'exclut en rien un déficit tissulaire, il semble qu'un déficit plasmatique soit en revanche un bon indicateur d'un déficit tissulaire, la contribution du pool sanguin devenant alors nécessaire pour maintenir le pool tissulaire.¹⁵⁶

En dehors de son intérêt discutable dans le diagnostic des déficits primaires, la détermination des taux plasmatiques de CoQ₁₀ joue un rôle important dans le suivi thérapeutique des patients supplémentés. Cela permet en premier lieu de s'assurer

de la bonne absorption intestinale de la molécule qui dépend notamment de la forme galénique utilisée.¹⁶² Elle permet également d'adapter les posologies si besoin et de vérifier la bonne observance du traitement. En revanche, même si la supplémentation peut sembler efficace d'un point de vue biologique (augmentation des concentrations plasmatiques par rapport à la valeur basale), la distribution tissulaire de la molécule dans les tissus atteints ne peut être réellement mesurée et ne peut s'apprécier que par l'amélioration clinique ressentie par le patient, par testing musculaire en cas de myopathie, ou par le dosage direct du CoQ₁₀ dans le muscle.⁷⁰

d) *Autres milieux biologiques*

- **Cellules mononuclées.** Duncan *et al.* ont mis en évidence une bonne corrélation entre les taux de CoQ₁₀ dans les cellules mononuclées (MNC, pour *Mononuclear Cells*) et le muscle squelettique ($r=0,89$, $p<0,02$, $n=13$), mais aucune corrélation entre les concentrations plasmatiques et musculaires, ni entre les concentrations plasmatiques et dans les MNC. Cette observation présente les MNC comme une alternative intéressante et moins invasive à la biopsie musculaire pour identifier un déficit en CoQ₁₀. Cependant, l'utilisation de ce tissu biologique reste limitée par un traitement pré-analytique complexe pour isoler les cellules et les données de la littérature sont peu nombreuses.¹⁶³

- **Urine.** Certains déficits en CoQ₁₀ s'accompagnent d'un syndrome néphrotique, isolé ou en association avec d'autres signes cliniques (voir page 50). Récemment, Zhang *et al.* ont montré que le CoQ₁₀ urinaire chez une patiente présentant une glomérulopathie associée à une variation du gène *COQ8B* était un bon marqueur diagnostic et de suivi de la pathologie après supplémentation en ubiquinone. Ils ont ainsi trouvé que le ratio CoQ₁₀/créatinine urinaire était 5 fois plus élevé chez la patiente que chez des contrôles sains. Après traitement, les taux de CoQ₁₀ se sont progressivement normalisés, parallèlement à une diminution de la protéinurie. Les raisons de l'augmentation du taux de CoQ₁₀ urinaire chez cette patiente restent indéterminées.¹⁶⁴

- **LCR.** Les manifestations neurologiques étant très fréquentes dans les déficits en CoQ₁₀ (voir page 49), le taux de la molécule dans le LCR pourrait avoir un intérêt diagnostic dans ces pathologies. Des variations du gène *COQ2*, associées à une diminution des taux de CoQ₁₀ dans le cervelet de patients atteints d'atrophie multisystématisée (AMS), suggèrent un rôle potentiel du CoQ₁₀ dans la

physiopathologie de la maladie. Des études ont ainsi montré une diminution des concentrations de CoQ₁₀ dans le plasma et le LCR chez ces patients.¹⁶⁵ Le LCR présente deux inconvénients majeurs : c'est un prélèvement invasif et les concentrations de CoQ₁₀ y sont très faibles, de l'ordre du nanomolaire, ce qui nécessite des techniques de dosage sensibles comme la spectrométrie de masse en tandem.¹⁶⁶ A ce jour, aucun exemple n'a été rapporté dans les déficits primaires en CoQ₁₀.

2. Place du dosage du CoQ₁₀ dans le diagnostic des maladies mitochondriales

L'intégration du dosage du CoQ₁₀ dans la démarche diagnostique des désordres de la phosphorylation oxydative peut s'effectuer à deux niveaux différents. Le premier concerne une démarche de génétique classique : c'est le phénotype clinique qui oriente l'étude génétique. Généralement, on suspecte une maladie mitochondriale avant de suspecter plus précisément un déficit en CoQ₁₀. Sur biopsie musculaire, des activités enzymatiques réduites des complexes I+III et II+III évoquent un défaut de transport des électrons des complexes I et II vers le complexe III et orientent vers un déficit en CoQ₁₀. Le dosage du CoQ₁₀ dans différents milieux permet de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, en gardant toutefois en tête qu'un résultat normal n'exclut pas un déficit. Cependant, la mise en évidence d'un déficit biologique en CoQ₁₀ dans un tissu ne permet pas de présumer de l'origine primaire ou secondaire du déficit. Seule la mise en évidence d'un variant pathogène dans l'un des gènes impliqués dans la biosynthèse du CoQ₁₀ permet de conclure à un déficit primaire (Figure 27).

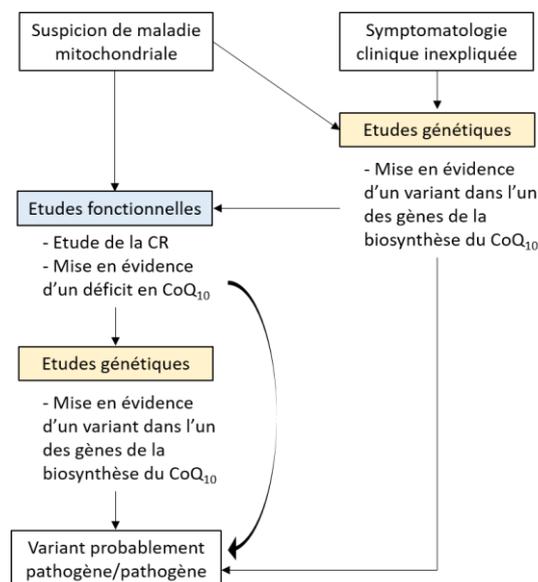


Figure 27. Place du dosage du CoQ₁₀ dans le diagnostic des maladies mitochondriales.

Dans certains cas, les études génétiques peuvent précéder les études fonctionnelles. Le développement de techniques performantes de génétique moléculaire comme le séquençage haut débit (NGS, pour *Next Generation Sequencing*), le séquençage de l'exome (WES, pour *Whole Exome Sequencing*) voire du génome (WGS, pour *Whole Genome Sequencing*) est en train de modifier la démarche diagnostique des maladies mitochondriales. Ces techniques peuvent en effet permettre, à partir d'un simple prélèvement sanguin, de poser directement le diagnostic de cytopathie mitochondriale lorsqu'une variation pathogène est identifiée et d'éviter la biopsie musculaire ou de peau.¹⁵⁸ Ceci n'est cependant vrai que lorsque la variation retrouvée est classée pathogène (classe 5) par l'*American College of Medical Genetics (ACMG)*, c'est-à-dire déjà décrite dans la littérature et dont le caractère pathogène a été démontré par des tests fonctionnels (Tableau 5).¹⁶⁷ En réalité, ce cas de figure reste rare pour les pathologies mitochondriales et plus particulièrement pour les déficits primaires en CoQ₁₀ pour lesquels les variations retrouvées sont parfois limitées à une famille et peu décrites dans la littérature. On identifie alors des variants dits « de signification indéterminée » (VUS, pour *Variant of Unknown Signification*, classe 3) pour lesquels des études fonctionnelles sont nécessaires pour prouver leur caractère pathogène. Dans le cas où un VUS est retrouvé dans l'un des gènes impliqué dans la biosynthèse du CoQ₁₀, chez un patient avec une symptomatologie clinique évocatrice, la mise en évidence d'un déficit en CoQ₁₀ sur muscle, fibroblastes ou plasma, peut permettre de reclasser ce variant en « probablement pathogène » (classe 4) (Figure 27). Nous verrons deux exemples dans la suite de ce travail.

Classe 5	Variant pathogène
Classe 4	Variant probablement pathogène
Classe 3	Variant de signification indéterminée
Classe 2	Variant probablement bénin
Classe 1	Variant bénin (polymorphisme)

Tableau 5. Classification ACMG.¹⁶⁷

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Ce travail de thèse a consisté en la mise au point d'une technique de dosage du Coenzyme Q₁₀ dans le sang et le muscle. Nous avons fait le choix de la chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), méthode sensible, spécifique et permettant de travailler sur des volumes réduits d'échantillons. Les performances de la méthode de dosage développée ont été validées selon les critères usuels définis dans la norme ISO 15189. Pour les deux matrices étudiées, nous avons établi des valeurs de référence propres à notre technique.

Deux applications cliniques ont été étudiées. Dans une première étude, nous avons réalisé une évaluation rétrospective de 68 patients, admis pour un syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST (STEMI) et revascularisés avec succès après angioplastie primaire. L'objectif de cette étude était d'analyser la relation entre le taux de CoQ₁₀ plasmatique à J0 du STEMI et le remodelage ventriculaire gauche à 6 mois de l'infarctus.

Dans une seconde étude, qui est toujours en cours, nous nous intéressons aux taux de CoQ₁₀ musculaires chez des patients atteints de pathologies mitochondriales. Les résultats sont analysés et interprétés en regard des dosages des complexes de la chaîne respiratoire, mais également des données cliniques, anatomopathologiques et moléculaires, lorsqu'elles sont disponibles.

MATERIELS ET METHODES

I. Sélection des sujets

1. Cohorte RESIST pour le dosage plasmatique

La cohorte RESIST, pour Registre des Soins et Interventions pour les syndromes coronariens aigus avec sus-décalage du segment ST (STEMI), comporte l'ensemble des patients pour lesquels nous avons étudié la relation entre la concentration plasmatique en CoQ₁₀ et le remodelage ventriculaire gauche (RVG) après un infarctus du myocarde. Entre le 1^{er} janvier 2017 et le 30 octobre 2018, 68 patients hospitalisés au CHU de Caen pour un STEMI et revascularisés avec succès par angioplastie primaire ont été inclus dans l'étude.

Les critères d'inclusion sont les suivants : âge supérieur à 18 ans ; douleur thoracique associée à un ECG (électrocardiogramme) objectivant une élévation du segment ST ; revascularisation complète par angioplastie avec restauration d'un flux normal dans l'artère coupable en fin de procédure (grade TIMI 3) ; délai de prise en charge inférieur à 72h.

Les critères d'exclusion sont quant à eux : patients pour lesquels le diagnostic retenu final n'est pas un STEMI ; absence de revascularisation complète en phase aigüe (grade TIMI < 3) ; mauvaise échogénicité empêchant la réalisation de l'échocardiographie cardiaque 3D ; patients mineurs, femmes enceintes et allaitantes.

Tous les patients ont bénéficié d'une échocardiographie transthoracique (ETT) 3D lors de l'hospitalisation initiale et 6 mois après le STEMI permettant d'évaluer le remodelage ventriculaire gauche défini par une augmentation de plus de 20 % du volume télédiastolique entre les deux ETT. A l'admission, les patients ont également bénéficié d'un prélèvement sanguin pour un bilan biologique dont une partie a été aliquotée et congelée pour dosage ultérieur du CoQ₁₀. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude. Celle-ci est conforme à la Déclaration d'Helsinki décrivant les principes fondamentaux de la recherche clinique, et a été approuvée par un comité d'éthique local (protocole n°A14-D17-VOL.20).

2. Cohorte pour comparaison plasma/muscle

Afin de comparer les valeurs de CoQ₁₀ plasmatique et musculaire, nous avons constitué une petite cohorte de 12 patients ayant bénéficié simultanément d'une biopsie musculaire et d'un prélèvement sanguin dans le cadre de l'exploration d'une éventuelle maladie mitochondriale. Compte tenu de la rareté des biopsies musculaires, nous avons retenu tous les patients majeurs, indépendamment des résultats biochimiques et génétiques. Ces patients ont signé un formulaire de consentement éclairé.

3. Cohorte pour le dosage musculaire

Il s'agit d'une cohorte à la fois rétrospective et prospective puisque nous y avons inclus des patients pour lesquels un aliquot d'homogénat musculaire congelé est conservé dans notre tissuthèque, ainsi que les nouveaux patients en cours d'exploration biologique pour lesquels nous avons commencé à doser systématiquement le CoQ₁₀. Lorsque les résultats biochimiques et/ou génétiques ne sont pas en faveur d'une maladie mitochondriale, les patients sont inclus dans une sous-cohorte « patients sains » pour la détermination des valeurs normales de référence pour la concentration musculaire en CoQ₁₀.

II. Conditions de prélèvement

Pour la détermination des concentrations plasmatiques en CoQ₁₀, les échantillons sanguins ont été recueillis sur tubes BD Vacutainer® (Becton-Dickinson) avec EDTA comme anticoagulant et centrifugés à 2000g pendant 12 minutes à température ambiante. Les plasmas ont ensuite été aliquotés et conservés à -80°C avant analyse.

Les biopsies musculaires sont principalement pratiquées sur le muscle deltoïde ou le quadriceps en fonction des signes cliniques. Elles sont réalisées sous anesthésie loco-régionale, placées dans un pot stérile et acheminées dans la glace au laboratoire. Le prélèvement doit alors être congelé dans les 30 minutes à -80°C. Un homogénat musculaire est ensuite réalisé selon la procédure décrite dans le paragraphe V.1. page 78.

III. Dosage du CoQ₁₀

Le dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire est effectué par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS), après extraction liquide-liquide. La quantification du CoQ₁₀ est effectuée par dilution isotopique en utilisant le CoQ₁₀ deutéré (CoQ₁₀-d⁹) comme étalon interne. La méthode a été développée et validée pour cette étude à partir de celles décrites par Ruiz-Jiménez *et al.* et Yamashita *et al.*^{168,169} Le processus pré-analytique et analytique des échantillons est succinctement décrit dans la Figure 28. Le détail et l'optimisation de chacune de ces étapes seront présentés ultérieurement dans le manuscrit.

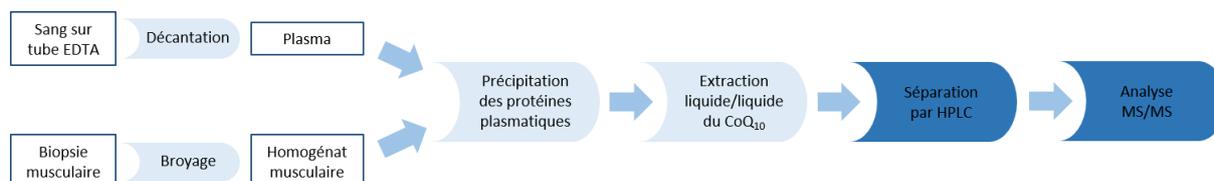


Figure 28. Processus pré-analytique et analytique du dosage du CoQ₁₀. Les étapes pré-analytiques sont encadrées en bleu clair ; les étapes analytiques en bleu foncé.

1. Réactifs et solvants

Produit	Pureté	Fournisseur
Méthanol CAS : 67-56-1	≥99.8%, HiPerSolv CHROMANORM® pour HPLC	VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France)
n-Hexane CAS : 110-54-3	≥97%, HiPerSolv CHROMANORM® pour HPLC	
Ethanol CAS : 64-17-5	≥99.8%, AnalaR NORMAPUR®	
Acide formique CAS : 64-18-6	≥99%, HiPerSolv CHROMANORM® pour LC-MS	
Méthanol CAS : 67-56-1	≥99.98%, grade ULC/MS – CC/SFC	Biosolve Chimie (Dieuze, France)
Eau CAS : 7732-18-5	Grade ULC/MS – CC/SFC	
Coenzyme Q₁₀ CAS : 303-98-0	≥98% (HPLC)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA)
Coenzyme Q₁₀-d⁹	≥98 atom % D, ≥97% (CP)	

Tableau 6. Liste des réactifs et solvants utilisés.

2. Calibrants, étalon interne et contrôles qualités

a) Calibrants

Une solution de calibration à 4µg/mL de CoQ₁₀ est préparée par dilution au 1/250^e dans du méthanol d'une solution mère commerciale à 1mg/mL de CoQ₁₀ dans l'éthanol. Les calibrants sont obtenus par dilution de la solution de calibration dans le méthanol. Une courbe de calibration en 6 points (0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1,0 et 2,0µg/mL) est réalisée en début de mois avec la solution d'étalon interne ou à chaque fois que la solution d'étalon interne doit être refaite.

b) Etalon interne

Afin de minimiser la variabilité des différentes étapes du protocole d'un dosage par spectrométrie de masse telles que l'extraction, le volume injecté, les différences d'efficacité de l'ionisation et de la fragmentation, un étalon interne (EI) est ajouté à l'échantillon en début de procédure. L'EI doit avoir des propriétés physico-chimiques proches du composé à analyser mais ne doit pas se trouver naturellement dans l'échantillon.¹⁷⁰ Généralement, l'EI correspond à l'analyte dont un ou plusieurs atomes ont été substitués par un isotope stable. Pour le dosage du CoQ₁₀, nous avons choisi le CoQ₁₀ deutéré dans lequel les atomes d'hydrogène du noyau benzoquinone sont substitués par des atomes de deutérium (¹H → ²H). La quantification du composé d'intérêt par dilution isotopique se fait alors par le rapport de la surface du pic de CoQ₁₀ sur la surface du pic de CoQ₁₀-d⁹.

Une solution fille d'étalon interne (CoQ₁₀-d⁹) à 2,0µg/mL est préparée par dilution au 1/100^e dans du méthanol d'une solution mère à 200µg/mL, elle-même préparée par solubilisation d'un flacon de 1mg de CoQ₁₀-d⁹ dans 5mL de *n*-hexane.

c) Contrôles internes de qualité (CIQ)

L'utilisation de contrôles internes de qualité (CIQ) est indispensable pour valider la méthode mise au point (répétabilité et reproductibilité) et garantir la bonne réalisation de chaque série d'analyses. Trois niveaux de contrôle (bas, normal et haut) sont ainsi inclus et analysés en début et en fin de chaque série d'analyses. Ils subissent les mêmes étapes pré-analytiques et analytiques et les valeurs obtenues nous permettent d'accepter ou de rejeter l'ensemble de la série. Selon les critères de la Food and Drug Administration (FDA), les valeurs de CIQ doivent être comprises dans un intervalle de 15% autour de leurs valeurs cibles (sauf pour les valeurs proches

de la limite de quantification pour lesquelles le coefficient de variation - voir définition page 73 - peut être de 20%).¹⁷¹

Pour le dosage plasmatique, nous avons constitué des CIQ « faits maison » à partir de pools de plasma EDTA. Le contrôle bas est obtenu à partir d'un pool de plasma délipoprotéiné puis surchargé en CoQ₁₀ de manière à obtenir une concentration d'environ 0,1µg/mL. Le plasma délipoprotéiné est obtenu par précipitation des LDL, VLDL et chylomicrons par l'acide phosphotungstique et le chlorure de magnésium (réactif commercial Biolabo®). Le contrôle normal est constitué d'un pool de plasma non traité, d'une concentration d'environ 0,7 à 1,0µg/mL. Enfin, le contrôle haut est un pool de plasma surchargé en CoQ₁₀ de manière à obtenir une concentration d'environ 1,5 à 1,8µg/mL.

Pour le dosage musculaire, les contrôles sont également « faits maison », par dilution d'une solution mère de CoQ₁₀ dans du tampon MAN. Trois niveaux de contrôle à environ 0,1 ; 0,8 et 1,5µg/mL sont préparés.

Lorsque des nouveaux contrôles sont préparés, une période probatoire leur est appliquée afin de définir leurs nouvelles valeurs cibles. Pendant cette période, les nouveaux contrôles sont analysés comme des échantillons patient et la conformité de la méthode est assurée par les contrôles en cours. Nous avons défini une période probatoire d'au moins 5 mesures pour tous les contrôles.

3. Traitement pré-analytique

L'optimisation du traitement pré-analytique est détaillée dans la partie « Résultats » du manuscrit. Nous décrivons ici le protocole final utilisé en routine.

a) Dosage plasmatique

Les échantillons patient, les CIQ et les calibrants sont traités de la même manière tout au long du dosage. Dans des tubes à vis en verre, sont introduits 100µL d'échantillon, 50µL de solution fille d'étalon interne, 500µL de méthanol (précipitation des protéines) et 1000µL de *n*-hexane (extraction du CoQ₁₀). Le mélange est vortexé pendant 1 minute puis centrifugé à 1200g pendant 3 minutes. La phase supérieure est reprise avec une pipette Pasteur dans des tubes à hémolyse en verre. L'étape d'extraction par le *n*-hexane est répétée 2 fois (3 extractions au total). Les phases organiques sont réunies et évaporée dans un concentrateur à vide CentriVap® à 50°C pendant environ 50 minutes. Les résidus secs sont repris dans 100µL d'éthanol,

vortexés pendant 3 minutes, mis en vial, centrifugés 10 minutes à 3000g et congelés à -20°C si l'injection ne se fait pas immédiatement.

b) Dosage musculaire

En fonction de la concentration en protéines dans l'homogénat musculaire, celui-ci est au préalable dilué au ½ (protéines ≤5mg/mL) ou au ¼ (>5mg/mL) dans du tampon MAN. L'extraction du CoQ₁₀ musculaire est réalisée de la même manière que pour le dosage plasmatique en utilisant 80µL d'échantillon dilué et 40µL d'étalon interne.

4. Analyse chromatographique

La séparation chromatographique est effectuée sur un système NexeraXR® (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) munie d'une colonne Pursuit PFP® 3µm (2,0 x 150mm) (Agilent, Santa Clara, USA) et d'une pré-colonne Pursuit PFP Metaguard® 3µm. Dix microlitres sont injectés dans la colonne et élués à l'aide des phases mobiles A et B avec un débit de 0,35 mL/min pendant 7,5 minutes, selon le gradient de concentration indiqué dans le Tableau 7. Le four de la colonne est à 40°C pendant toute la durée de l'analyse.

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	20	80
3,0	0	100
5,0	0	100
5,5	20	80
7,5	STOP	STOP

Tableau 7. Dosage du CoQ₁₀ : gradient de solvants HPLC
Phase A : Acide Formique 0,1% (v/v) dans de l'eau (grade LCMS)
Phase B : Méthanol (grade LCMS)

La colonne Pursuit PFP® est une colonne capillaire à phase inverse hydrophobe qui présente une meilleure sélectivité pour les molécules aromatiques par rapport aux colonnes C₁₈ classiques. La phase stationnaire est constituée d'un gel de silice greffée par des groupements propyl-pentafluorophényl. Les atomes de fluor du cycle phényle augmentent les interactions π-π avec les molécules aromatiques. La séparation des composés repose sur 4 mécanismes de rétention : interactions polaires (liaison hydrogènes), interactions dipôle-dipôle, interactions π-π et interactions hydrophobes.

Type de colonne : phase inverse	
Matériau de remplissage : silice	
Phase stationnaire : propyl-pentafluorophényl	
Taille des pores : 200Å	
Taille des particules : 3µm	
Stabilité aux pH : 2 – 8	
Teneur en carbone : 6,3%	
Surface : 200m ² /g	

Figure 29. Caractéristiques techniques de la colonne Pursuit PFP® et représentation schématique des groupements PFP.

5. Spectrométrie de masse

a) Principes généraux

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse permet également de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Un spectromètre de masse est constitué de 3 parties placées en série permettant l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), la séparation de ces ions en fonction de leur rapport m/z (analyseur) et leur détection (Figure 30).¹⁷² Le spectromètre de masse que nous utilisons est un triple quadripôle API 5500 QTRAP® (ABSciex, Les Ulis, France), piloté par le logiciel Analyst® 1.7.

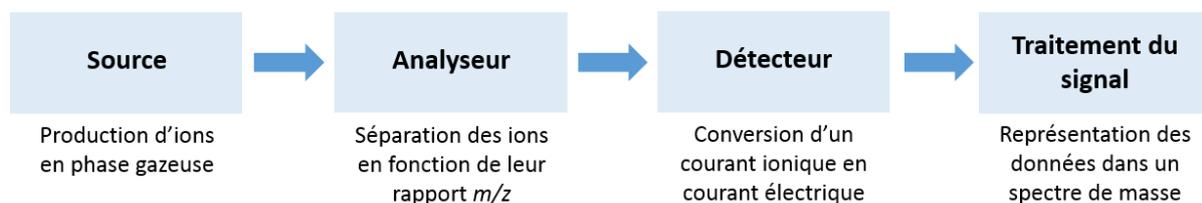


Figure 30. Représentation schématique d'un spectromètre de masse.

b) Source d'ionisation

Il existe deux techniques d'ionisation des molécules : l'ionisation par électro-nébuleuse (ESI, pour *electrospray ionization*) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, pour *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Pour notre étude, nous avons choisi la source APCI en mode positif, en suivant les paramètres résumés dans le Tableau 8.

Paramètre	Valeur
Gaz nébuliseur	35 psi
Gaz rideau	3 psi
Gaz de collision	10 psi
Gaz séchant	60 psi
Température	275°C

Tableau 8. Paramètres de température et de pression des gaz de la source APCI.

L'APCI est une technique d'ionisation douce en phase gazeuse, basée sur le transfert de charges d'un ion réactif à la molécule d'analyte.¹⁷³ Le schéma d'une source APCI est représenté dans la Figure 31. Dans le nébuliseur chauffé, l'effluent de la colonne de chromatographie, contenant les solvants de la phase mobile et l'analyte, est réduit en fines gouttelettes puis évaporé et transformé en aérosol (1). A la sortie du capillaire, la phase gazeuse passe à travers un flux d'électrons émis par l'électrode à décharge couronne (ou « Corona ») qui va ioniser le gaz nébuliseur : azote $N_2 \rightarrow N_2^+$ (2). Ces ions primaires réagissent rapidement et transfèrent leurs charges aux molécules de solvant pour produire des ions réactifs : eau $H_2O \rightarrow H_3O^+$ et méthanol $CH_3OH \rightarrow CH_3OH_2^+$ (3). Ceux-ci transfèrent ensuite un proton à la molécule d'analyte : $M \rightarrow [M+H]^+$ (4). Ces ions entrent enfin dans l'analyseur de masse grâce au DP (declustering potential) et au gaz rideau (curtain gas) qui va éliminer les molécules non chargées (5).

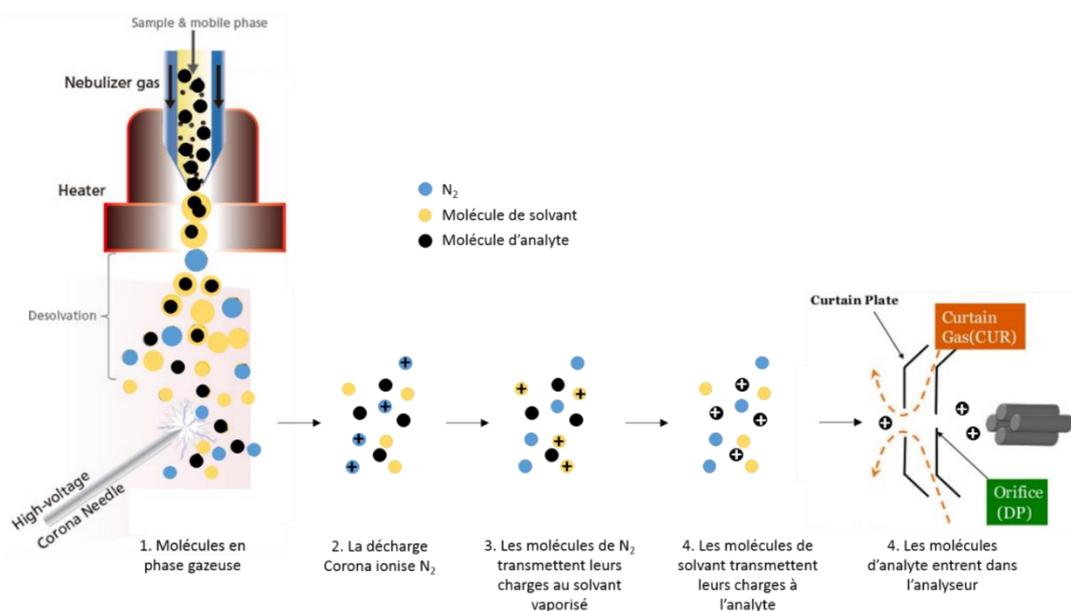


Figure 31. Théorie de l'APCI.¹⁷⁴

c) Séparation des ions

L'analyseur de masse utilisé est un triple quadripôle. Un quadripôle (Q) est constitué de 4 électrodes métalliques parallèles soumises deux à deux à des différences de potentiels. Cela va faire osciller les ions entrant dans le quadripôle. En choisissant correctement l'amplitude et la fréquence de variation du potentiel appliqué aux électrodes, seuls les ions de rapport m/z d'intérêt présenteront une trajectoire stable dans le quadripôle et seront détectés. Les autres ions auront une trajectoire instable et seront éjectés (Figure 32).

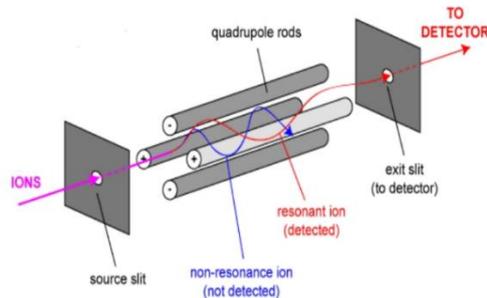


Figure 32. Fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.¹⁷⁵

Plusieurs quadripôles peuvent être couplés entre eux en série et constituer un spectromètre de masse en « tandem ». C'est le cas du triple quadripôle API 5500 QTRAP®. Le premier et le troisième quadripôle (Q1 et Q3) permettent la séparation et la sélection des ions alors que le deuxième quadripôle (Q2) est une chambre de collision permettant la fragmentation des ions grâce au gaz de collision.

L'acquisition pour la détection du CoQ₁₀ est réalisée en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM). Q1 permet la sélection exclusive de l'ion parent (ou ion précurseur) et Q3 celle de l'ion fils (ou ion fragment). La détection d'un ion parent et d'un de ses ions fils correspond à une transition (Figure 33). La double sélection de l'ion précurseur et de l'ion fragment augmente la spécificité de détection de la molécule à doser et diminue le bruit de fond. Ce mode est généralement couplé à la chromatographie ce qui permet l'identification et la quantification de l'analyte par son temps de rétention et sa transition ion parent/ion fils.

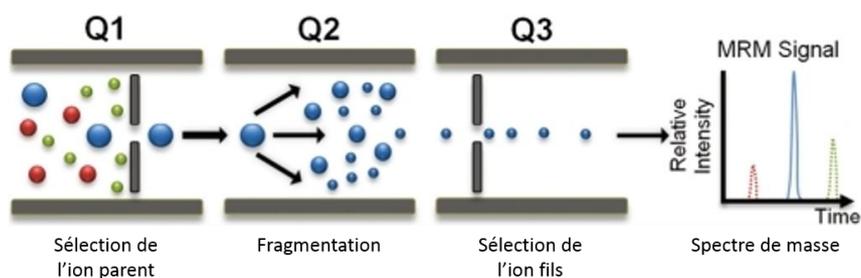


Figure 33. Principe de l'acquisition en mode MRM (adapté de Boja et al.).¹⁷⁶

L'ionisation du CoQ₁₀ par APCI en mode positif produit l'ion parent [M+H]⁺, de rapport $m/z=863,4$. La fragmentation conduit à la perte de la chaîne latérale polyisoprényle et à la formation de l'ion fils benzylum, de rapport $m/z=197,1$ (Figure 34).^{177,178}

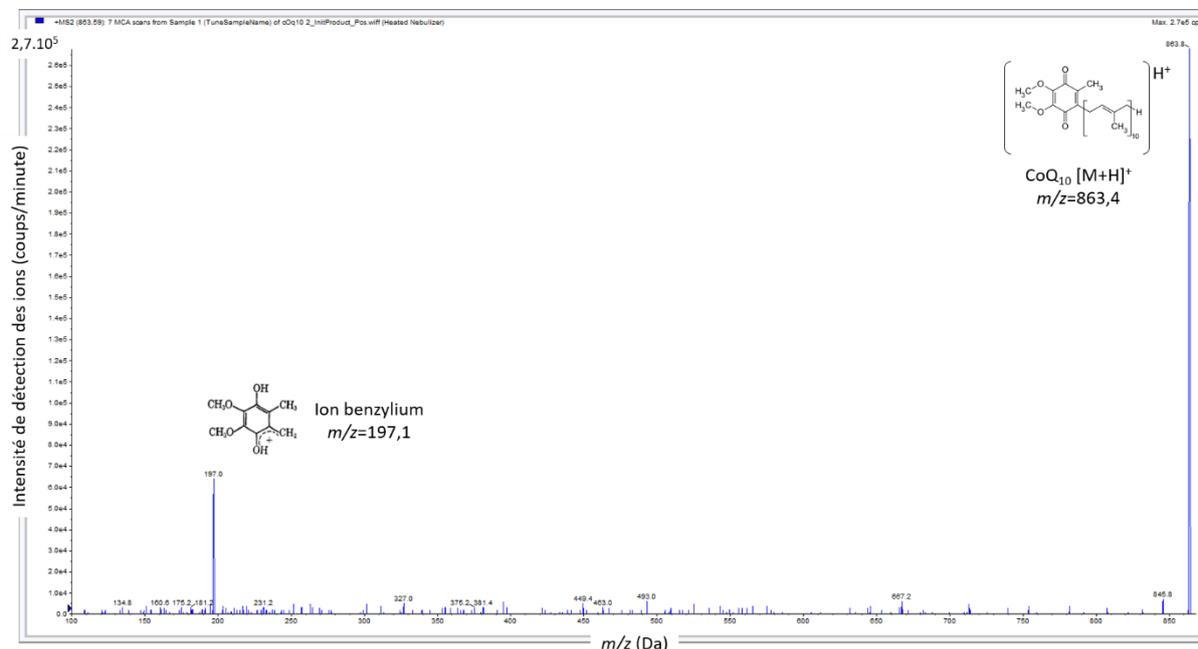


Figure 34. Spectre de fragmentation du CoQ₁₀.

IV. Validation de la méthode analytique selon la norme ISO 15189

La validation de la méthode a été effectuée en suivant les recommandations de la Food and Drug Administration¹⁷¹ et le Guide Technique d'Accréditation de vérification/validation des méthodes en Biologie Médicale (SH GTA 04).¹⁷⁹ Dans le cadre d'une validation de méthode de portée B, nous avons vérifié les éléments décrits dans le Tableau 9. Pour valider l'acceptabilité des performances de la méthode, le coefficient de variation (CV - définition page suivante) des différents paramètres de validation de méthode doivent être inférieurs à 15%, sauf pour les valeurs proches de la limite de quantification pour laquelle le CV ne doit pas excéder 20% (critères de 2018 de la FDA).¹⁷¹

Paramètre	Modalités de validation		
		Dosage plasmatique	Dosage musculaire
Répétabilité	<input checked="" type="checkbox"/>	3 niveaux de concentration 20 passages	3 niveaux de concentration 10 passages
Reproductibilité intra-laboratoire	<input checked="" type="checkbox"/>	3 niveaux de concentration 20 passages	3 niveaux de concentration 10 passages
Variabilité inter-opérateurs	<input checked="" type="checkbox"/>	3 niveaux de concentration 5 passages par opérateur	3 niveaux de concentration 5 passages par opérateur
Justesse	NA	Absence de CIQ externalisés	
Exactitude	<input checked="" type="checkbox"/>	EEQ ERNDIM	
Spécificité analytique	<input checked="" type="checkbox"/>	Variabilité des temps de rétention	
Incertitude	<input checked="" type="checkbox"/>	Méthode CIQ + EEQ	
Etendue de mesure	<input checked="" type="checkbox"/>	Linéarité, limite de détection, limite de quantification	
Comparaison de méthode	NA	Paramètre non dosé auparavant au laboratoire	
Interférences	<input checked="" type="checkbox"/>	Hémolyse, ictère, lactescence	NA
Contamination	<input checked="" type="checkbox"/>	Contamination inter-échantillons	
Robustesse et fiabilité des réactifs	<input checked="" type="checkbox"/>	Usure de la colonne	
Intervalle de référence	<input checked="" type="checkbox"/>	Défini par essais et en fonction des exigences cliniques	

Tableau 9. Validation de la méthode de dosage du CoQ₁₀ : paramètres à vérifier.
NA : non applicable.

1. Répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire

L'essai de répétabilité consiste à analyser n fois un même échantillon dans une même série, c'est-à-dire dans les mêmes conditions (même opérateur, mêmes lots de réactifs, même appareillage, même étalonnage) et dans un délai le plus court possible. L'essai de reproductibilité intra-laboratoire consiste à analyser n fois un même échantillon dans des séries différentes en faisant varier au moins un des facteurs : opérateur, étalonnage, lot de réactifs, jour...

Chaque niveau de CIQ, tels que définis précédemment, a été analysé 10 fois (pour le dosage musculaire) ou 20 fois (pour le dosage plasmatique) puis le coefficient de variation (CV) a été calculé selon la formule :

$$CV(\%) = \frac{\text{écart - type standard}}{\text{moyenne}} \times 100$$

NB : pour la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité du dosage musculaire, nous avons exceptionnellement travaillé avec 2 pools d'homogénats musculaires (1 pool bas et 1 pool normal) en plus du pool haut dans le tampon MAN.

2. Variabilité inter-opérateurs

Dans le cadre de méthodes non automatisées, la variabilité inter-opérateurs doit être évaluée pour s'assurer que les étapes de préparation et d'extraction des échantillons, réalisées par des opérateurs différents, conduisent au même résultat. Cette étape n'a pas encore été réalisée au laboratoire mais nous prévoyons que 3 opérateurs analysent les différents niveaux de CIQ dans 5 séries différentes. Pour chaque opérateur, le coefficient de variation sera calculé selon la formule précédente.

3. Exactitude

L'exactitude représente l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande. Elle a été évaluée de manière rétrospective par l'analyse d'échantillons sériques provenant du programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) ERNDIM 2020. Un programme d'EEQ est une procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par rapport à d'autres laboratoires, en comparant la valeur obtenue à la valeur cible attendue de l'échantillon testé. On définit des valeurs cibles « toutes techniques » et des valeurs cibles « groupe de pairs » correspondant aux laboratoires qui utilisent les mêmes techniques analytiques.

A chaque session, pour chaque échantillon, nous obtenons plusieurs données :

- Le nombre n de laboratoires participants au programme d'EEQ ;
- La valeur rendue par notre laboratoire, appelée « VR » ;
- La médiane des valeurs rendues par tous les laboratoires, appelée « cible médiane » :
- L'écart-type des valeurs rendues, appelé « s_D ».

Ces données nous permettent de calculer le z-score selon la formule suivante :

$$z - score = \frac{VR - \text{cible médiane}}{s_D}$$

Plus la valeur du z-score est basse, plus le biais entre notre résultat et ceux de l'ensemble des participants est faible.

4. Spécificité analytique

La spécificité analytique se définit comme la capacité d'une méthode d'analyse à identifier et quantifier sans ambiguïté la substance analysée en présence d'autres éléments normalement présents dans la matrice. Elle a été évaluée par l'analyse de

la variabilité des temps de rétention (t_R) du CoQ₁₀ et du CoQ₁₀-d⁹ (étalon interne EI) au cours d'une même série, dans 1 solvant de reprise, 6 points de gamme, 3 CIQ et 3 patients. Cinq séries ont été analysées, pour lesquelles ont été calculés la moyenne, l'écart-type et le CV.

5. Incertitude

L'incertitude de mesure est le paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs qui peuvent être attribuées à l'analyte mesuré. Cette incertitude est associée aux erreurs de mesures qui peuvent être dues à l'instrument de mesure, à l'opérateur ou à la variabilité de la grandeur mesurée. L'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. Elle est associée à tout résultat biologique et aide à son interprétation, en particulier lorsque celui-ci est comparé à un résultat antérieur ou à un seuil de décision clinique.

L'incertitude de mesure peut être évaluée par la méthode « CIQ/EEQ » qui repose sur l'exploitation des données internes (CIQ) et des données externes (EEQ). L'incertitude u se calcule selon la formule :

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

où $u^2(CIQ)$ représente la variance (le carré de l'écart-type) de l'ensemble des résultats du CIQ et $u^2(EEQ)$ la variance liée à l'exactitude.

6. Etendue de mesure et linéarité

L'étendue de mesure comprend la limite de détection (LoD), la limite de quantification (LoQ) et la limite supérieure de linéarité. La LoD correspond à la plus petite concentration de l'analyte donnant un signal significativement différent du zéro. La LoQ correspond à la plus petite concentration de l'analyte pouvant être déterminée quantitativement dans les conditions décrites par la méthode. La LoD est définie par un rapport $\frac{\text{Signal de l'analyte}}{\text{Bruit de fond}}$ supérieur à 3 et a été estimée par la formule $LoD=3 \times S_b$ où S_b est l'écart-type d'une série de 10 mesures d'un échantillon « blanc ». Celui-ci est constitué de méthanol auquel est ajouté l'EI dans un but de quantification.

La LoQ a été évaluée par la méthode des dilutions successives du calibrant le plus bas (0,1 µg/mL) dans du méthanol. Six dilutions au ½ ont ainsi été réalisées, soit 6 échantillons mesurés chacun 7 fois dans la même série. Pour chacune des dilutions, on calcule le coefficient de variation et on trace la courbe des CV en fonction des

concentrations (courbe de Horwitz). La LoQ correspond à la concentration pour laquelle on obtient un CV de 10%.

La linéarité a été vérifiée en utilisant notre courbe de calibration en 6 points. Elle était jugée acceptable lorsque le coefficient de corrélation r calculé selon la méthode des moindres carrés basée sur les ratios $\frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}}$ était supérieur à 0,99. La limite supérieure de linéarité correspond à la plus grande concentration pour laquelle le signal mesuré est proportionnel à la concentration en analyte. Elle a été déterminée en mesurant des calibrants de plus en plus concentrés (jusque 10 μ g/mL de CoQ₁₀) et en s'assurant que le coefficient de corrélation restait supérieur à 0,99.

7. Interférences

Pour le dosage d'une substance plasmatique, la présence de substances endogènes (principalement : hémoglobine, bilirubine et triglycérides) dans l'échantillon à doser peut être à l'origine d'interférences et conduire à une sous-estimation ou une surestimation de la concentration réelle en analyte. L'influence de l'hémolyse, de l'ictère et de la lactescence sur le dosage du CoQ₁₀ ont été évaluées en surchargeant un pool de plasma en hémoglobine, en bilirubine ou en triglycérides.

Après centrifugation d'un tube EDTA et élimination du plasma, le culot globulaire est lavé dans du sérum physiologique puis hémolysé dans de l'eau. Le taux d'hémoglobine de la solution obtenue est mesuré sur un appareil à gaz du sang (ABL 800Flex, Radiometer®). A partir de cette solution, 5 aliquots de plasma surchargés à 85, 170, 260, 340 et 520mg/dL d'hémoglobine ont été préparés puis dosés. De la même façon, 5 aliquots de plasma surchargés à 46, 92, 184 et 368 μ mol/L de bilirubine ont été préparés à partir d'une solution de bilirubine à 3,68mmol/L (2,15mg de bilirubine solubilisés dans 1000 μ L de méthanol). Enfin, 6 aliquots de plasma surchargés à 30, 60, 120, 240, 480 et 960mg/dL de triglycérides ont été préparés à partir d'une solution de Médialipides® 20% (triglycérides à chaînes moyennes).

Pour le dosage du CoQ₁₀ musculaire, la qualité de l'homogénat tissulaire est appréciée par les résultats du dosage de l'activité citrate synthase et des différents complexes de la chaîne respiratoire (voir page 79).

8. Contamination inter-échantillons

Une étude de contamination inter-échantillons a été effectuée afin de vérifier l'absence de contamination liée au système de pipetage et d'injection de l'échantillon dans l'appareil. Après rinçage de l'appareil, le point de calibration le plus élevé (2,0µg/mL) a été analysé successivement 3 fois (H1, H2, H3, moyenne mH), suivi du point de calibration le plus faible (0,1µg/mL) également analysé 3 fois (B1, B2, B3). La séquence (H1, H2, H3, B1, B2, B3) a été répétée 5 fois afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). La différence statistiquement significative entre les 2 moyennes a été établie à l'aide d'un test « t » de Student avant de procéder au calcul du pourcentage de contamination inter-échantillons selon la formule :

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

9. Robustesse et fiabilité des réactifs

La robustesse d'une procédure analytique est la mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations accidentelles des conditions opératoires de la procédure. Parmi les facteurs de variations possibles, nous avons considéré les facteurs les plus susceptibles d'être modifiés lors de l'utilisation de la technique en routine, à savoir l'état de la colonne chromatographique, le débit de la phase mobile et la température du four.

10. Effet de matrice et rendement d'extraction

Nous avons évalué l'effet de matrice et le rendement d'extraction en comparant les résultats du dosage du CoQ₁₀ dans 3 conditions différentes (Figure 35). Pour chaque condition, 3 concentrations (0,5 ; 1,0 et 2,0µg/mL) ont été considérées.

- **Conditions A** : « Solvant de Reprise Surchargé en CoQ₁₀ = SRS » : les solutions pures de CoQ₁₀, obtenues par dilution dans le méthanol de la solution de calibration, sont directement évaporées au CentriVap® puis solubilisées dans le solvant de reprise (solution d'EI à 1,0µg/mL dans l'éthanol).

- **Conditions B** : « Matrice Surchargée en CoQ₁₀ = MSQ » : la matrice pure (plasma délipoprotéiné, sérum artificiel ou tampon MAN) est extraite selon le protocole de traitement pré-analytique décrit page 67 et solubilisée dans le SRS contenant le CoQ₁₀.

• **Conditions C** : « Matrice Surchargée en CoQ₁₀ + Solvant de Reprise = MSSR » : les solutions de CoQ₁₀ dans les différentes matrices sont extraites comme précédemment puis remises en solution dans le solvant de reprise.

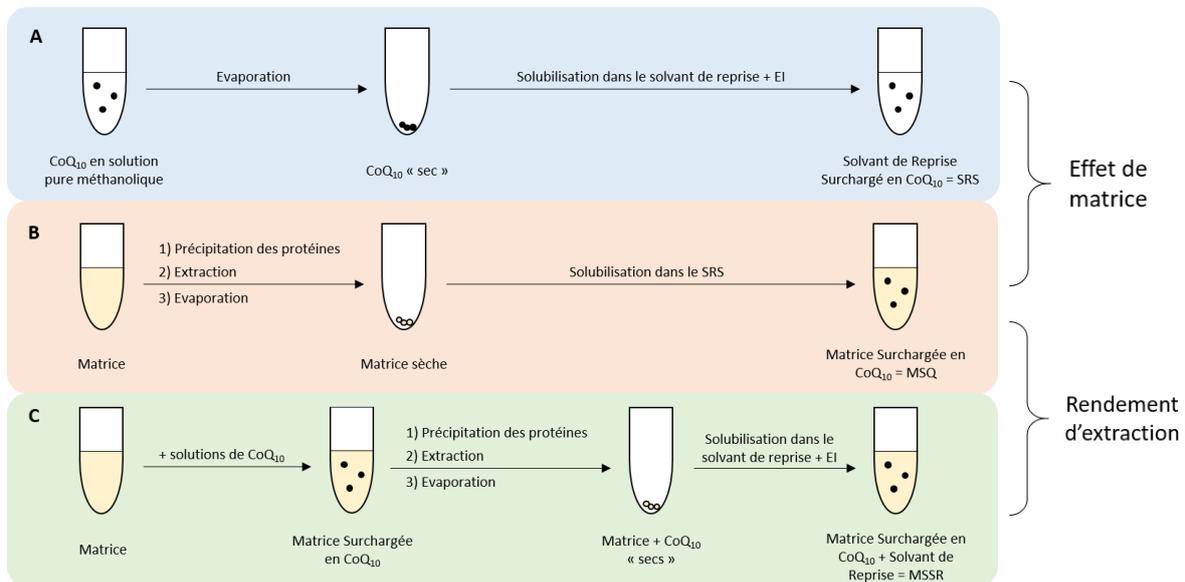


Figure 35. Préparation des solutions pour la détermination de l'effet de matrice et du rendement d'extraction.

Les solutions SRS et MSQ des conditions A et B ne varient que par la nature de la matrice (méthanolique ou autre). L'effet de matrice a pu être estimé par la formule :

$$\text{Effet de matrice} = 100 \times \frac{\text{Concentration SRS} - \text{Concentration MSQ}}{\text{Concentration SRS}}$$

Les solutions MSQ et MSSR des conditions B et C ne varient que par le passage ou non des analytes par l'étape d'extraction. Le rendement d'extraction a pu être estimé par la formule :

$$\text{Rendement d'extraction} = 100 \times \frac{\text{Concentration MSSR}}{\text{Concentration MSQ}}$$

V. Etude biochimique du muscle

1. Préparation des homogénats musculaires

A réception des biopsies musculaires, celles-ci sont directement congelées à -80°C jusqu'à préparation. Une masse de tissu congelé d'environ 30 à 50mg est homogénéisée 2 fois dans 10 volumes de tampon MAN (mannitol 225mM ; sucrose 70mM ; Tris-HCl 10mM ; EDTA 0,1mM ; pH 7,2) en utilisant un broyeur Potter-

Elvehjem. Les homogénats sont centrifugés à 650g pendant 20 minutes à 4°C, puis les surnageants sont rassemblés et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

2. Dosage des protéines

Le dosage du CoQ₁₀ musculaire doit être rapporté au taux de protéines de l'homogénat afin de pouvoir comparer les résultats des différents patients. Le dosage des protéines s'effectue par la méthode BCA (pour *BiCinchoninic acid Assay*), une technique de dosage colorimétrique basée sur l'acide bicinchoninique.¹⁸⁰ En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivrique Cu²⁺ en ions cuivreux Cu⁺ qui forment alors un complexe pourpre avec l'acide bicinchoninique. L'absorbance de ce complexe, mesurée à 562nm, est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.

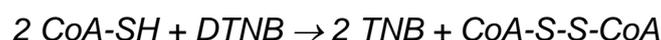
Le kit de dosage utilisé provient de chez Sigma Aldrich® ; il est constitué d'une solution d'acide bicinchoninique (réactif A) et d'une solution de sulfate de cuivre pentahydraté à 4% (réactif B). Une gamme d'étalonnage en 5 points est préparée à partir d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 1mg/mL. Dans chaque cuve réactionnelle, sont introduits 800µL de réactif A, 16µL de réactif B et 40µL d'homogénat musculaire dilué au 1/10^e dans du tampon MAN. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C, l'absorbance est lue à 562nm sur un spectrophotomètre Specord 210 (Analytic Jena®).

3. Dosage de la citrate synthase

Les activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire sont rapportées à l'activité citrate synthase de l'homogénat musculaire. La citrate synthase catalyse la première étape du cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA selon la réaction :



Son activité permet d'évaluer la quantité de mitochondries présentes dans les tissus musculaires. Son dosage repose une réaction colorimétrique : l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) est utilisé pour oxyder le CoA-SH formé par la citrate synthase ; le DTNB est alors réduit en trinitrobenzène (TNB) qui absorbe la lumière visible à 412 nm :



L'augmentation de l'absorbance à 412nm est proportionnelle à l'activité de la citrate synthase. L'activité est exprimée en nmol/min/mg.¹⁸¹

VI. Analyses statistiques

Les variables qualitatives sont décrites par leur effectif et leur fréquence (en pourcentage). Les variables quantitatives sont exprimées par leur moyenne \pm écart-type, ou par leur médiane et quartiles, selon que leur distribution soit normale ou non. Les analyses statistiques concernant le dosage du CoQ₁₀ plasmatique ont été effectuées par l'Unité fonctionnelle de Biostatistique et de Recherche Clinique (UBRC) du CHU de Caen, dans le cadre du financement du projet par la Délégation à la Recherche et à l'Innovation (DRCI). Les données ont été analysées par les logiciels IBM® SPSS Statistics version 23 et STATA® version 13. Les paramètres de la validation de méthode ont été évalués par le logiciel Plever® (Viskali ACC). Les autres analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad® 7. Les différences ont été jugées statistiquement significatives lorsque *p-value* < 0,05.

RESULTATS – MISE EN PLACE DE LA METHODE DE DOSAGE

I. Mise au point de la méthode analytique

De nombreuses méthodes analytiques de dosage du CoQ₁₀ dans le sérum, le plasma, et le muscle principalement, dans l'urine, les fibroblastes et le liquide céphalorachidien (LCR) accessoirement, ont été décrites. Les études récentes utilisent la chromatographie liquide haute performance, couplée à un détecteur électrochimique,^{169,182,183,184} UV,^{185,186} ou un spectromètre de masse.^{166,168,177,187,188,189,190,191} Nous avons fait le choix de la chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS/MS), qui est une méthode sensible, spécifique et permettant de travailler sur des volumes réduits d'échantillons.

1. Etape pré-analytique

Du fait de sa longue chaîne latérale polyisoprényle, le CoQ₁₀ est une molécule hydrophobe qui doit être transportée dans le compartiment sanguin par les lipoprotéines (voir page 23). Il est donc nécessaire d'appliquer aux échantillons à doser un traitement pré-analytique consistant en une précipitation des protéines suivie d'une étape d'extraction du CoQ₁₀ qui augmente la sensibilité de la méthode. Ceci permet également de s'affranchir de l'ensemble des protéines présentes dans les milieux biologiques qui seraient délétères pour les colonnes chromatographiques. Les principaux solvants de précipitation des protéines rapportés dans la littérature sont le méthanol,^{169,185,189,166} l'éthanol,^{188,190} le 1- ou le 2-propanol, seuls ou en mélange.^{184,177,168,191}

Pour l'étape d'extraction, toujours en raison de son caractère hydrophobe, il est nécessaire d'utiliser des solvants apolaires pour solubiliser et extraire correctement le CoQ₁₀. L'extraction par le *n*-hexane est la plus fréquemment décrite. Notre choix s'est donc porté sur le système méthanol/*n*-hexane tel que décrit par Yamashita *et al.*,¹⁶⁹ Karpinska *et al.*¹⁸⁵ et Duberley *et al.*¹⁶⁶ L'étude de l'influence du ratio plasma/méthanol/*n*-hexane a montré que l'extraction de l'ubiquinone et de l'ubiquinol était maximale pour un ratio de 1:5:10 en volumes.¹⁶⁹ Nous avons donc retenu les proportions suivantes : 100µL de plasma, 500µL de méthanol et 1000µL de *n*-hexane.

Selon les équipes, l'étape d'extraction comporte 1,^{169,186,188} 2^{185,166} ou 3 extractions^{168,190} par le *n*-hexane. Nous avons étudié l'influence du nombre d'extractions sur les performances analytiques de notre méthode et avons observé une diminution importante de la sensibilité (Tableau 10). Ce paramètre étant important pour l'utilisation clinique que nous souhaitons faire de notre technique de dosage (nous recherchons principalement les déficits en CoQ₁₀), nous avons choisi de réaliser 3 extractions par le *n*-hexane.

Nombre d'extractions	Limite de quantification
1	0,025
2	0,0063
3	0,0016

Tableau 10. Influence du nombre d'extractions sur la sensibilité de la méthode. Résultats obtenus sur 1 expérience.

Plusieurs étalons internes ont été rapportés dans la littérature, en particulier des analogues du CoQ₁₀ à chaîne latérale plus courte : historiquement, le CoQ₉ est le plus utilisé,^{168,169,177,191} mais certaines équipes ont également décrit l'usage du CoQ₄,¹⁹² du CoQ₇,¹⁸² ainsi que d'un analogue du CoQ₁₀ substitué en positions 5 et 6 par deux groupements propoxy.¹⁸⁹ Plus récemment, des analogues deutérés du CoQ₁₀ ont été décrits, dans lesquels 6 (CoQ₁₀-d⁶)¹⁶⁶ ou 9 (CoQ₁₀-d⁹)¹⁸⁸ atomes d'hydrogène du noyau benzoquinone sont substitués par des atomes de deutérium (¹H → ²H). Bien que plus onéreux, ces analogues deutérés présentent l'avantage d'avoir des caractéristiques physico-chimiques quasiment identiques à celle du CoQ₁₀ et d'être extraits de la même façon. Notre choix s'est donc porté sur le CoQ₁₀-d⁹.

La plupart des études utilisent des colonnes chromatographiques à phase inverse hydrophobe C₁₈,^{168,177,184-186,189-191} C₈¹⁶⁹ ou C₄¹⁶⁶, c'est-à-dire greffée de chaînes carbonées à 18, 8 ou 4 carbones sur le gel de silice, et plus rarement une colonne PFP greffée par des groupements propyl-pentafluorophényl.¹⁸⁸ Grâce à la présence du groupement phényl, la colonne PFP présente une meilleure affinité pour les molécules aromatiques comme le CoQ₁₀; c'est donc celle-ci que nous avons choisie pour mettre au point notre méthode analytique.

Enfin, la majorité des études utilise la source d'ionisation ESI en mode positif. Cependant, celle-ci nécessite d'utiliser des phases mobiles méthanoliques additionnées de formiate d'ammonium^{168,177} ou d'acétate d'ammonium^{166,188,189} afin de faciliter l'ionisation de la molécule. On détecte alors l'adduit [M+NH₄]⁺ dont le rapport *m/z* correspond à la masse de la molécule détectée augmentée de la masse de l'ion

ammonium ($18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'utilisation d'une source APCI a été décrite en mode positif par Strazisar *et al.*¹⁹⁰ et en mode négatif par Hansen *et al.*¹⁹¹ L'ionisation d'une solution pure de CoQ₁₀, injectée directement dans le spectromètre de masse, sans séparation chromatographique préalable, en mode APCI+ donne en effet de meilleurs résultats qu'avec une source ESI, et permet d'identifier immédiatement l'ion parent et l'ion fils. Le choix de la transition suivie et l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse s'effectue en 3 étapes :

- Sélection de l'ion parent dans le 1^{er} quadripôle Q1 : l'infusion d'une solution méthanolique de CoQ₁₀ permet de détecter la présence de l'ion parent non fragmenté ; il s'agit de l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figure 36).

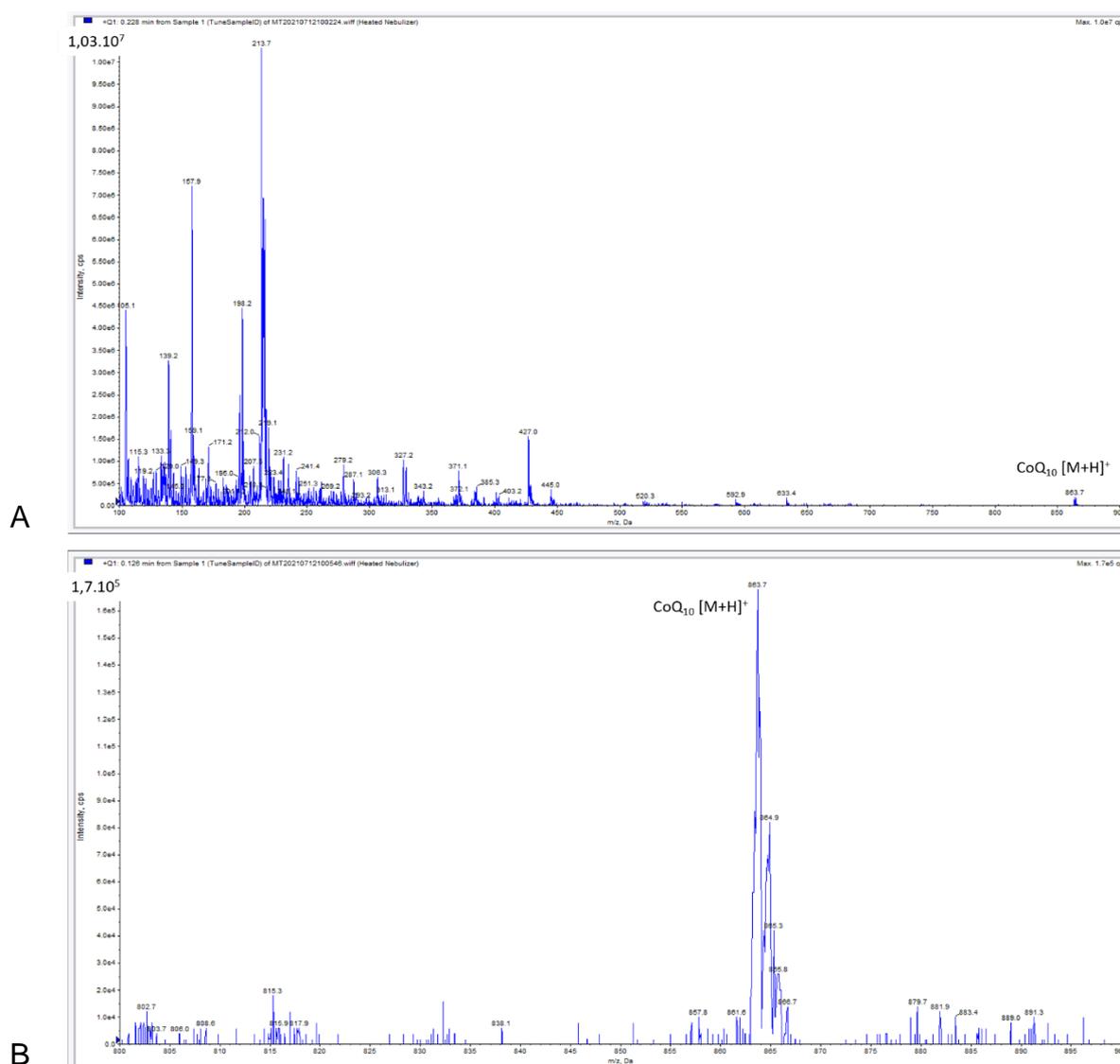


Figure 36. Profil des ions retrouvés en Q1 après infusion d'une solution pure de CoQ₁₀. L'axe des abscisses représente le rapport m/z (Da) et l'axe des ordonnées l'intensité de détection des ions (coups par minute).
 A) Balayage des ions de rapport m/z de 100 à 900Da. B) Zoom de 800 à 900Da.

- Sélection de l'ion fils dans le 3^{ème} quadripôle Q3 : en paramétrant le 1^{er} quadripôle pour la sélection de l'ion parent $[M+H]^+$ $m/z=863,4$, un balayage des ions fils a permis de repérer celui produisant le meilleur signal. En accord avec les données de la littérature, il s'agit de l'ion benzylum $m/z=197,1$ (Figure 37).

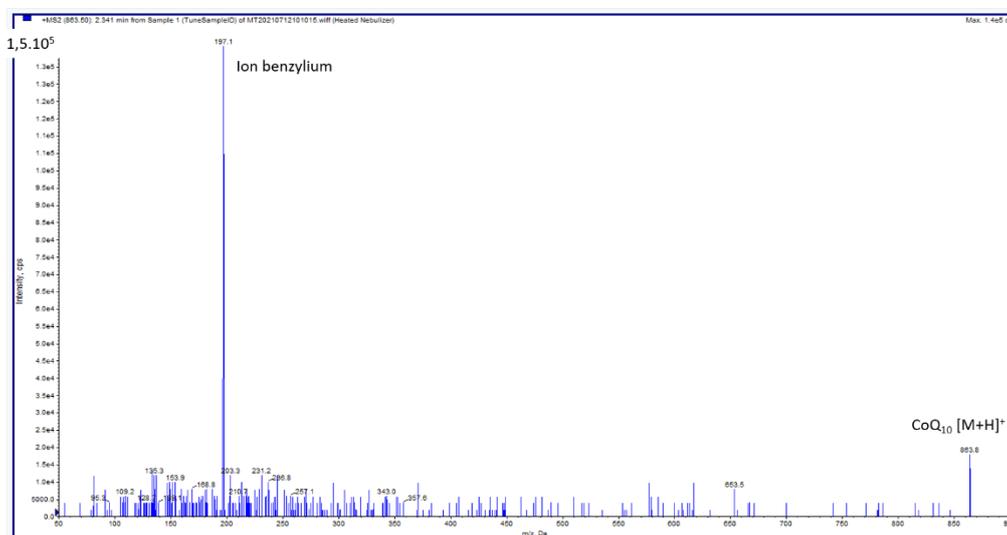


Figure 37. Profil des ions retrouvés en Q3 après sélection de l'ion parent m/z 863,4 en Q1. L'axe des abscisses représente le rapport m/z (de 50 à 900Da) et l'axe des ordonnées l'intensité de détection des ions (coups par minute).

- Enfin, les paramètres de la source APCI et de l'analyseur de masse ont été optimisés par le logiciel Analyst® pour la transition $863,4 \rightarrow 197,1$ choisie. Pour l'étalon interne deutéré $\text{CoQ}_{10}\text{-d}^9$, nous observons la même transition, à un rapport m/z augmenté de 9 ($872,9 \rightarrow 206,3$). Les transitions MRM, les temps de rétention, et les paramètres d'acquisition sont présentés dans le Tableau 11. A noter que, généralement, deux transitions sont définies pour chaque molécule : une transition de quantification et une dite « de qualification » qui permet de vérifier l'identification du signal. Du fait de la très faible fragmentation du CoQ_{10} , nous n'avons pu définir qu'une seule transition de quantification, comme décrit dans la littérature.

Molécule	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Temps de rétention (min)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
CoQ_{10}	863.4	197.1	6.2	70	10	27	10
$\text{CoQ}_{10}\text{-d}^9$ (EI)	872.9	206.3	6.2	70	10	27	10

Tableau 11. Transitions MRM, temps de rétention et paramètres d'acquisition du CoQ_{10} et du $\text{CoQ}_{10}\text{-d}^9$ (étalon interne). DP : Declustering Potential (potentiel de dissociation), EP : Entrance Potential (potentiel d'entrée dans l'analyseur), CE : Collision Energy (énergie de collision), CXP : Collision Cell Exit Potential (potentiel de sortie de la cellule de collision).

2. Exemple de chromatogramme

En appliquant les étapes pré-analytiques et les paramètres HPLC et MS/MS décrits ci-dessus, nous obtenons des chromatogrammes tels que présentés dans la Figure 38. Le CoQ₁₀-d⁹ a un temps de rétention identique à celui du CoQ₁₀, ce qui confirme son choix en tant qu'étalon interne (EI) présentant des propriétés physico-chimiques semblables à son analyte. L'analyse complète d'un échantillon dure 7,5min et le temps de rétention du CoQ₁₀ et de son EI est d'environ 6,1min. Ceci permet de s'assurer de la sortie de colonne de la totalité de l'échantillon, afin d'éviter la contamination de l'échantillon suivant par d'éventuels composés accrochés dans la colonne.

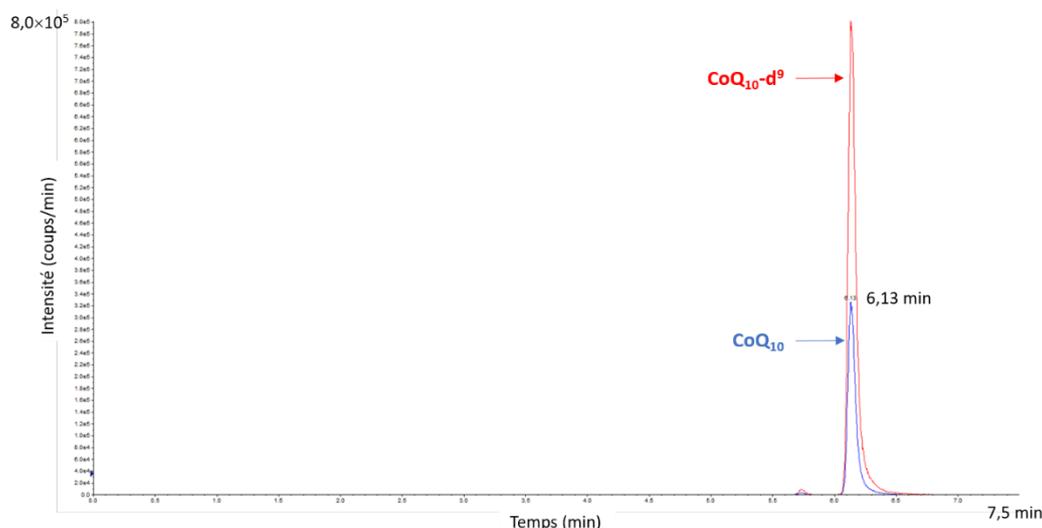


Figure 38. Chromatogramme type obtenu pour le dosage du CoQ₁₀.
L'axe des abscisses représente le temps d'analyse en minutes
et l'axe des ordonnées l'intensité de détection des ions en coups/minute.

3. Dosage de l'ubiquinone vs. ubiquinol

Il est important de noter que la présence du noyau benzoquinone rend le CoQ₁₀ très sensible à l'oxydation *in vitro*, lorsque les systèmes réducteurs physiologiques ne peuvent plus opérer. Plusieurs études ont en effet montré que l'ubiquinol est instable dans le sang total, le plasma et les extraits organiques, entraînant une augmentation rapide du ratio ubiquinone/ubiquinol dès que le prélèvement sanguin est réalisé. Franke *et al.* ont montré que le taux d'oxydation de l'ubiquinol à 22°C était faible dans le sang total, modéré dans le plasma et élevé dans les extraits organiques.¹⁹³ Lagendijk *et al.* ont observé que dans les phases organiques (*n*-propanol) conservées à température ambiante, le taux d'ubiquinol diminue de moitié au bout de 3h ; la réduction est de 20% au bout de 4h dans la fraction plasmatique. De façon similaire,

lorsque le plasma est extrait par le *n*-hexane, on observe une réduction de la moitié du taux d'ubiquinol au bout de 2h à température ambiante.¹⁹⁴

Il est possible de doser les deux formes, oxydée et réduite, de la molécule en utilisant un protocole d'extraction en une seule étape et au prix de précautions pré-analytiques contraignantes (manipulation dans la glace, protection de la lumière, temps d'analyse le plus court possible...)^{169,189,194} L'augmentation du ratio ubiquinone/ubiquinol a été proposé comme un bon marqueur du stress oxydant et d'un dysfonctionnement mitochondrial.^{194,195} Cependant, pour l'utilisation clinique en routine que nous souhaitons faire du dosage du CoQ₁₀ au laboratoire, à savoir identifier un déficit en CoQ₁₀, nous avons fait le choix de doser le CoQ₁₀ total.

Ceci suppose que, dans nos échantillons, tout le CoQ₁₀ soit sous la forme oxydée qui est celle que nous dosons. Il est généralement admis que le CoQ₁₀ est complètement oxydé pendant les étapes d'extraction et la procédure HPLC mais ce n'est pas nécessairement le cas lorsque l'échantillon est frais et que la forme réduite prédomine largement.¹⁸⁴ Nous avons donc comparé les dosages du CoQ₁₀ sur un échantillon sanguin fraîchement prélevé, centrifugé immédiatement à 4°C, et traité dans 3 conditions différentes : (1) un premier aliquot plasmatique a été aussitôt extrait en une seule étape et directement injecté en HPLC ; (2) un second aliquot a été traité selon notre procédure classique avec ses 3 extractions ; (3) un troisième aliquot a été pré-traité par une solution de chlorure de cuivre CuCl₂ afin d'oxyder le CoQ₁₀ (selon la procédure de Kaikkonen *et al.*¹⁹⁶) puis extrait par la procédure classique. Les résultats du dosage du CoQ₁₀ sont indiqués dans le Tableau 12 : on observe une augmentation de la concentration en CoQ₁₀ entre les conditions (1) et (2) ce qui témoigne d'une oxydation de la molécule au cours de la procédure d'extraction. En revanche, il n'y a pas d'augmentation du taux de CoQ₁₀ après oxydation par le CuCl₂ ce qui indique que le traitement pré-analytique est suffisant pour oxyder complètement l'ubiquinol en ubiquinone.

Condition	Concentration en CoQ ₁₀ (µmol/mL)
(1) 1 seule extraction	0,12
(2) 3 extractions	0,85
(3) Oxydation puis 3 extractions	0,74

Tableau 12. Influence du traitement pré-analytique sur le dosage du CoQ₁₀.
Résultats obtenus sur 2 expériences.

4. Effet de matrice et optimisation de la gamme d'étalonnage

Pour le dosage plasmatique, la question du choix de la matrice dans laquelle constituer notre gamme d'étalonnage s'est posée. La quasi-totalité des équipes travaillent sur des gammes d'étalonnages en milieu non plasmatique tel que le méthanol ou l'éthanol. Le principal défaut de ces techniques est la négligence d'un éventuel effet de matrice au cours du dosage, et notamment dans l'étape d'HPLC-MS/MS. Pour s'en affranchir, il est donc nécessaire de se rapprocher au maximum d'une matrice plasmatique.

Nous avons essayé de dépler du plasma humain en CoQ₁₀ par précipitation des LDL, VLDL et chylomicrons par l'acide phosphotungstique et le chlorure de magnésium (réactif commercial Biolabo®). Cette technique s'est cependant avérée insuffisante, avec une rémanence faible, mais significative, de CoQ₁₀, à environ 0,05-0,1 µg/mL.

Une autre solution consiste à reconstituer une matrice plasmatique, ou à défaut sérique, artificielle, généralement composée d'albumine sérique humaine (HSA) ou bovine (BSA) en solution dans du tampon phosphate salin (PBS, pour *Phosphate-Buffered Saline*).^{197,198,199} Nous avons retenu une concentration de 8% (w/v) de BSA dans du PBS à pH 7,5.

Pour le dosage musculaire, il n'a pas été possible de dépler des homogénats musculaires en CoQ₁₀, ni de préparer une matrice musculaire artificielle. Nous avons donc uniquement comparé l'effet de matrice entre le tampon MAN, utilisé pour préparer les homogénats musculaires, et le méthanol.

Les différents effets de matrice ont ensuite été déterminés selon les modalités décrites dans la partie « Matériels et méthodes », par comparaison des conditions A et B de la Figure 35. Pour chacune des trois concentrations en CoQ₁₀ testées, et pour les trois matrices évaluées (plasma délipoprotéiné, plasma artificiel ou tampon MAN vs. méthanol), quatre analyses ont été pratiquées. Les effets de matrices moyens sont indiqués dans le Tableau 13 : nous n'avons pas observé d'effets de matrice significatifs, quelles que soient les concentrations en analytes et quelles que soient les matrices. Ceci nous a donc permis d'envisager la réalisation de la gamme d'étalonnage dans le méthanol que ce soit pour le dosage plasmatique ou pour le dosage musculaire.

		Effet de matrice moyen (%)	p
Plasma délipoprotéiné	0,5 µg/mL	-1,23	0,686
	1 µg/mL	-2,45	0,686
	2 µg/mL	-0,86	>0,999
Plasma artificiel	0,5 µg/mL	-4,92	0,548
	1 µg/mL	-8,00	0,460
	2 µg/mL	-7,32	0,421
Tampon MAN	0,5 µg/mL	-0,01	0,886
	1 µg/mL	2,45	0,686
	2 µg/mL	1,60	0,686

Tableau 13. Estimation de l'effet de matrice. Test de Mann-Whitney (n=4).

5. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a également été établi selon les modalités décrites dans la partie « Matériels et méthodes », par comparaison des conditions B et C de la Figure 35. De la même manière que pour l'estimation de l'effet de matrice, quatre analyses ont été effectuées pour chacune des trois concentrations et des deux matrices. Les rendements d'extraction moyens sont indiqués dans le Tableau 14 : on observe des rendements non significativement différents de 100%, quelles que soient les concentrations en CoQ₁₀. Nous pouvons donc considérer que notre méthode d'extraction permet de récupérer la quasi-totalité de la molécule d'intérêt. A noter que pour le dosage musculaire, bien que la différence ne soit pas significative, nous obtenons des rendements d'extraction plus faibles, d'environ 80%. Ceci peut être dû à la composition du tampon MAN qui va modifier le coefficient de partage avec le *n*-hexane. C'est pourquoi il est particulièrement important de déterminer des valeurs normales propres à notre méthode d'analyse et de ne réaliser le dosage du CoQ₁₀ que sur des homogénats musculaires préparés dans nos conditions.

		Rendement d'extraction moyen (%)	p
Plasma délipoprotéiné	0,5 µg/mL	92,67	0,686
	1 µg/mL	101,57	>0,999
	2 µg/mL	103,41	0,686
Plasma artificiel	0,5 µg/mL	102,05	>0,999
	1 µg/mL	114,88	0,413
	2 µg/mL	113,25	0,730
Tampon MAN	0,5 µg/mL	75,51	0,685
	1 µg/mL	80,55	0,485
	2 µg/mL	83,22	0,685

Tableau 14. Estimation du rendement d'extraction. Test de Mann-Whitney (n=4).

II. Validation et performance de la méthode

1. Spécificité analytique

Afin de déterminer la spécificité analytique telle que définie dans le chapitre « Matériels et Méthodes », 5 séries d'analyses réalisées entre juin 2019 et mars 2021 ont été exploitées. Les temps de rétention du CoQ₁₀ et de son EI sont stables dans les différentes matrices testées et dans une même série, avec des CV intra-série < 1%. Le suivi des temps de rétention entre les différentes séries montre un CV inter-série < 10%, ce qui témoigne d'une bonne stabilité dans le temps (Tableau 15).

Par ailleurs, il n'y a pas de signal détectable au temps de rétention du CoQ₁₀ dans le solvant de reprise et dans un sérum blanc. De même, il n'y a pas de signal détectable au temps de rétention du CoQ₁₀-d⁹ dans des échantillons pour lesquels cet étalon interne n'a pas été ajouté. La méthode utilisée est donc spécifique.

Date	Intra-série						Inter-série	
	t _R CoQ ₁₀			t _R EI			t _R CoQ ₁₀	t _R EI
	Moy	ET	CV	Moy	ET	CV		
04/06/19	6,321	0,031	0,494	6,318	0,031	0,498	Moy=6,344 ET=0,318 CV=5,027	Moy=6,343 ET=0,320 CV=5,039
24/09/19	6,254	0,025	0,392	6,251	0,024	0,377		
27/09/20	6,167	0,027	0,444	6,164	0,028	0,452		
08/11/20	6,946	0,023	0,332	6,946	0,023	0,332		
17/02/21	6,034	0,051	0,838	6,033	0,050	0,836		

Tableau 15. Variabilité intra- et inter-série des temps de rétention du CoQ₁₀ et de son EI. Pour chaque série d'analyse, 18 échantillons ont été analysés. Moy=moyenne (min), ET=écart-type (min), CV=coefficient de variation (%).

2. Etendue de mesure et linéarité

La limite de détection a été évaluée à 0,88ng/mL et la limite de quantification à 1,6ng/mL. Une revue (non exhaustive) de la littérature nous a permis d'envisager l'étude de la linéarité de la méthode jusqu'à une concentration de 2,0µg/mL de CoQ₁₀ (Tableau 16).

Référence	Matrice	Technique de dosage	CoQ ₁₀
Biomnis	Plasma	HPLC/Coulométrie	0,7-1,4µg/mL (VN)
CHU Liège	Plasma	Non renseigné	0,3-1,39µg/mL (VN)
Huang <i>et al.</i> ²⁰⁰	Plasma	HPLC/UV	0,12-1,92µg/mL (EM)
Claessens <i>et al.</i> ¹⁷⁷	Plasma	HPLC/MSMS	0,025-2,5µg/mL (EM)
Ruiz-Jiménez <i>et al.</i> ¹⁶⁸	Sérum	HPLC/MSMS	0,4-2,0µg/mL (EM)

Tableau 16. Exemples de valeurs normales (VN) et d'étendue de mesure (EM) de différentes techniques de dosage du CoQ₁₀.

Cette linéarité est présumée devant des coefficients de corrélation linéaire R^2 de nos gammes de calibration toujours supérieurs à 0,99 (Figure 39). L'étendue de mesure de notre méthode est donc comprise entre 0,0016 et 2,0 μ g/mL, ce qui est conforme à l'utilisation clinique que nous souhaitons en faire. Les échantillons plasmatiques dont les concentrations sont supérieures à 2,0 μ g/mL sont vérifiés dilués au 1/2 ou au 1/4 dans du sérum physiologique. Pour le dosage musculaire, les échantillons sont d'emblée dilués au 1/2 ou au 1/4 dans du tampon MAN en fonction de leur concentration en protéines.

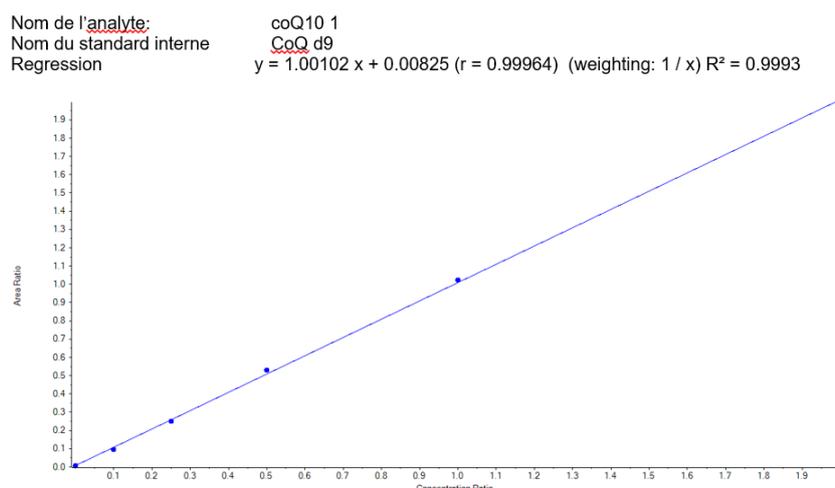


Figure 39. Exemple d'une courbe de calibration. Chaque point de gamme est dosé en singleton.

3. Répétabilité et fidélité intermédiaire

Pour évaluer la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les 3 niveaux de CIQ « maison » ont été dosés selon les modalités définies dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». L'ensemble des CV est inférieur à 15% ce qui permet d'affirmer la conformité de la répétabilité et de la reproductibilité selon les critères d'acceptation de la FDA 2018 (Tableau 17).

	Dosage plasmatique			Dosage musculaire		
	Niveau de CIQ	n	CV (%)	Niveau de CIQ	n	CV (%)
Répétabilité	0,24 μ mol/L	20	6,03	0,41 μ mol/L	10	3,92
	0,96 μ mol/L	20	3,30	0,74 μ mol/L	10	2,21
	2,02 μ mol/L	20	1,66			
Fidélité intermédiaire	0,14 μ mol/L	20	6,36	0,41 μ mol/L	10	8,20
	1,02 μ mol/L	20	7,91	0,74 μ mol/L	10	6,40
	2,40 μ mol/L	20	7,61			

Tableau 17. Répétabilité et fidélité intermédiaire.

4. Interférences

Les concentrations en CoQ₁₀ de 3 pools de plasma surchargés en hémoglobine, bilirubine ou triglycérides, sont indiquées dans le Tableau 18. Aucune interférence de l'hémolyse, de l'ictère et de la lactescence n'a été mise en évidence jusqu'à des concentrations de 520mg/dL d'hémoglobine, 368µmol/L de bilirubine et 240mg/dL de triglycérides (TG). En revanche, pour les plasmas très lactescents (TG > 240mg/dL), on observe une surestimation de la concentration en CoQ₁₀.

Hémolyse			Ictère			Lactescence		
Grade	Hb (mg/dL)	CoQ ₁₀ (µmol/L)	Grade	Bilirubine (µmol/L)	CoQ ₁₀ (µmol/L)	Grade	TG (mg/dL)	CoQ ₁₀ (µmol/L)
0	0	0,85	0	0	0,80	0	0	1,01
1	85	0,84	1	46	0,82	1	30	1,00
2	170	0,83	2	92	0,82	2	60	1,10
3	260	0,85	3	184	0,83	3	120	1,07
4	340	0,82	4	368	0,83	4	240	1,09
5	520	0,83				5	480	1,26
						>5	960	1,49

Tableau 18. Etude de l'interférence de l'hémolyse, de l'ictère et de la lactescence sur le dosage du CoQ₁₀. Résultats obtenus sur une expérience dosée en singleton.

Les interférences testées sur le plasma ne sont pas applicables au tissu musculaire. La richesse du prélèvement en mitochondries, dans lesquelles se retrouve principalement le CoQ₁₀, est estimée par l'activité de la citrate synthase qui est mesurée lors de l'étude biochimique du muscle.

5. Contamination inter-échantillon

La différence entre les moyennes mB1 et mB3, telles que définies dans le chapitre « Matériels et Méthodes », n'est pas significative ($p=0,12$, test « t » apparié). Il n'y a donc pas de contamination inter-échantillon pour le dosage plasmatique du CoQ₁₀ (Tableau 19). Nous avons également vérifié l'absence de signal pour le CoQ₁₀ dans un blanc passé après le point de calibration le plus fort analysé successivement 3 fois.

N	CoQ ₁₀ (µmol/L)	
	Echantillon haut	Echantillon bas
1	2,16	0,140
	2,21	0,135
	2,19	0,138
2	2,16	0,144
	2,18	0,140
	2,19	0,139
3	2,17	0,142
	2,18	0,139
	2,24	0,137
4	2,18	0,142
	2,21	0,141
	2,21	0,137

Tableau 19. Etude de la contamination inter-échantillon sur le dosage plasmatique du CoQ₁₀. Résultats obtenus sur une expérience. La séquence de 3 échantillons haut, suivie de 3 échantillons bas, a été répétée 4 fois.

6. Stabilité des échantillons

a) Stabilité pré-analytique

Entre le prélèvement sanguin chez le patient et son traitement pré-analytique (décantation et congélation) au laboratoire, quelques étapes sont nécessaires (transport du prélèvement, enregistrement informatique, acheminement au laboratoire) qui peuvent prendre plus ou moins de temps. Nous avons donc analysé la stabilité pré-analytique des échantillons sanguins à température ambiante : 5 échantillons prélevés simultanément chez un même patient ont été décantés et congelés après 30 minutes, 1H, 2H, 4H et 8H. Nous avons également évalué la stabilité à 4°C en cas de conservation des échantillons au réfrigérateur (en dehors des ouvertures du laboratoire par exemple) : 5 échantillons prélevés simultanément chez un même patient ont été décantés et congelés après 12H, 24H, 48H et 72H à 4°C. Comme l'indiquent les résultats du Tableau 20, le pool total de CoQ₁₀ est stable dans les tubes EDTA pendant au moins 8 heures à température ambiante et au moins 72 heures à 4°C.

Température ambiante		4°C	
Temps	CoQ ₁₀ (µmol/L)	Temps	CoQ ₁₀ (µmol/L)
30min	0,67	0H	0,59
1H	0,65	12H	0,54
2H	0,68	24H	0,55
4H	0,66	48H	0,55
8H	0,68	72H	0,54

Tableau 20. Etude de la stabilité pré-analytique du CoQ₁₀ sur sang total EDTA. Résultats obtenus sur une expérience dosée en duplicate.

La stabilité pré-analytique des homogénats musculaires est subordonnée à celle des biopsies musculaires : celles-ci doivent être congelées à -80°C dans les 30 minutes suivant leur prélèvement. L'homogénat musculaire est préparé à froid puis immédiatement congelé à -80°C également jusqu'à utilisation.

b) Stabilité post-extraction

Généralement, après extraction des prélèvements plasmatiques ou musculaires, les vials contenant les extraits organiques sont directement mis à bord de l'appareil d'HPLC-MS/MS pour injection et analyse. Cependant, pour des raisons d'organisation, il peut arriver que l'injection ne soit pas faite immédiatement (appareil réquisitionné pour une analyse urgente, contraintes liées aux ressources humaines...). Nous avons donc analysé la stabilité des extraits organiques éthanoliques sur les 3 niveaux de CIQ à -20°C jusqu'à 1 semaine avant injection. La variation des concentrations en CoQ₁₀ en fonction du temps de conservation est indiquée sur la Figure 40. On observe une diminution de plus de 20% du taux de CoQ₁₀ au bout de 7 jours de conservation. En revanche, les extraits organiques sont stables à -20°C pendant au moins 72h avant injection.

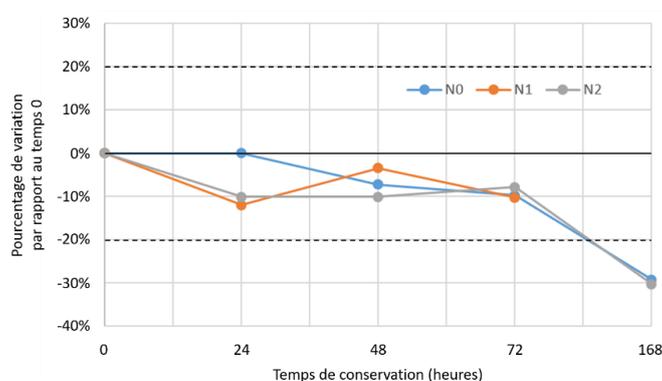


Figure 40. Détermination de la durée maximale de conservation des extraits organiques à -20°C avant injection sur l'appareil d'HPLC, sur les 3 niveaux de CIQ : N0 (0,47µmol/L), N1 (0,59µmol/L) et N2 (0,95µmol/L). Résultats obtenus sur une expérience.

c) Stabilité à la conservation

Les aliquots que nous avons analysés pour évaluer la reproductibilité de la méthode ont été préparés et congelés à -20°C à la même date. Ils ont ensuite été décongelés individuellement le jour du dosage pendant au moins 52 semaines. Les CV précédemment décrits sont conformes ce qui indique que le CoQ_{10} plasmatique est stable à la congélation à -20°C sans décongélation pendant au moins 1 an (Tableau 17). Nous avons également évalué l'impact de 6 cycles de congélation/décongélation sur la valeur du CoQ_{10} plasmatique. La variation des concentrations en CoQ_{10} en fonction des cycles est indiquée sur la Figure 41. Hormis pour le CIQ N0 pour lequel nous avons une variation de $-20,3\%$ à la 4^{ème} décongélation, les concentrations plasmatiques restent stables pour les 3 niveaux de CIQ. Nous pouvons donc effectuer jusqu'à 6 cycles de congélation/décongélation tout en garantissant la stabilité des échantillons plasmatiques.

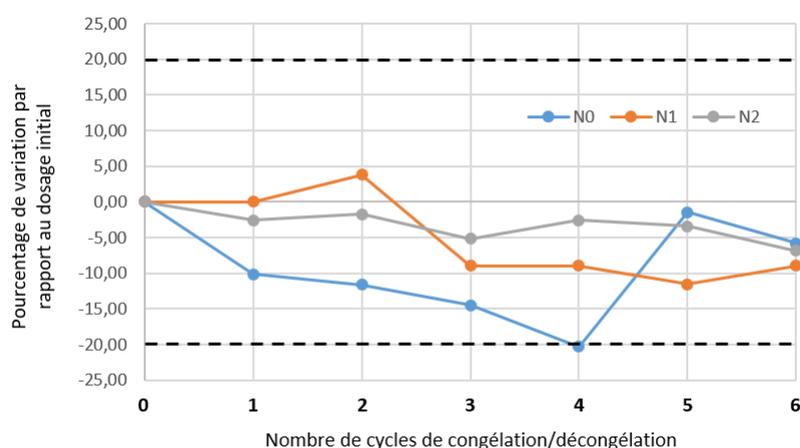


Figure 41. Pourcentage de variation des concentrations en CoQ_{10} en fonction des cycles de congélation/décongélation, sur les 3 niveaux de CIQ : N0 ($0,47\mu\text{mol/L}$), N1 ($0,59\mu\text{mol/L}$) et N2 ($0,95\mu\text{mol/L}$). Résultats obtenus sur une expérience.

La stabilité du CoQ_{10} à la congélation/décongélation des homogénats musculaires reste à évaluer.

7. Exactitude

Créé en 1994, le programme ERNDIM (*European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*) est spécialisé dans l'évaluation des paramètres biologiques utilisés dans le diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme. Le programme SAS (*Special Assays in Serum*) consiste en 8 échantillons lyophilisés par an,

identiques deux à deux et préparés à partir d'un même pool de sérum humain par ajout de quantités données d'analytes. Vingt-trois analytes sont inclus dans le panel SAS dont le CoQ₁₀ qui a été rajouté à partir de janvier 2020.²⁰¹ Sur l'année 2020, seuls 10 laboratoires ont rendu des résultats pour le CoQ₁₀, sur les 217 laboratoires participant au programme d'EEQ. Les résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires, toutes techniques confondues, avec leur moyenne, leur médiane et leur écart-type, ainsi que les résultats que nous avons obtenus *a posteriori* et leur z-score, sont consignés dans le Tableau 21. La Figure 42 représente la répartition des valeurs de z-score calculées.

EEQ	n	Moyenne (µmol/L)	Médiane (µmol/L)	Ecart-type (µmol/L)	Valeur rendue VR (µmol/L)	z-score
Janvier	10	1,33	1,21	1,56	1,13	-0,05
Février	10	0,478	0,433	0,252	0,57	0,54
Mars	10	0,34	0,340	0,0504	0,16	-3,57
Avril	9	1,7	1,10	2,2	1,97	0,40
Mai	10	2,22	2,02	2,84	2,37	0,12
Juin	10	0,311	0,32	0,0415	0,15	-4,10
Juillet	9	1,1	1,21	0,803	0,96	-0,31
Août	10	0,584	0,54	0,34	0,63	0,26

Tableau 21. Résultats obtenus pour le dosage des EEQ ERNDIM sur l'année 2020. Les couleurs similaires indiquent les EEQ appariés deux à deux. La valeur rendue VR correspond à la valeur de CoQ₁₀ que nous avons mesurée rétrospectivement sur les EEQ.

Une note est attribuée en fonction de la valeur du z-score (Figure 42) :

- Si $|z\text{-score}| \leq 1,00$: note A = réponse attendue
- Si $1,00 < |z\text{-score}| \leq 2,00$: note B = réponse acceptable. Les notes A et B correspondent à un **résultat conforme**.
- Si $2,00 < |z\text{-score}| \leq 3,00$: note C. Elle correspond à un **résultat à surveiller**, notamment par rapport aux résultats des EEQ précédents et ultérieurs, afin d'identifier une éventuelle dérive et mettre en place une action corrective.
- Si $|z\text{-score}| > 3,00$: note D. Elle correspond à un **résultat non conforme** et doit faire l'objet d'une enquête approfondie.

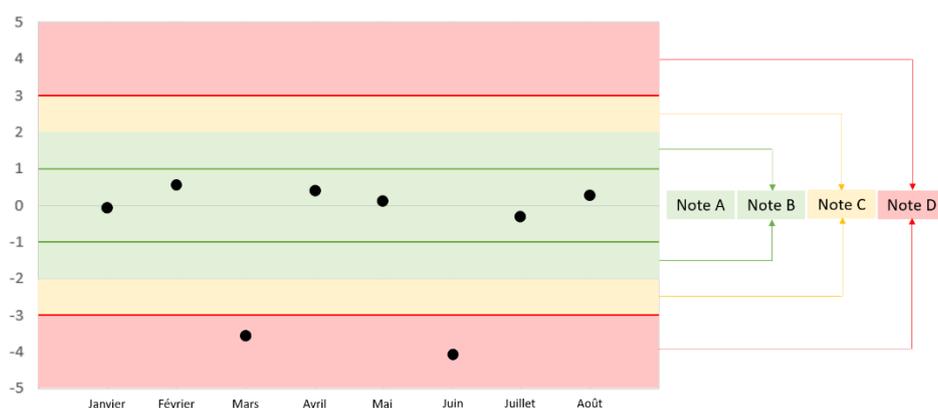


Figure 42. Valeurs des z-score obtenus pour les échantillons d'EEQ du programme ERNDIM pour l'année 2020.

Ces données montrent que nos résultats sont conformes et correspondent à la réponse attendue ($|z\text{-score}| \leq 1,00$) pour tous les EEQ, sauf pour les échantillons de Mars et Juin pour lesquels nous obtenons une valeur de CoQ_{10} deux fois moins importante. Cependant, bien que biaisées d'environ -50%, nous obtenons des valeurs cohérentes entre elles car les échantillons de Mars et Juin sont identiques. Une ré-analyse de ces échantillons n'a pas permis de corriger ce biais puisque nous avons obtenu des résultats identiques au premier dosage (0,17 vs. 0,16 $\mu\text{mol/L}$ pour Mars et 0,14 vs. 0,15 $\mu\text{mol/L}$ pour Juin). Il est peu probable qu'il s'agisse d'un problème de préparation des EEQ car les résultats des autres analytes sur ces échantillons sont conformes. Nous avons émis l'hypothèse d'un défaut d'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone dans ces échantillons malgré le traitement analytique, qui pourrait entraîner une sous-estimation du CoQ_{10} total. Nous avons donc procédé à une oxydation préalable des échantillons par le CuCl_2 (voir page 85), sans pour autant observer d'augmentation du CoQ_{10} dosé. A ce jour, ces deux résultats restent inexplicables. Cependant, compte tenu de l'incertitude de la mesure (voir paragraphe suivant page 97) et de nos valeurs de référence du CoQ_{10} plasmatique (voir chapitre suivant page 103), ces résultats n'ont pas d'impact sur la décision clinique et classent ces deux échantillons comme déficitaires en CoQ_{10} .

Les données obtenues auprès des autres laboratoires mettent également en évidence une grande disparité des résultats selon les échantillons et selon les techniques analytiques utilisées. En effet, parmi les 10 laboratoires participants, 3 utilisent une technique de détection UV, 5 une technique de détection électrochimique et 2 une technique de détection par spectrométrie de masse en tandem. Les résultats obtenus pour les différents EEQ en fonction de la méthode analytique utilisée sont indiqués dans la Figure 43. Tous nos résultats, exceptés ceux de Mars et Juin, sont

compris entre -0,5 et 0,5SD. Globalement, les résultats obtenus par HPLC-MS/MS apparaissent meilleurs que ceux obtenus par détection électrochimique, qui semblent eux-mêmes meilleurs que la détection UV. Ceci est en accord avec les performances accrues des techniques de spectrométrie de masse en termes de sensibilité et de spécificité.

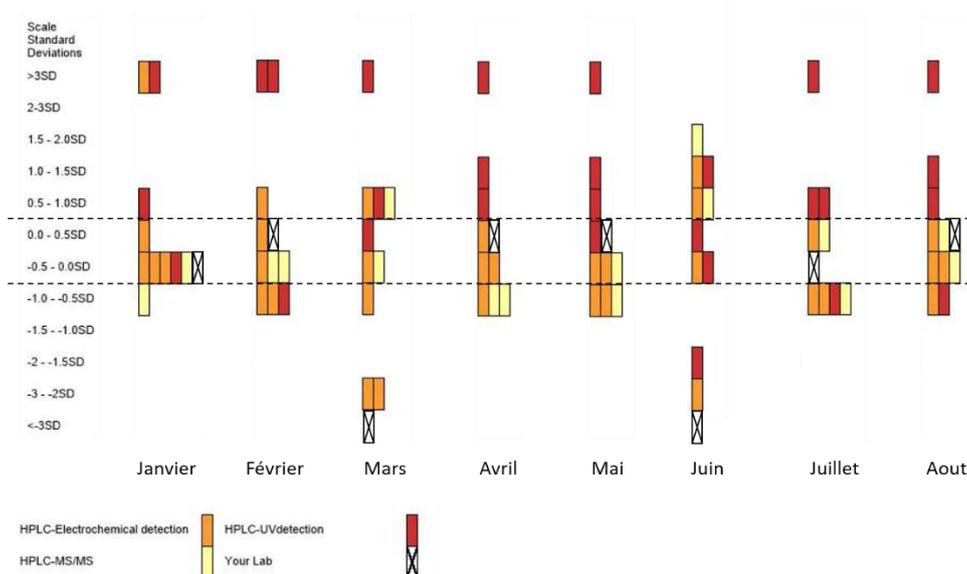


Figure 43. Résultats d'EEQ rendus par les 10 laboratoires en fonction de la méthode analytique utilisée. Orange : détection électrochimique, rouge : détection UV ; jaune : spectrométrie de masse ; blanc avec une croix : notre résultat.

8. Incertitude

En utilisant la méthode de calcul de l'incertitude basée sur l'exploitation des résultats des CIQ et des EEQ plasmatiques, telle que décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes » (page 75), on obtient les valeurs d'incertitude $U(\text{CoQ}_{10})$ indiquées dans le Tableau 22. Pour le pool de CIQ bas, nous observons un pourcentage d'incertitude très élevé lié à la faible concentration de CoQ_{10} mesurée. A noter que ces incertitudes ont été calculées à partir des 8 valeurs d'EEQ dont nous disposons (2 valeurs pour les pools bas et haut, 4 valeurs pour le pool normal) et qu'elles seront mises à jour avec les prochaines séries d'EEQ que nous analyserons.

Pool de CIQ	Concentration en CoQ_{10} ($\mu\text{mol/L}$)	$U(\text{CoQ}_{10})$ ($\mu\text{mol/L}$)	$U(\text{CoQ}_{10})$ (%)
Bas	0,14	0,10	71,2%
Normal	1,02	0,17	16,2%
Haut	2,40	0,24	9,8%

Tableau 22. Incertitudes sur la mesure du CoQ_{10} plasmatique en fonction de la concentration en CoQ_{10} des CIQ.

9. Robustesse de la méthode

a) Matrices acceptables

Nous avons analysé 15 échantillons sanguins recueillis sur 3 types de tubes différents au cours d'une même ponction et nous avons comparé deux à deux les résultats du dosage du CoQ₁₀ obtenu sur plasma hépariné vs. plasma EDTA (Figure 44 A) ou sur sérum (tube sec avec gel) vs. plasma EDTA (Figure 44 B). Bien que les résultats obtenus entre les différentes matrices soient statistiquement significatifs, la différence entre les moyennes est inférieure à l'incertitude de mesure et n'a donc pas d'impact sur la décision clinique liée au résultat. Ceci permet donc d'accepter avec dérogation des échantillons qui ne seraient pas prélevés sur tube EDTA, dans le cas où ceux-ci seraient difficilement renouvelables.

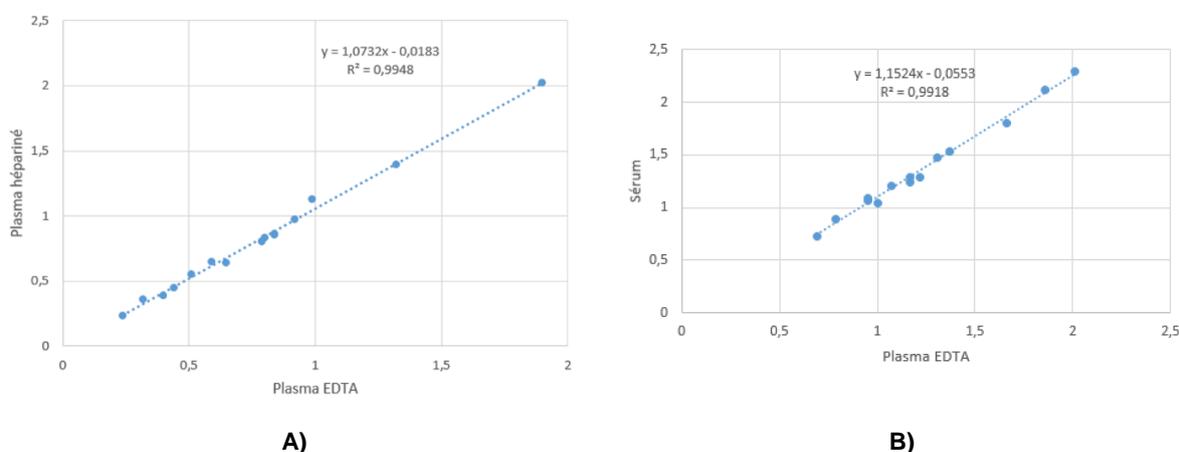


Figure 44. Comparaison du dosage du CoQ₁₀ entre plasma EDTA et plasma hépariné (A) ou plasma EDTA et sérum (B). Résultats obtenus sur une expérience.

b) Paramètres de l'HPLC

Le facteur le plus susceptible d'influer sur les résultats du dosage du CoQ₁₀ en routine est l'usure de la colonne chromatographique. Ceci se traduit par un élargissement de la base des pics chromatographiques qui perdent leur profil gaussien, ce qui peut gêner leur intégration et la quantification des composés. Ceci est particulièrement vrai lorsque plusieurs analytes sont analysés sur la même colonne et qu'il est important d'obtenir des pics fins et parfaitement séparés pour quantifier correctement chacun des composés. La Figure 45 représente des chromatogrammes obtenus sur une colonne neuve (A) ou sur une colonne usagée (B). Dans le cas du dosage du CoQ₁₀, l'élargissement des pics chromatographiques n'a pas d'influence sur la quantification du composé car il n'y a pas d'interférence avec d'autres pics. Il est donc possible de doser correctement le CoQ₁₀ même sur des colonnes ayant plusieurs

mois d'utilisation. Une usure excessive de la colonne se manifeste par une dérive des CIQ.

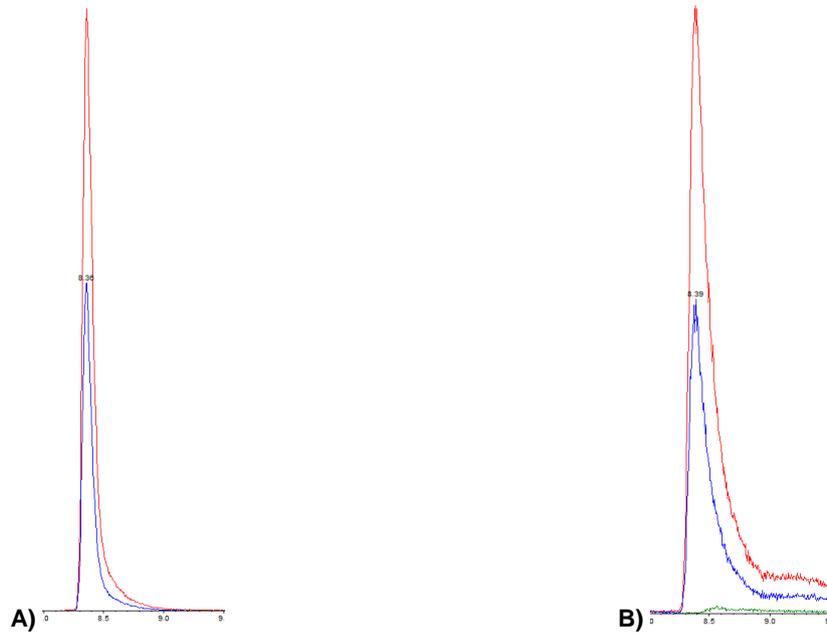


Figure 45. Influence de l'usure de la colonne sur l'élargissement des pics chromatographiques.
A) Colonne neuve. B) Colonne usagée.

RESULTATS – APPLICATIONS CLINIQUES

I. Dosage du CoQ₁₀ plasmatique dans l'infarctus du myocarde

Dans une première application clinique, nous avons cherché à déterminer si le CoQ₁₀ plasmatique pouvait être un facteur pronostic du remodelage ventriculaire gauche après un syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST (STEMI).

1. Contexte : infarctus du myocarde et remodelage ventriculaire

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans tous les pays industrialisés. L'infarctus du myocarde (IDM) résulte de l'obstruction des artères coronaires et conduit à la nécrose d'une partie plus ou moins étendue du muscle cardiaque. En France, environ 120 000 personnes sont touchées par un IDM chaque année ; 10% en décèdent lors de la crise. L'IDM s'accompagne d'une morbi-mortalité importante : chez les patients pris en charge, environ 10% décèdent dans le premier mois et 20% au cours de la première année.^{202,203} L'amélioration de la prise en charge immédiate et des thérapies secondaires ont considérablement réduit la mortalité à court terme. Paradoxalement, les patients qui survivent peuvent développer un remodelage ventriculaire gauche (RVG) délétère et présentent un risque accru d'insuffisance cardiaque, de complications et d'hospitalisations fréquentes.^{204,205}

Le RVG se définit comme l'ensemble des modifications moléculaires, cellulaires et histologiques conduisant à une altération de l'architecture ventriculaire, avec augmentation du volume et perte de la forme conique normale du ventricule qui devient progressivement circulaire. Le RVG est un phénomène dynamique, multifactoriel et temps-dépendant qui résulte de facteurs mécaniques, neuro-hormonaux, inflammatoires et métaboliques.²⁰⁶ La prédiction du RVG post-infarctus reste un challenge diagnostique. L'imagerie cardiaque est actuellement la méthode de référence d'évaluation de la fonction cardiaque mais implique un suivi régulier des patients et ne permet pas une détection précoce des anomalies. Plusieurs marqueurs biologiques ont été étudiés pour prédire le risque de RVG, parmi lesquels les peptides natriurétiques (ANP, BNP, NT-pro-BNP) et des marqueurs de fibrose (procollagène, métalloprotéases matricielles) ou de l'inflammation (SST2, Galectin-3).²⁰⁷ A ce jour, il n'existe cependant pas de marqueur spécifique pouvant être utilisé en pratique

clinique pour le dépistage et la prise en charge précoce des patients susceptibles de développer un RVG.²⁰⁸

2. Rôle du CoQ₁₀ dans l'infarctus du myocarde

La récupération de la fonction cardiaque après revascularisation est étroitement liée à la récupération des fonctions mitochondriales dans les cardiomyocytes.²⁰⁹ Les mitochondries sont des organites très abondants dans ces cellules (jusqu'à 60% du volume cellulaire) où elles génèrent la production d'ATP nécessaire à la contraction cardiaque grâce à la CRmt. Le CoQ₁₀ est ainsi au centre des phénomènes complexes d'ischémie-reperfusion observés au décours de l'IDM. Endommagée par l'ischémie, la CRmt n'est pas capable de faire face à l'entrée massive d'oxygène lors de la reperfusion et s'oriente vers la production de ROS qui entraînent une déplétion en CoQ₁₀ post-ischémique par consommation. L'excès de ROS, combiné à une diminution des capacités anti-oxydantes mitochondriales, conduit à une diminution des performances contractiles du myocarde pouvant mener à terme à l'insuffisance cardiaque (Figure 46).^{210,211}

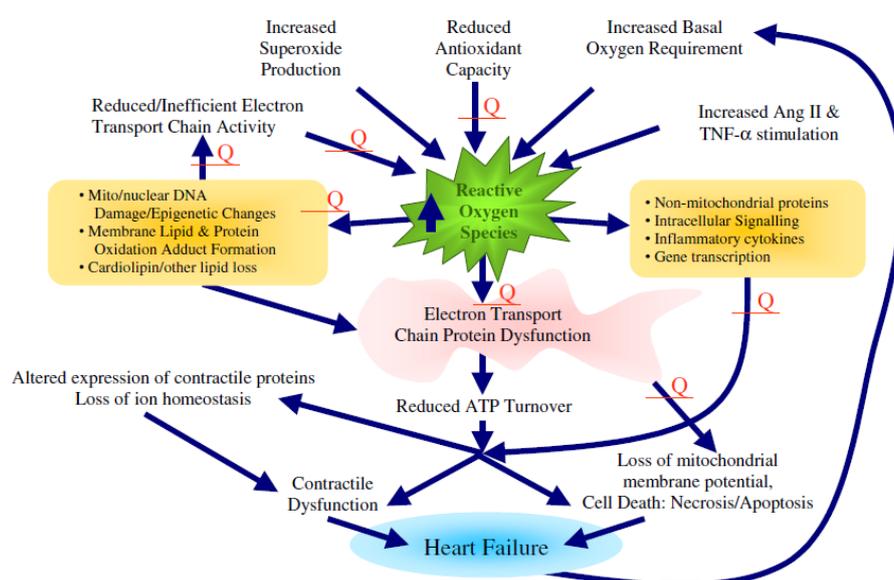


Figure 46. Implications possibles du CoQ₁₀ dans le développement de l'insuffisance cardiaque post-IDM.²¹⁰

Une diminution des taux circulants de CoQ₁₀ est ainsi observée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, d'angor, de cardiopathies ischémiques ou d'hypertension.²¹² De nombreuses études cliniques ont également démontré l'effet bénéfique d'une supplémentation en CoQ₁₀ sur les complications de l'insuffisance

cardiaque : réduction des événements cardiovasculaires majeurs, des hospitalisations et de la mortalité totale et cardiovasculaire.^{213,214}

Si l'intérêt du CoQ₁₀ dans la prise en charge des pathologies cardiovasculaires est bien documenté, peu d'études se sont intéressées au lien entre CoQ₁₀ et infarctus du myocarde. Trois études ont montré l'effet bénéfique d'un pré-traitement par le CoQ₁₀ sur les conséquences d'un IDM expérimental chez le rat : une seule injection intraveineuse de CoQ₁₀ permet de réduire la taille de l'infarctus et de diminuer la fréquence et la durée des arythmies;²¹⁵ une prémédication de 7 jours réduit la taille de l'infarctus, restaure la fonction ventriculaire, diminue les marqueurs de l'inflammation et réduit le stress oxydant.²¹⁶ Le CoQ₁₀ exercerait ces effets en régulant la balance entre antioxydants et pro-oxydants au niveau tissulaire, et en favorisant l'autophagie au détriment de l'apoptose myocardique.²¹⁷ Enfin, à notre connaissance, seules deux études se sont intéressées plus spécifiquement à la fonction ventriculaire gauche chez l'homme : Huang *et al.* ont mis en évidence une liaison positive entre une concentration plasmatique élevée en CoQ₁₀ un mois après l'infarctus et la fonction ventriculaire gauche après angioplastie primaire;²¹⁸ Singh *et al.* ont montré qu'une supplémentation précoce en CoQ₁₀ après un IDM réduit le remodelage ventriculaire gauche.²¹⁹

Ces études suggèrent que le CoQ₁₀ pourrait jouer un rôle important dans le développement du RVG en réduisant le stress oxydant et en optimisant la fonction mitochondriale, mais les données de la littérature sont rares et l'intérêt clinique du taux plasmatique de CoQ₁₀ reste à évaluer.

3. Objectifs de l'étude

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle un taux de CoQ₁₀ plasmatique bas au moment de l'IDM serait un marqueur pronostique d'un remodelage ventriculaire gauche délétère après reperfusion et permettrait d'identifier les patients à haut risque de remodelage. Ces patients pourraient ainsi bénéficier d'un suivi cardiaque renforcé et d'un traitement médicamenteux optimisé afin de limiter les complications et les hospitalisations.

Nous avons réalisé une évaluation rétrospective de 68 patients admis pour un STEMI et revascularisés avec succès après angioplastie primaire. Tous les patients ont bénéficié d'une échocardiographie transthoracique (ETT) 3D lors de l'hospitalisation initiale et 6 mois après le STEMI permettant d'évaluer le remodelage ventriculaire gauche défini par une augmentation de plus de 20 % du volume

télédiastolique entre les deux ETT. Les patients ont également eu un prélèvement sanguin à J0, aliquoté et congelé, sur lequel nous avons dosé rétrospectivement le CoQ₁₀. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la liaison entre le taux de CoQ₁₀ à J0 du STEMI et le remodelage ventriculaire gauche à 6 mois de l'infarctus.

Ces travaux ont bénéficié d'un financement par la Délégation à la Recherche et à l'Innovation (DRCI) du CHU de Caen dans le cadre de l'Appel à Projets de Recherche Interne (APRI) 2020. Ils ont été publiés dans *Annals of Clinical Biochemistry* en mars 2021 sous le titre « Is plasma concentration of coenzyme Q₁₀ a predictive marker for left ventricular remodelling after revascularization for ST-segment elevation myocardial infarction? » (voir publication en Annexe).²²⁰

4. Conclusion

Sur les 68 patients inclus dans l'étude, 19 (28%) ont développé un RVG délétère, ce qui est comparable aux données de la littérature qui rapportent le développement d'un RVG chez environ 30% des patients. Cette étude ne nous a cependant pas permis de mettre en évidence de corrélation entre le CoQ₁₀ plasmatique au moment de l'IDM et le RVG à 6 mois, la concentration moyenne de CoQ₁₀ dans le groupe « RVG » étant de $1,23 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ contre $1,20 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe « sans RVG ». L'hypothèse la plus probable est que les concentrations plasmatiques en CoQ₁₀ ne sont pas un bon reflet des concentrations tissulaires, en particulier au niveau des cardiomyocytes, et qu'une corrélation entre les taux plasmatiques et cardiaques ne s'observerait qu'en cas de déficit tissulaire important en CoQ₁₀. Pour tous les patients de la cohorte, nous avons en effet obtenu des valeurs de CoQ₁₀ plasmatiques comparables à celles obtenues dans la littérature, ce qui permettait d'exclure un déficit sévère en CoQ₁₀. Enfin, nous n'avons évalué les concentrations en CoQ₁₀ qu'à J0 du STEMI. Il est donc possible que nous n'ayons pas mis en évidence de taux circulants de CoQ₁₀ plus bas avant remodelage cardiaque, car la diminution du CoQ₁₀ résulterait de mécanismes compensatoires qui s'installeraient progressivement après l'apparition du STEMI.

5. Détermination de valeurs de référence du CoQ₁₀ plasmatique

Bien que cette étude ne nous ait pas permis d'identifier le CoQ₁₀ comme marqueur pronostic du RVG, elle nous a néanmoins permis de constituer une cohorte

de 79 patients pour la détermination de valeurs de référence du CoQ₁₀ plasmatique. Nous y avons inclus les 68 patients de la cohorte RESIST pour lesquels aucune différence significative des taux de CoQ₁₀ entre les groupes « RVG » et « sans RVG » n'a été mise en évidence. Nous y avons également inclus 11 patients pour lesquels nous avons reçu simultanément au laboratoire une biopsie musculaire et un prélèvement sanguin sur tube EDTA et pour lesquels les résultats enzymatiques et génétiques n'étaient pas en faveur d'une cytopathie mitochondriale.

Le taux de CoQ₁₀ plasmatique étant corrélé positivement au taux de cholestérol total (T-CHL) et au taux de cholestérol LDL (LDL-CHL) (voir page 23), nous avons établi des valeurs normales pour le CoQ₁₀ plasmatique mais aussi pour les ratios CoQ₁₀/T-CHL et CoQ₁₀/LDL-CHL. Ceci permet d'identifier un déficit en CoQ₁₀ qui pourrait être masqué par une augmentation artificielle de la concentration plasmatique en CoQ₁₀ en cas d'hypercholestérolémie totale ou LDL importante. Parmi ces 79 patients, 18 patients de la cohorte RESIST étaient traités par Statines au moment de leur hospitalisation et présentaient une concentration en CoQ₁₀ plasmatique sensiblement inférieure aux patients non traités (moyenne 1,06±0,41µmol/L vs. 1,26±0,38µmol/L ; p=0,06). Bien que la différence ne soit pas significative, nous avons choisi de ne pas tenir compte de ces 18 patients pour établir les intervalles de référence. Les valeurs de ces intervalles à 95% sont indiquées dans le Tableau 23.

	N	Moyenne ± écart-type	Valeurs de référence
CoQ₁₀ (µmol/L)	61	1,23 ± 0,40	0,42 – 2,04
CoQ₁₀/T-CHL (µmol/mmol)	46	0,24 ± 0,06	0,12 – 0,35
CoQ₁₀/LDL-CHL (µmol/mmol)	45	0,38 ± 0,10	0,18 – 0,58

Tableau 23. Valeurs de référence déterminées pour le CoQ₁₀ plasmatique et les ratios CoQ₁₀/T-CHL et CoQ₁₀/LDL-CHL.

II. Dosage du CoQ₁₀ dans les pathologies mitochondriales

La seconde application clinique a consisté à mettre en place le dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire en routine au laboratoire, pour aider au diagnostic des cytopathies mitochondriales. Les résultats sont analysés et interprétés en regard des dosages des complexes de la chaîne respiratoire, mais également des données cliniques, anatomopathologiques et moléculaires, lorsqu'elles sont disponibles.

1. Détermination de valeurs de référence du CoQ₁₀ musculaire

Nous avons commencé par sélectionner une cohorte de 46 patients, ayant bénéficié d'une biopsie musculaire dans le cadre d'une suspicion de pathologie mitochondriale, mais pour lesquels nous n'avons retrouvé aucune anomalie de la chaîne respiratoire. D'après les données de la littérature, les concentrations de CoQ₁₀ musculaire (de l'ordre du $\mu\text{mol/L}$) sont généralement rapportées à la quantité de protéines contenues dans l'homogénat musculaire (mg/mL) et les résultats exprimés en pmol/mg de protéines.^{134,221} La quantité de mitochondries pouvant varier d'un patient à l'autre, il est également possible de rapporter les concentrations en CoQ₁₀ musculaire à l'activité mesurée de la citrate synthase (CS), enzyme mitochondriale du cycle de Krebs dont l'activité représente la masse mitochondriale.²²² Dans certaines situations où l'on observe une diminution de l'activité CS, il est important d'utiliser le ratio CoQ₁₀/CS pour différencier un vrai déficit en CoQ₁₀ d'un déficit artificiel lié à une réduction de la masse mitochondriale.¹³⁹ Nous avons donc choisi d'exprimer les concentrations de CoQ₁₀ musculaire à la fois par rapport aux protéines et à la CS (Tableau 24).

	Moyenne \pm écart-type	Valeurs de référence	Méthode de détermination
CoQ₁₀ (pmol/mg de protéines)	662 \pm 301	169-1277	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 46 patients adultes sans anomalie de la CRmt
CoQ₁₀/CS (min.mg.L^{-1})	10,92 \pm 5,86	3,06 – 35,95	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 41 patients adultes sans anomalie de la CRmt

Tableau 24. Valeurs de référence déterminées pour le CoQ₁₀ musculaire rapporté au taux de protéines ou à l'activité de la citrate synthase (CS).

2. Un déficit en CoQ₁₀ lié à une variation du gène COQ8A

Le premier cas clinique concerne Monsieur S., né en 1994, hospitalisé plusieurs fois en 2018 pour état de mal épileptique réfractaire aux traitements. Ses antécédents personnels sont sans particularité jusqu'à l'âge de 7 ans. Il est né par voie basse sans complication à 38SA, à l'issue d'une grossesse normale (poids : 3,610kg, taille : 50cm, PC : 35,5cm, APGAR 9-10), avec une bonne adaptation à la vie extra-utérine. Les échographies anténatales étaient normales. Il a acquis la position assise à 9 mois, a marché à 15 mois, a dit ses premiers mots à 18 mois. La scolarité a été normale jusqu'à l'entrée en CE1 où sont apparues des difficultés cognitives (lenteur à la réalisation des exercices et difficultés de compréhension), concomitantes à l'apparition des 1^{ères}

manifestations cliniques : fixité du regard, absence de réponse aux ordres simples, hypertonie des 4 membres accompagnée de clonies des 2 yeux, motivant la mise en place d'un traitement par Acide Valproïque. Par la suite, le patient va présenter chaque année 1 à 2 crises tonico-cloniques généralisées, nocturnes, sans facteur déclenchant évident identifié, avec vomissements fréquents au cours des crises. Les difficultés cognitives ont continué avec un redoublement en primaire, un arrêt de la scolarité en 4^{ème} et une orientation en CAP. Il a ensuite été orienté vers un SAMSAH (Service d'Accompagnement Médico-Social pour Adultes Handicapés) puis a travaillé en ESAT (Établissement et Service d'Aide par le Travail).

Entre mars et juin 2018 (le patient a alors 24 ans), Monsieur S. va présenter plusieurs états de mal épileptique nécessitant des hospitalisations en réanimation et compliqués d'une neuropathie optique bilatérale, soulevant l'hypothèse d'une maladie métabolique. La mise en place d'un régime cétogène a permis une sortie de l'état de mal. Les explorations du métabolisme intermédiaire (points redox, chromatographies des acides aminés, des acides organiques, profil des acylcarnitines, homocystéinémie) et des maladies peroxysomales sont revenues négatives. L'analyse de la biopsie musculaire ainsi que la recherche des mutations MELAS et MERFF étaient également normales. En revanche, le séquençage de l'exome en trio a permis d'identifier les variants **c.1019C>G p.(Ser340Cys)**, hérité de la mère, et **c.1042C>T p.(Arg348*)**, hérité du père, dans le gène **COQ8A** (NM_020247.4), à l'état hétérozygote composite. Le variant C.1042C>T est connu pour être pathogène et référencé dans la base de données ClinVar* (RCV000416404.1). Il entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré et l'absence complète de la protéine COQ8A par dégradation des ARNm.²²³ La variation c.1019C>G n'est pas décrite dans la littérature, elle est considérée comme « vraisemblablement pathogène » par l'outil d'aide à l'interprétation des variants Varsome,²²⁴ sur la base des arguments suivants :

- Elle touche le site de liaison au substrat de la protéine COQ8A, dans lequel 12 variants ont été décrits, dont 10 sont pathogènes ;
- Elle est non référencée dans la base de données GnomAD.²²⁵ Il s'agit d'une base de données de populations contrôles incluant les données génomiques de sujets non apparentés issus de diverses études populationnelles ou spécifiques de certaines maladies. Elle contient actuellement le séquençage de 125748 exomes et 15708

* ClinVar est une ressource publique développée par le NIH Center for Biotechnology Information qui contient l'information sur des mutations génétiques des maladies rares provenant de dizaines de bases de données.

génomés. Elle permet de déterminer la fréquence allélique d'un variant dans la population générale. Le caractère pathogène d'un variant diminue avec l'augmentation de sa fréquence allélique ; inversement, l'association d'une clinique évocatrice avec un variant non retrouvé dans la population générale est en faveur du caractère pathogène de ce variant ;

- Elle touche un acide aminé très conservé de la protéine ;
- Elle est considérée pathogène par les logiciels de prédiction *in silico*.

En décembre 2018, le patient est alors hospitalisé pour bénéficier de la mise en place d'un traitement expérimental par CoQ₁₀, sous la forme galénique QuinoMit Q10® fluid dont la présentation liposomale améliorerait la biodisponibilité de la molécule, avec une absorption directe par la muqueuse buccale. Cliniquement, les myoclonies sont stables, le patient se plaint de phono-photophobie. On note l'apparition d'un syndrome cérébelleux statique et cinétique d'aggravation rapide, ainsi que des troubles du comportement (désinhibition et agressivité) attribués à la prise de Pérampanel (anti-épileptique). Pendant l'année 2019, Monsieur S. va présenter quelques crises partielles complexes secondairement généralisées dans un contexte de sevrage du Pérampanel. Sur le contrôle des myoclonies, la supplémentation en CoQ₁₀ a été suivie d'une bonne amélioration, avec un passage du score UMRS (*Unified Myoclonus Rating Scale*) de 74/357 en mars 2019, à 58 en octobre 2019 et 21 en juin 2020. Depuis le printemps 2020, l'évolution globale du patient est très favorable avec une absence de récurrence de crises épileptiques, une quasi-disparition des myoclonies et une diminution des plaintes visuelles. La dernière crise généralisée remonte à avril 2020, liée à un oubli du traitement. A la dernière consultation en février 2021, il existe en revanche une progression de l'ataxie cérébelleuse avec un score SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) à 12/40 contre 9/40 en juin 2020. Il est actuellement traité par anti-épileptiques (Topiramate, Lévétiracétam et Acide Valproïque), anxiolytiques (Clobazam et Clonazépam), régime cétogène 4/1 et CoQ₁₀.

Les variants bialléliques dans le gène *COQ8A* sont responsables du déficit en CoQ₁₀ de type 4, ou ataxie spinocérébelleuse autosomique récessive de type 9 (OMIM 612016). Bien que le résultat de l'exome du patient soit très en faveur d'une pathologie récessive liée au gène *COQ8A*, le caractère pathogène de l'association de ces deux variants n'a pu être démontré à l'époque par des études fonctionnelles. Rétrospectivement, nous avons pu confirmer le déficit musculaire en CoQ₁₀ sur la

biopsie prélevée en juin 2018 avant traitement par QuinoMit Q10®, avec une valeur de 152pmol/mg (valeurs de référence : 169-1277pmol/mg) rapportée au taux de protéines ; la valeur de la Citrate Synthase n'a pu être déterminée par manque de matériel biologique. Concernant le dosage plasmatique, il n'y avait pas de déficit avant traitement (2,31µmol/L - valeurs de référence : 0,42-2,04µmol/L) et la valeur obtenue 20 mois après la mise en place du traitement (5,98µmol/L) témoigne d'une bonne absorption plasmatique de la molécule. L'évolution clinique favorable du patient semble également indiquer une certaine absorption tissulaire.

3. Un déficit en CoQ₁₀ lié à une variation du gène **COQ9**

Le second cas clinique que nous décrivons concerne un frère et une sœur, nés en 2000 et 2003 de parents cousins germains, et atteints de paraparésie spastique (trouble entraînant une faiblesse et une rigidité musculaire des membres inférieurs, avec marche spastique et saccadée). Le garçon a acquis la marche à l'âge de 16 mois puis a présenté une régression clinique, nécessitant un appareil d'aide à la marche dès l'âge de 3 ans. Sa sœur a présenté le même tableau clinique, avec l'acquisition de la marche à l'âge de 4 ans, d'emblée avec l'aide d'un dispositif médical. Les deux enfants présentaient un syndrome pyramidal avec réflexes vifs des membres inférieurs. Il n'a pas été observé de dysmorphie faciale, ni d'atteinte cardiaque ou rénale associée. Tous deux ont nécessité l'usage d'un fauteuil roulant à l'âge de 10 ans après une aggravation progressive des symptômes cliniques au cours de l'enfance. La mesure des potentiels évoqués moteurs a confirmé la présence d'un syndrome pyramidal sévère. En revanche, les IRM cérébrales et médullaires, ainsi que l'électroneuromyogramme, étaient normales. Aucun trouble cognitif n'a été rapporté.

Récemment, le séquençage complet de l'exome a révélé la présence de la variation **c.73G>A p.(Val25Met)** dans le gène **COQ9** (NM_020312.3), présente à l'état homozygote chez les deux patients. Les variants bialléliques dans le gène **COQ9** sont responsables du déficit en CoQ₁₀ de type 5 (OMIM 614654). Cette variation est considérée comme « vraisemblablement pathogène » sur Varsome. Elle est non référencée dans la base de données GnomAD et elle touche le dernier nucléotide de l'exon 1, juste avant le site donneur d'épissage, ce qui est susceptible d'altérer l'épissage du pré-ARNm en ARNm mature. L'analyse des ARNm extraits de différents tissus des patients (lignée lymphoblastoïde, myoblastes, fibroblastes et homogénat musculaire) et marqués par des amorces fluorescentes situées dans l'exon 1 et dans

les exons 3/4, a en effet montré la présence du transcrit attendu c.73G>A ainsi que la présence de 3 transcrits additionnels de taille supérieure à celle de l'amplicon attendu. Ces 3 transcrits ne sont pas présents chez des patients contrôles, confirmant l'effet du variant sur l'épissage (Figure 47).

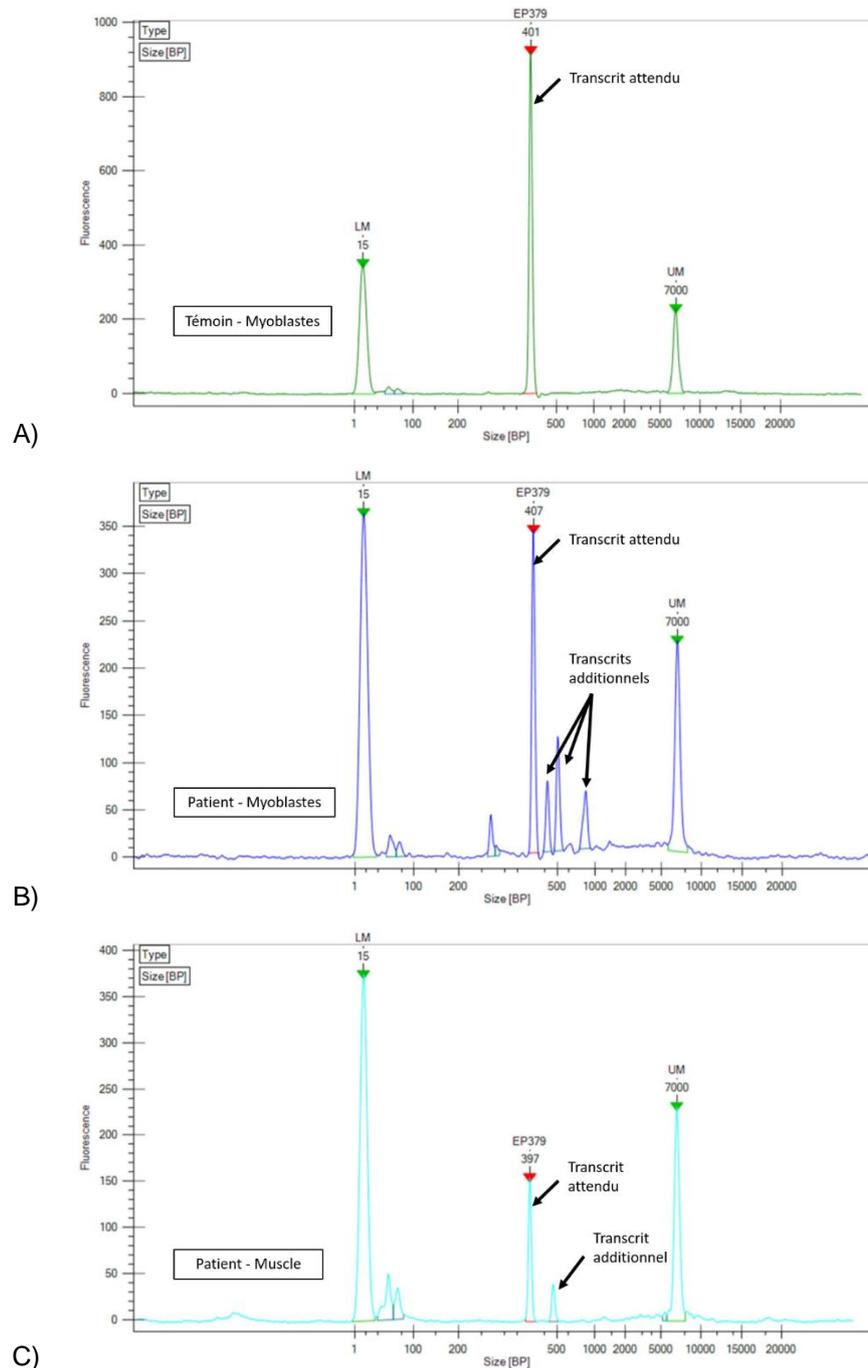


Figure 47. Analyse des différents ARNm du gène COQ9 marqués par sondes fluorescentes, extraits de différents tissus : A) myoblastes d'un patient témoin, B) myoblastes du patient atteint, C) muscle du patient atteint. L'axe des abscisses représente la taille des ARNm en paires de base (BP). L'axe des ordonnées correspond à l'intensité de la fluorescence des sondes.

Les proportions approximatives du transcrit attendu et du transcrit majoritaire additionnel dans les différents tissus sont indiquées dans le Tableau 25. Le

séquençage du transcrit additionnel majoritaire a révélé la rétention de 113bp de l'intron 1 du gène *COQ9*, entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré générant théoriquement une protéine tronquée de 81 acides aminés (AA). Chez les patients, il y aurait donc présence concomitante d'une protéine totale de 318AA dont la Valine en position 25 est remplacée par une Méthionine, et d'une protéine tronquée de 81AA.

Tissus	Transcrit attendu (%)	Transcrit additionnel majoritaire (%)
Lymphoblastes	10%	60%
Fibroblastes	50%	20-30%
Myoblastes	50%	10-20%
Homogénat musculaire	60-70%	10%

Tableau 25. Proportions approximatives (en pourcentage) du transcrit attendu et du transcrit additionnel majoritaire dans différents tissus. Résultats obtenus sur 2 expériences.

En janvier 2021, le frère aîné a bénéficié d'une biopsie musculaire au niveau du deltoïde gauche. Les analyses histologiques et histoenzymologiques n'ont révélé aucune anomalie particulière. Les activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire, mesurées sur la biopsie musculaire, sont indiquées dans le Tableau 26. On retrouve un déficit partiel des complexes I+III et II+III, avec des activités normales des autres complexes, corrigé par l'ajout de CoQ₁₀.

Complexe mesuré	Rapport d'activité (%)	Valeurs usuelles (%)
Complexe I / CS	26,9	21-50
Complexe I+III / CS	6,3	7-44
Complexe I+III / CS + CoQ ₁₀	30	7-44
Complexe II / CS	32,5	27-64
Complexe II+III / CS	21,3	26-66
Complexe II+III / CS + CoQ ₁₀	140	26-66
Complexe III / CS	106	53-142
Complexe IV / CS	127,1	68-176
Complexe V / CS	59,3	62-149

Tableau 26. Mesure des activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la Citrate Synthase.

Ces résultats, fortement évocateurs d'un déficit musculaire en CoQ₁₀, ont été confirmés par le dosage du CoQ₁₀, pour lequel nous avons retrouvé une valeur de 81pmol/mg (valeurs de référence : 169-1277pmol/mg) rapportée au taux de protéines,

et une valeur de $2,61 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (valeurs de référence : $3,06\text{-}35,95 \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) rapportée à la CS. Le dosage du CoQ₁₀ plasmatique n'a pas pu être réalisé chez le frère, en raison d'un problème de réception du prélèvement, mais un déficit a pu être objectivé chez la sœur, avec un taux à $0,27 \mu\text{mol/L}$ (valeurs de référence : $0,42\text{-}2,04 \mu\text{mol/L}$).

La fonction précise de la protéine COQ9 dans la biosynthèse du CoQ₁₀ n'est pas encore complètement élucidée (voir page e)32). Il s'agit d'une protéine régulatrice intervenant dans la formation du complexe Q et qui agirait comme transporteur du CoQ₁₀ grâce à sa poche hydrophobe. Elle interagit également avec COQ7 qui catalyse l'avant-dernière étape de la synthèse du CoQ₁₀ : l'hydroxylation du 6-déméthoxyCoQ₁₀ (6-DMQ₁₀). Danhauser *et al.* ont montré qu'il était possible, en spectrométrie de masse, d'identifier un pic correspondant au 6-DMQ₁₀ chez un patient atteint d'un variant biallélique de COQ9 mais pas chez des patients sains. La présence de ce pic suggère l'accumulation de ce métabolite chez le patient par réduction de l'activité de COQ7.²²⁶ En ajoutant la transition correspondant à la fragmentation du 6-DMQ₁₀ ($833,4 \rightarrow 167,1$), nous avons également réussi à mettre en évidence cet intermédiaire dans le plasma des patients, alors qu'il est absent dans 10 contrôles plasmatiques et non quantifiable voire absent dans 3 contrôles musculaires (Figure 48).

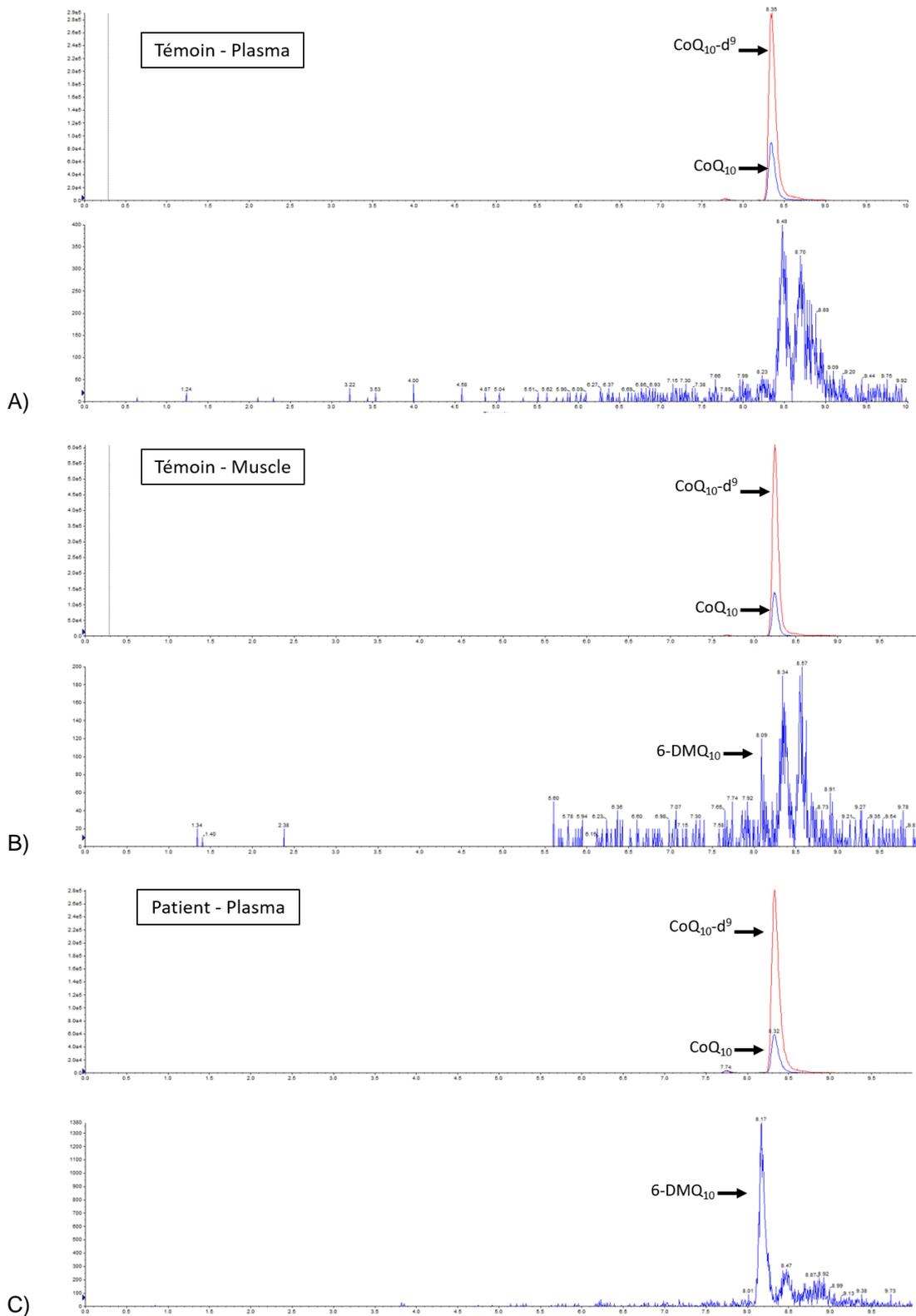


Figure 48. Chromatogrammes obtenus après ajout de la transition correspondant au 6-déméthoxyCoQ₁₀ (6-DMQ₁₀) pour A) un plasma témoin, B) un homogénat musculaire témoin, C) le plasma du patient. Pour chaque condition, le chromatogramme du haut représente le signal obtenu pour la transition du CoQ₁₀ et son étalon interne CoQ₁₀-d⁹ ; le chromatogramme du bas représente le signal obtenu pour la transition du 6-DMQ₁₀. L'axe des abscisses représente le temps d'analyse en minutes et l'axe des ordonnées l'intensité de détection des ions en coups/minute. NB : l'échelle des ordonnées est différente pour les chromatogrammes du 6-DMQ₁₀ : A) jusque 400 coups/minute ; B) jusque 200 coups/minute ; C) jusque 1600 coups/minute.

L'identification de ce déficit plasmatique et musculaire a conduit à la mise en place d'une supplémentation orale en CoQ₁₀ par Ubiten® (200mg *3/jour). Après 6 semaines de traitement, le taux de CoQ₁₀ chez le frère a été mesuré à 2,50µmol/L. Bien que nous n'ayons pu mesurer son taux initial de CoQ₁₀, ce résultat supérieur aux valeurs normales est compatible avec la supplémentation. Les deux patients sont actuellement traités depuis 6 mois. Aucune aggravation ni amélioration de leur état n'a pour l'instant été observée, mais un recul plus important est nécessaire pour espérer observer une stabilisation de leur état.

DISCUSSION

I. Mise au point et validation de la méthode de dosage du CoQ₁₀

Le CoQ₁₀ est un composant liposoluble majeur de la membrane interne mitochondriale où il joue un rôle primordial dans le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire et la production d'ATP cellulaire. Les déficits en CoQ₁₀ regroupent des phénotypes cliniques très différents, pouvant aller d'une myopathie ou d'un syndrome néphrotique isolé à une atteinte multisystémique avec encéphalomyopathie et ataxie cérébelleuse.^{8,118,134,139} La prévalence de ces pathologies reste mal connue et probablement sous-estimée en raison de leur variabilité clinique qui retarde le diagnostic. Pourtant, les déficits en CoQ₁₀ sont les seules pathologies mitochondriales potentiellement traitables par supplémentation orale en CoQ₁₀, avec notamment une amélioration des manifestations neurologiques, rénales et musculaires.^{147,148,149} Des activités enzymatiques réduites des complexes I+III et II+III sont évocatrices d'un déficit primaire en CoQ₁₀ mais seule la mise en évidence d'un déficit dans le muscle ou les fibroblastes permet de confirmer le diagnostic.

Des études cliniques ont également montré le bénéfice d'une supplémentation orale en CoQ₁₀ dans un certain nombre de situations pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II, le syndrome métabolique, les maladies rénales chroniques, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'infertilité masculine...^{135,139,140} L'intérêt clinique du CoQ₁₀ a particulièrement été démontré dans l'insuffisance cardiaque où il permet de réduire la survenue des événements cardio-vasculaires, le nombre d'hospitalisations et la mortalité.^{213,214} Les taux de CoQ₁₀ plasmatique sont généralement corrélés à l'efficacité clinique et leur détermination est nécessaire pour évaluer la biodisponibilité de la molécule.

Dans ce contexte, nous avons mis au point une méthode de dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire à des fins de recherche et dans le cadre du diagnostic des maladies mitochondriales. Le CoQ₁₀ est mesuré par une technique d'HPLC-MS/MS après précipitation protéique et extraction par un solvant organique.

Les performances de cette méthode sont conformes aux exigences de la norme ISO 15189 avec les limites de conformité définies par la FDA en 2018 pour les

techniques séparatives. Elles sont également comparables aux performances de différentes méthodes analytiques décrites dans la littérature, notamment en ce qui concerne la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la limite de quantification (Tableau 27). La limite de quantification obtenue de 1,6ng/mL est en particulier compatible avec les valeurs biologiques attendues et l'utilisation clinique que nous souhaitons faire de ce dosage : notre méthode de dosage est ainsi suffisamment sensible pour identifier un déficit, même profond, en CoQ₁₀. Le rendement d'extraction obtenu est satisfaisant et l'effet de matrice négligeable. Ceci est en accord avec les résultats de Paliakov *et al.* qui n'ont pas observé d'effet de matrice entre une gamme réalisée dans l'éthanol ou dans un pool de sérum.¹⁸⁶ Les résultats des tests conduits au cours de la validation de méthode indiquent que cette technique répond aux exigences de qualité nous permettant de l'utiliser en routine au laboratoire.

Dosage plasmatique					
Référence	Technique	Répétabilité CV (%) (concentration en µg/mL)	Reproductibilité CV (%) (concentration en µg/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Notre étude	HPLC-MS/MS	6,03% (0,21) 3,37% (1,17) 1,66 (2,02) n=20	6,36% (0,12) 7,91% (0,88) 7,61% (2,07) n=20	0,88	1,6
Claessens¹⁷⁷	HPLC-MS/MS	7,7% (niveau bas) 6,1% (niveau haut)	13,6% (niveau bas) 10,5% (niveau haut)	1	10
Langendijk¹⁹⁴	HPLC- Coulométrie	3,5% (0,41)	9,5% (0,41)	NR	NR
Paliakov¹⁸⁶	HPLC-UV	1,04% (niveau normal) 5,61% (niveau haut) n=10	1,07% (niveau normal) 5,52% (niveau haut) n=20	8	28
Kaikkonen¹⁹⁶	HPLC- Coulométrie	1,8% (0,70) n=8	5,5% (0,57) n=9	NR	NR
Mosca¹⁸⁴	HPLC- Coulométrie	1,6% (0,894) 5,3% (0,447) 5,7% (0,178) 10,5% (0,036) n=5	2,16% (0,810) n=21		32
Ruiz- Jimenez¹⁶⁸	HPLC-MS/MS	NR	NR	1,69	5,49
Hansen¹⁹¹	HPLC-MS/MS	NR	NR	1	2

Dosage musculaire					
Référence	Technique	Répétabilité CV (%) (concentration en pmol/mg protéines)	Reproductibilité CV (%) (concentration en pmol/mg protéines)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Notre étude	HPLC-MS/MS	3,92% (0,35) 2,21% (0,64) n=10	8,20% (0,39) 6,4% (0,64) n=10	0,88	1,6
Louw²²²	HPLC-MS/MS	1,96% (NR) n=5	2,37% (NR) n=18	NR	NR
Fragaki²²¹	HPLC-MS/MS	5,7% (0,22)	6,3% (0,22)	NR	NR
Pastore²²⁷	HPLC- Coulométrie	1,35% (NR) n=5	8,4% (NR) n=5	NR	1,35
Duberley¹⁶⁶	HPLC-MS/MS	NR	NR	0,17	NR

Tableau 27. Tableau comparatif des performances analytiques de différentes méthodes de dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire décrites dans la littérature. NR : non renseigné, LOD : limite de détection, LOQ : limite de quantification.

Notre étude nous a permis d'établir des intervalles de référence pour les valeurs de CoQ₁₀ plasmatique et musculaire. Le Tableau 28 renseigne les intervalles de références du CoQ₁₀ plasmatique déterminés par d'autres équipes à partir de différentes populations de patients exempts de pathologies mitochondriales ou de volontaires sains. Nous constatons que, malgré des techniques analytiques différentes et des populations d'étude très variables, les intervalles de références sont très semblables.

Référence	Technique	Valeurs obtenues (μ mol/L)	Méthode de détermination
Notre étude	HPLC-MS/MS	0,42-2,04	Intervalle de référence à 95% d'une cohorte de 61 patients adultes
Laboratoires Biomnis²²⁸	HPLC-Coulométrie	0,8-1,6	NR
CHU Liège²²⁹	HPLC-DAD	0,32-1,62	NR
Paliakov¹⁸⁶	HPLC-UV	0,56-3,49	Intervalle de référence à 95% d'une cohorte de 160 patients de plus de 12 ans
		0,32-4,96	Intervalle de référence à 95% d'une cohorte de 120 enfants âgés de 0 à 12 ans
Miles²³⁰	HPLC-Coulométrie	0,50-1,91	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 103 volontaires sains de couleur blanche
		0,73-1,78	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 45 volontaires sains de couleur noire

Montero ²³¹	HPLC-Coulométrie	0,38-1,34	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 83 patients âgés de 8 mois à 22 ans
Kaikkonen ²³²	HPLC-Coulométrie	0,40-1,72	Intervalle de référence à 95% d'une cohorte de 400 volontaires sains hommes
		0,43-1,47	Intervalle de référence à 95% d'une cohorte de 305 volontaires sains femmes

Tableau 28. Tableau comparatif des valeurs de référence du CoQ₁₀ plasmatique décrites dans la littérature. DAD : détecteur à barrette de photodiodes. NR : non renseigné.

Comme attendu, nous avons également retrouvé une corrélation positive entre le taux de CoQ₁₀ et le taux de cholestérol total ($r=0,60$; $p<0,001$) ou de cholestérol LDL ($r=0,59$; $p<0,001$), confirmant les résultats de la littérature (Tableau 29)

Référence	Cholestérol total	Cholestérol LDL	Test statistique
Notre étude	$r=0,60$; $p<0,001$	$r=0,59$; $p<0,001$	Spearman
Niklowitz ²³³	$r=0,57$; $p<1.10^{-7}$	$r=0,54$; $p<0,001$	Spearman
Tomasetti ¹¹	$r=0,63$; $p<0,001$	$r=0,57$; $p<0,001$	NR
Legendijk ¹⁹⁴	$r=0,44$; $p<0,001$	NR	Pearson

Tableau 29. Tableau comparatif des coefficients de corrélation r entre le CoQ₁₀ et le cholestérol total ou LDL décrits dans la littérature. p : valeur de la p -value.

Contrairement aux données de la littérature qui documentent généralement une diminution du taux de CoQ₁₀ avec l'âge, nous n'avons pas retrouvé cette corrélation dans notre étude ($r=-0,22$; $p=0,087$; test de Spearman). Nous n'avons pas non plus mis en évidence de différence significative du taux de CoQ₁₀ en fonction du sexe, avec une moyenne de $1,18\pm 0,42\mu\text{mol/L}$ pour les femmes, contre $1,24\pm 0,40\mu\text{mol/L}$ pour les hommes. Ceci peut s'expliquer par la petite taille de notre cohorte et le faible nombre de femmes (13 contre 48 hommes). Niklowitz *et al.* ont étudié l'influence de l'âge, du sexe et du taux de cholestérol sur les concentrations sériques en CoQ₁₀, dans une grande cohorte européenne de 860 sujets âgés de 18 à 82 ans.²³³ En divisant cette cohorte en 3 groupes d'âge (18-40, 41-60 et 61-82 ans), ils ont observé une relation en « U inversé » entre l'âge et le taux de CoQ₁₀, les concentrations les plus fortes se retrouvant dans le groupe 41-60 ans. Il n'y a pas de différence significative des concentrations en CoQ₁₀ entre les hommes et les femmes ; en revanche, les valeurs de CoQ₁₀ sont significativement plus élevées chez les hommes lorsqu'elles sont rapportées au taux de cholestérol. Dans une autre étude portant sur 148 adultes américains et afro-américains, Miles *et al.* rapportent également des concentrations

moyennes significativement plus élevées (+21,5%) chez les hommes, pour le CoQ₁₀ total et les ratios CoQ₁₀/cholestérol et CoQ₁₀/cholestérol LDL.²³⁰ Kaikkonen *et al.* décrivent les mêmes résultats (+13,3% chez les hommes) dans une population finlandaise de 705 individus.²³² Il serait donc intéressant d'augmenter la taille de notre cohorte, en particulier le nombre de femmes qui sont sous-représentées dans notre étude, afin de mettre en place des valeurs normales selon le sexe si nécessaire.

Il semble également y avoir des différences des taux de CoQ₁₀ en fonction de l'origine ethnique de la population étudiée. Dans l'étude mentionnée précédemment, Miles *et al.* ont observé des valeurs de CoQ₁₀ plasmatiques significativement plus élevées chez les individus noirs afro-américains ($1,25 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$, n=45) par rapport aux individus blancs américains ($1,04 \pm 0,35 \mu\text{mol/L}$, n=103, $p < 0,01$).²³⁰ Dans une autre cohorte incluant 82 indiens d'Asie et 73 chinois, Hughes *et al.* rapportent des différences significatives entre les deux populations chez les hommes (indiens, n=38, $1,27 \mu\text{mol/L}$ vs. chinois, n=39, $1,60 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$), mais pas chez les femmes.²³⁴ Miles *et al.* suggèrent que les habitudes alimentaires pourraient contribuer à ces disparités géographiques. Cependant, les différents intervalles de référence pour ces 4 populations se chevauchent et il ne semble donc pas nécessaire de déterminer des valeurs normales spécifiques à chaque ethnie.

En ce qui concerne la stabilité analytique du CoQ₁₀ total plasmatique, nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature et les essais pratiqués au laboratoire. Nous avons tout d'abord vérifié la stabilité pré-analytique du CoQ₁₀ sur sang total EDTA avant centrifugation : celui-ci est stable au moins 8h à température ambiante et au moins 72h à 4°C. Ceci nous permet de palier au délai d'acheminement qu'il peut y avoir entre le prélèvement du patient et la prise en charge du tube au laboratoire, et de conserver si besoin le prélèvement au réfrigérateur avant de le centrifuger. Dans le plasma, Mosca *et al.* ont montré que le CoQ₁₀ était stable au moins 3 jours, que les échantillons soient conservés à -20°C, à 4°C et même à température ambiante (22°C).¹⁸⁴ Ces résultats sont confirmés par ceux de Paliakov *et al.* qui ont vérifié la stabilité du CoQ₁₀ dans le sérum pendant 2 jours à température ambiante.¹⁸⁶ A plus long terme, Lagendijk *et al.* ont décrit la stabilité du CoQ₁₀ plasmatique à -75°C pendant au moins 50 semaines, ce que nous avons confirmé par l'analyse échelonnée de nos aliquots de CIQ pendant 1 an.¹⁹⁴ Kaikkonen *et al.* ont également montré qu'il n'y avait aucun effet d'une conservation pendant 3 ans à -80°C sur le taux de CoQ₁₀ dans des plasmas EDTA et héparinés.¹⁹⁶ Nous nous sommes fixés une limite de 6

cycles de congélation-décongélation, ce qui nous offre la possibilité de ré-analyser complètement un échantillon en cas de besoin. Ceci est en accord avec les résultats de Kaikkonen *et al.* qui ont montré que le CoQ₁₀ total restait stable jusqu'à au moins 7 cycles de congélation-décongélation, et ceux de Paliakov *et al.* (3 cycles).^{196,186} Nous avons ensuite étudié la stabilité post-analytique du CoQ₁₀ dans les extraits organiques éthanoliques. Ceux-ci sont stables au moins 72h conservés à -20°C, ce qui nous permet de conserver pendant 3 jours les échantillons traités en cas d'indisponibilité de l'appareil d'HPLC-MS/MS. Mosca *et al.* ont quant à eux montré que les extraits organiques repris dans le *n*-propanol étaient stables jusqu'à 3 jours à 22°C.¹⁸⁴ Enfin, il existe peu d'interférences sur le dosage du CoQ₁₀ plasmatique, hormis pour des plasmas très lactescents (triglycérides > 240mg/dL) pour lesquels on observe une surestimation de la concentration en CoQ₁₀. Il est donc préférable d'effectuer le prélèvement à jeun, et sur tube EDTA, même si nous pouvons accepter avec dérogation des prélèvements effectués sur tube sec ou tube hépariné.

Contrairement aux valeurs de CoQ₁₀ plasmatiques, les valeurs normales disponibles dans la littérature pour le dosage musculaire sont assez variables selon les études (Tableau 30). Lorsque le taux de CoQ₁₀ est rapporté au taux de protéines, on peut ainsi identifier trois groupes de valeurs de référence. Sur une cohorte de 48 patients sans anomalie de la chaîne respiratoire, nous obtenons des valeurs normales comprises entre 169 et 1277 pmol/mg de protéines, comparables à celles obtenues par Louw *et al.* avec la même technique analytique (HPLC-MS/MS).²²² Miles *et al.*, Montero *et al.* et Duberley *et al.* décrivent un intervalle de référence plus réduit, entre 110 et 400 pmol/mg de protéines, sur des populations adultes et pédiatriques et en utilisant une détection électrochimique ou la spectrométrie de masse.^{159,166,235} Enfin, Fragaki *et al.* présentent quant à eux des valeurs normales nettement plus basses, entre 17,8 et 22,2 pmol/mg de protéines.²²¹

Ces disparités entre les études suggèrent que le choix de la méthode d'analyse et la population étudiée ne semblent pas être les seuls facteurs à l'origine des différences observées. En particulier, il existe de multiples méthodes de préparation de l'homogénat musculaire à partir d'une biopsie (utilisation d'eau, de solutions salées, d'un tampon phosphate avec ou sans sucrose, EDTA...). Il est donc nécessaire d'établir ses propres valeurs normales pour le dosage du CoQ₁₀ musculaire en fonction de la méthode utilisée. De plus, si nous pouvons doser sans problème un plasma provenant d'un laboratoire extérieur, nous ne pouvons analyser le CoQ₁₀ musculaire

que sur un homogénat préparé dans nos conditions ; les laboratoires doivent donc nous faire parvenir un échantillon de la biopsie d'origine.

Référence	Technique	Valeurs obtenues	Méthode de détermination
Taux de CoQ₁₀ rapporté au taux de protéines (pmol/g de protéines)			
Notre étude	HPLC-MS/MS	169-1277	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 46 patients adultes sans anomalie de la CRmt
Louw²²²	HPLC-MS/MS	213-1387	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 80 patients adultes sans anomalie de la CRmt
Miles¹⁵⁹	HPLC-Coulométrie	107-317	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 20 patients (<16 ans) sans anomalie de la CRmt
Montero²³⁵	HPLC-Coulométrie	121-451	Cohorte de 17 patients contrôles (2-16 ans)
Duberley¹⁶⁶	HPLC-MS/MS	187,3-430,1	Cohorte de 15 patients adultes sans anomalie de la CRmt
University College of London¹³⁴	NR	140-580	NR
Hospital Sant Joan de Déu¹³⁴	NR	110-480	NR
Fragaki²²¹	HPLC-MS/MS	17,8-22,2	NR
Taux de CoQ₁₀ rapporté à la Citrate Synthase			
Notre étude	HPLC-MS/MS	3,06-35,95 (min.mg/L)	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 41 patients adultes sans anomalie de la CRmt
Louw²²²	HPLC-MS/MS	1,71-8,46 (nmol/UCS)	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 80 patients adultes sans anomalie de la CRmt
Yubero¹³⁴	HPLC-Coulométrie	2,68-8,40 (nmol/UCS)	NR
Iktonen²³⁶	HPLC-MS/MS	1,1-2,8 (nmol/UCS)	Dosage sur mitochondries isolées à partir de biopsies musculaires 5 ^{ème} et 95 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 115 patients adultes sans anomalie de la CRmt

Tableau 30. Tableau comparatif des valeurs de référence du CoQ₁₀ musculaire décrites dans la littérature. NR : non renseigné.

Par ailleurs, les concentrations en CoQ₁₀ musculaire peuvent être exprimées en fonction de plusieurs valeurs. Quelques études ont rapporté le taux de CoQ₁₀ à la masse de tissu musculaire utilisée. Cependant, ceci n'apparaît pas judicieux compte tenu de l'hétérogénéité histologique du muscle squelettique. Celui-ci est en effet

composé de différents types de fibres musculaires dont le contenu en CoQ₁₀ est variable. Sacconi *et al.* ont ainsi décrit des valeurs normales de référence différentes selon que la biopsie est issue du muscle deltoïde ou du muscle quadriceps.²³⁷ Les concentrations de CoQ₁₀ musculaire sont donc principalement exprimées en fonction de la quantité de protéines contenues dans l'homogénat musculaire ou l'activité citrate synthase (CS), témoin de la densité mitochondriale de l'homogénat. Louw *et al.* ont montré que des discordances peuvent survenir entre ces deux résultats et recommandent d'utiliser les deux valeurs obtenues pour pouvoir affirmer un déficit. En effet, une diminution ou une augmentation de la masse mitochondriale (objectivées par la valeur de CS) peut artificiellement masquer un déficit en CoQ₁₀, ou au contraire faire conclure à tort à un déficit.²²²

Peu de données sont disponibles concernant l'influence de l'âge, du sexe et de l'ethnie sur le CoQ₁₀ musculaire, ainsi que sa stabilité à la conservation. Louw *et al.* concluent que le taux de CoQ₁₀ n'est pas influencé par l'âge, le sexe ou l'ethnie.²²² Sur des suspensions mitochondriales, Iktonen *et al.* ont observé que la conservation à -20°C entraîne une augmentation de la concentration en CoQ₁₀ de 15-30% la 1^{ère} semaine, puis les concentrations restent stables jusque 4 semaines. Le CoQ₁₀ est stable à la congélation/décongélation (4 cycles) dans les suspensions mitochondriales concentrées (0,25mg/μL) mais pas diluées (0,01mg/μL). A -80°C, les échantillons sont en revanche stables pendant 4,4 ans.²³⁶ L'étude de la stabilité du CoQ₁₀ dans nos homogénats musculaires reste à évaluer.

II. Applications cliniques

La validation des performances analytiques de notre méthode de dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire nous a permis de mettre en place cette analyse en routine au laboratoire de Biochimie du CHU de Caen. Dans le cadre d'un projet de recherche en collaboration avec le service de Cardiologie, nous avons pu mettre en application notre méthode dans l'évaluation du CoQ₁₀ plasmatique comme facteur pronostic du remodelage ventriculaire gauche après un syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST (STEMI). Cette étude ne nous a cependant pas permis de mettre en évidence de corrélation entre le CoQ₁₀ plasmatique au moment de l'IDM et le RVG à 6 mois, la concentration moyenne de CoQ₁₀ dans le groupe

« RVG » étant de $1,23 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ contre $1,20 \pm 0,42 \mu\text{mol/L}$ dans le groupe « sans RVG ». ²²⁰ Ces résultats sont discutés dans la publication disponible en Annexe.

La seconde application clinique concerne le diagnostic des pathologies mitochondriales et le dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire comme outil d'aide à l'identification et/ou à la confirmation d'un déficit en CoQ₁₀.

Dans le premier cas clinique, nous rapportons un patient de 24 ans ayant bénéficié d'un séquençage de l'exome en 2018 pour exploration d'un état de mal épileptique réfractaire aux traitements. L'analyse a identifié les variants **c.1019C>G p.(Ser340Cys)**, hérité de la mère, et **c.1042C>T p.(Arg348*)**, hérité du père, dans le gène *COQ8A* (NM_020247.4), à l'état hétérozygote composite. Les variations bialléliques du gène *COQ8A* sont responsables du déficit en CoQ₁₀ de type 4, ou ataxie spinocérébelleuse autosomique récessive de type 9 (OMIM 612016). Bien que la classification ACMG de ces deux variants (classe 4 – vraisemblablement pathogène et 5 - pathogène) soit très en faveur d'une implication du gène *COQ8A* dans le phénotype du patient, le caractère pathogène de l'association des variants n'avait pu être démontré à l'époque par des études fonctionnelles. Rétrospectivement, nous avons pu confirmer le déficit musculaire en CoQ₁₀ et assurer le suivi thérapeutique de ce patient supplémenté par une forme galénique particulière de CoQ₁₀.

L'étude de la littérature est également en faveur d'une implication du gène *COQ8A* dans le phénotype clinique du patient. Récemment, Träschütz *et al.* ont publié les caractéristiques phénotypiques et moléculaires d'une cohorte multicentrique de 59 patients porteurs de variations bialléliques du gène *COQ8A*. L'**ataxie cérébelleuse** est présente chez 100% des patients et c'est le 1^{er} signe clinique chez 68% des patients, avec un âge médian d'apparition de 7 ans. Les troubles du mouvement hyperkinétiques sont observés chez 41% des patients, incluant des **myoclonies** (30%), des dystonies (28%), des tremblements du chef (22%) et des tremblements posturaux/d'action (20%). Les autres signes cliniques majeurs incluent des **problèmes cognitifs** (49%) associés à un **déficit intellectuel** dans 48% des cas, une **épilepsie** (32%), une intolérance à l'exercice et une faiblesse musculaire (25%), des symptômes neuropsychiatriques à type de dépression, anxiété, troubles psychotiques, **comportement agressif/impulsif** (25%). ²³⁸ Les symptômes surlignés en gras sont présents chez notre patient. Parmi les patients supplémentés en CoQ₁₀, 43% sont considérés comme bon répondeurs, avec une diminution de l'ataxie, des

tremblements, des dystonies, de l'épilepsie et de la faiblesse musculaire, comme observé chez notre patient.

A ce jour, plus de 50 variations du gène *COQ8A* ont été rapportées.²³⁹ La variation non-sens **c.1042C>T p.(Arg348*)** a été décrite pour la première fois en 2010 par Gerards *et al.* à l'état homozygote chez 3 frères issus de parents consanguins et présentant un phénotype d'ataxie cérébelleuse avec déficit intellectuel modéré. Les auteurs l'ont également rapportée chez 1 frère et 1 sœur à l'état hétérozygote composite avec une autre variation non-sens c.1136T>C p.(Leu379*).²⁴⁰ Dans les deux familles, les mutations étaient héritées des parents. Des études fonctionnelles ont montré que ces 2 variations généraient un codon-stop précoce entraînant un phénomène de dégradation des ARNm et une absence complète de la protéine fonctionnelle *COQ8A*. Le rôle exact de cette protéine dans la biosynthèse du *CoQ*₁₀ n'est pas encore complètement élucidé (voir page 32) mais elle intervient dans la formation du complexe Q et recruterait des intermédiaires lipidiques de la synthèse du *CoQ*₁₀. De par son rôle régulateur et la présence d'une autre protéine *COQ8B*, l'absence complète de la protéine *COQ8A* reste cependant compatible avec la survie des patients.

L'organisation de la protéine *COQ8A* a été décrite par Stefely *et al.*²⁴¹ Elle présente à la fois des analogies et des différences structurales avec les protéines kinases. Elle comporte notamment un motif AAAS (acides aminés 337 à 340) dans une région riche en Alanine qui remplace la région riche en Glycine des protéines kinases classiques. Ce domaine AAAS confère une affinité préférentielle de *COQ8A* pour l'ADP plutôt que pour l'ATP. La protéine *COQ8A* adopte ainsi une conformation qui inhibe l'activité kinase. Le remplacement des Alanine 337 et 339 par une Glycine inverse la sélectivité vers l'ATP, confère à nouveau l'activité kinase et entraîne l'autophosphorylation de la protéine *COQ8A*. La structure cristalline de la protéine complexée avec l'adénosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate, un analogue de l'ATP, a pu être résolue par la même équipe.²⁴² Les interactions du ligand avec la protéine dont les liaisons hydrogènes importantes avec les résidus 339 et 340 sont indiquées dans la Figure 49. Chez la levure, *in vivo*, les mutations analogues de l'Alanine 339 en Glycine et de la Sérine 340 en Alanine diminuent la biosynthèse du *CoQ*₆, ce qui souligne l'importance de la conservation de ces 2 résidus pour l'activité de la protéine *COQ8A*. A notre connaissance, la variation faux-sens **c.1019C>G p.(Ser340Cys)** n'est pas décrite dans la littérature. Elle touche cependant la Sérine 340 du motif AAAS ce qui est un argument supplémentaire en faveur de sa pathogénicité.

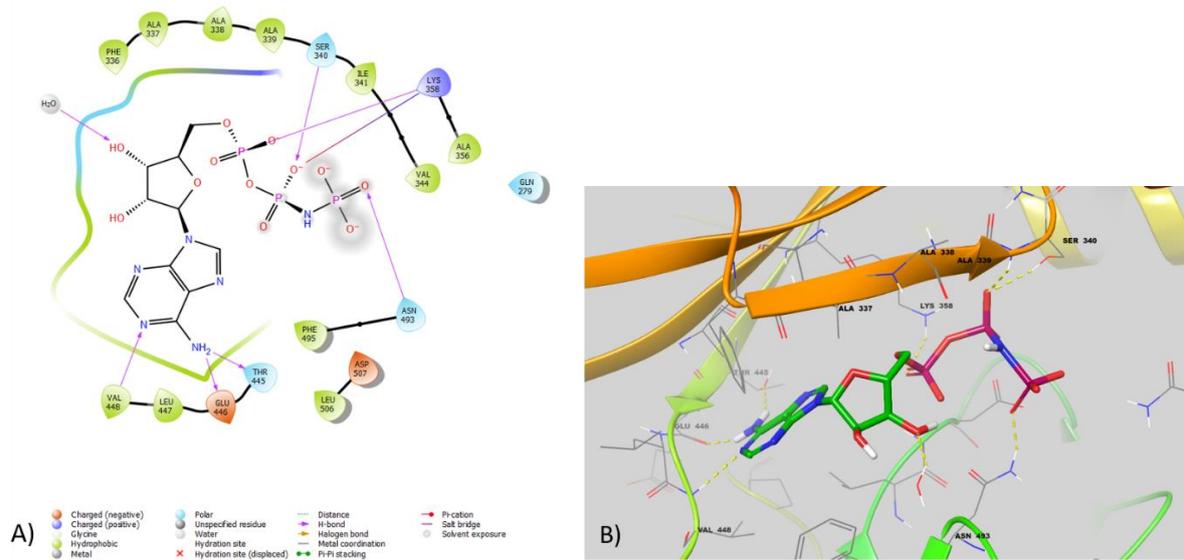


Figure 49. Représentation 2D (A) et 3D (B) des interactions entre l'adénosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate et les principaux acides aminés du site actif de la protéine COQ8A. Illustrations réalisées avec le logiciel Maestro (Schrödinger®).

En ce qui concerne le second cas clinique, les deux patients n'avaient pas de diagnostic définitif jusqu'au séquençage complet de l'exome qui a permis l'identification de la variation **c.73G>A** dans le gène COQ9 à l'état homozygote. Cette altération entraîne à la fois une variation faux-sens **p.(Val25Met)** et une altération de l'épissage, générant théoriquement une protéine COQ9 de taille normale dont la Valine 25 est remplacée par une Méthionine, et une protéine tronquée de 81 acides aminés. Le caractère pathogène de la mutation a pu être confirmé par la mise en évidence d'un déficit des complexes I+III et II+III de la chaîne respiratoire corrigé par l'ajout de CoQ₁₀, ainsi qu'un déficit plasmatique et musculaire en CoQ₁₀ chez les deux patients. Nous avons également montré la présence de l'intermédiaire de synthèse 6-déméthoxyCoQ₁₀ qui signe une diminution de l'activité de la protéine COQ7 liée à une protéine COQ9 moins fonctionnelle.

Les déficits primaires en CoQ₁₀ liés à des variations bi-alléliques du gène COQ9 sont très rares ; à ce jour, seuls 7 cas ont été décrits dans la littérature. En 2009, Duncan *et al.* rapportent le cas d'un nouveau-né (patient A) présentant, dès la 6^{ème} heure de vie, une hypertonie généralisée, un refus d'alimentation et une acidose lactique majeure à 19,4mmol/L (valeurs normales 0,9-1,9 mmol/L). Le patient va ensuite développer plusieurs états de mal épileptiques réfractaires à une quadri-thérapie, conduisant à un sévère retard de développement psychomoteur, une microcéphalie et une dystonie. L'IRM cérébrale montre une atrophie cérébrale et cérébelleuse. On note également une cardiomyopathie (hypertrophie ventriculaire

gauche) et une tubulopathie rénale. La biopsie musculaire, réalisée à l'âge de 10 mois, montre une atrophie des fibres de type IIB (fibres musculaires à contraction rapide), un déficit sévère des complexes II+III avec des activités normales des complexes II et III isolés, un déficit en CoQ₁₀ dans le muscle squelettique (37pmol/mg protéine – moyenne ± SD : 241±95) et sur fibroblastes (25,3 pmol/mg protéine – moyenne ± SD : 62±14), ainsi qu'une diminution de la biosynthèse du CoQ₁₀ dans les fibroblastes. Le séquençage du gène COQ9 a identifié la variation non-sens **c.730C>T p.(Arg244*)** à l'état homozygote. Aucune amélioration clinique n'a été observée après mise en place d'une supplémentation en CoQ₁₀ à la dose de 300mg/j et le patient est décédé à l'âge de 2 ans.²⁴³

Le second cas clinique, rapporté par Danhauser *et al.*, concerne un nouveau-né (patient B) issu de parents consanguins au 1^{er} degré. La grossesse a été normale jusqu'à 27SA avec l'apparition d'un oligohydramnios, nécessitant une césarienne à 36SA. L'enfant était petit pour l'âge gestationnel (poids, taille et PC inférieurs au 3^{ème} percentile), sans traits dysmorphiques. Le score APGAR était à 5/4/6 et très rapidement, le patient a montré une détresse respiratoire, une hypotonie générale, une bradycardie et une cyanose généralisée avec une acidose lactique majeure à 22mmol/L (valeur normale < 1,8mmol/L). L'imagerie cérébrale a révélé la présence d'hypersignaux des ganglions de la base évocateurs d'un syndrome Leigh-like. A 10 jours de vie, l'état général du patient s'est détérioré secondairement à plusieurs crises d'épilepsie, et il est décédé d'un arrêt cardiorespiratoire à l'âge de 18 jours. La mesure des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire sur fibroblastes a révélé un déficit sévère des complexes II+III, et le dosage du CoQ₁₀ a confirmé le déficit (10pmol/mg protéines – valeurs normales 46,5-90,5pmol/mg protéines). Le séquençage de l'exome a permis l'identification de la variation **c.521+1del p.(Ser127_Arg202del)** à l'état homozygote.²²⁶

Smith *et al.* ont ensuite décrit 1 sœur et 3 frères (patients C), issus de parents non consanguins, qui ont présenté, dès la période prénatale, un retard de croissance intra-utérin, un oligohydramnios et des anomalies cardiaques (cardiomégalie, bradycardie) et rénales (reins élargis et kystiques). La 1^{ère} et la 3^{ème} grossesse ont donné naissance à 2 nouveaux-nés souffrant d'hypotonie, d'anémie et d'acidose lactique majeure (29 et 23 mmol/L) conduisant à leur décès à 72h et 12h de vie. La 2^{ème} et la 4^{ème} grossesse ont été interrompues à 28 et 19SA. L'autopsie réalisée sur le 3^{ème} enfant a révélé des anomalies cérébrales évoquant une encéphalopathie nécrosante subaigüe similaire au syndrome de Leigh. Le séquençage de l'exome a

mis en évidence 2 variations du gène *COQ9* à l'état hétérozygote composite : la variation **c.711+3G>C p.(Ala203_Asp237del)** d'origine paternelle et la variation **c.521+2T>C p.(Ser127_Arg202del)** d'origine maternelle.²⁴⁴

Enfin, récemment, Olgac *et al.* ont rapporté le cas d'une petite fille de 9 mois, née à 38SA après une grossesse marquée par un oligohydramnios, et adressée pour retard de croissance, microcéphalie et convulsions. L'examen clinique a révélé une hypotonie tronculaire, de nombreux traits dysmorphiques, des anomalies rénales (hyperéchogénicité, rein droit kystique), une non-compaction du ventricule gauche et une hyperlactatémie à 60mg/dL (valeurs normales : 4,5-19,8mg/dL). L'IRM cérébrale a montré une hypoplasie du vermis du cervelet et du tronc cérébral et une légère atrophie corticale. Une analyse par NGS d'un panel de 450 gènes impliqués dans les maladies héréditaires du métabolisme a identifié la variation **c.384delG p.(Gly129Valfs*17)** à l'état homozygote, les parents étant tous deux porteurs de la variation à l'état hétérozygote. La supplémentation de la patiente en CoQ₁₀ à la posologie de 50mg/kg/j ne semble pas améliorer son état mais elle est toujours en vie à l'âge de 3 ans.²⁴⁵

Tous ces patients présentent donc une forme très sévère (voire létale dans 6 cas sur 7), à révélation prénatale ou néonatale, de déficit en CoQ₁₀ lié à des variations bialléliques du gène *COQ9*. Ils ont en commun un certain nombre de caractéristiques cliniques : oligohydramnios, retard de croissance, acidose lactique majeure, convulsions, anomalies cardiaques et/ou rénales. En revanche, nous avons décrit 2 patients avec une présentation clinique beaucoup plus modérée, limitée à une paraparésie spastique, avec une révélation dans l'enfance et une stabilisation à l'âge adulte.

Une structure de la protéine *COQ9* a été cristallisée par l'équipe de Lohman *et al.* A noter que cette structure est tronquée des 79 premiers acides aminés qui sont peu conservés entre les espèces et qui correspondent à une région non structurée de la protéine.²⁴⁶ Le reste de la structure comporte 10 hélices α qui définissent 3 domaines (Figure 50A) : un domaine hélice-coude-hélice (domaine HTH, hélices α 1-3), un domaine de liaison aux lipides (hélices α 4-9) et une hélice α 10 C-terminale impliquée dans la liaison de la protéine *COQ9* à la membrane interne mitochondriale.²⁴⁷ Le domaine de liaison aux lipides se compose d'une large poche hydrophobe et d'une région très conservée en surface de la protéine permettant l'interaction de la protéine *COQ9* avec la protéine *COQ7* qui catalyse l'hydroxylation

du 6-déméthoxyCoQ₁₀ (6-DMQ₁₀). Dans cette région, le tryptophane 240 jouerait un rôle important dans la stabilisation du noyau benzoquinone du 6-DMQ₁₀ grâce à des interactions de type π - π stacking entre les noyaux aromatiques. Selon ce modèle, le rôle de la protéine COQ9 serait de transporter et de présenter le 6-DMQ₁₀ à la protéine COQ7 (B)

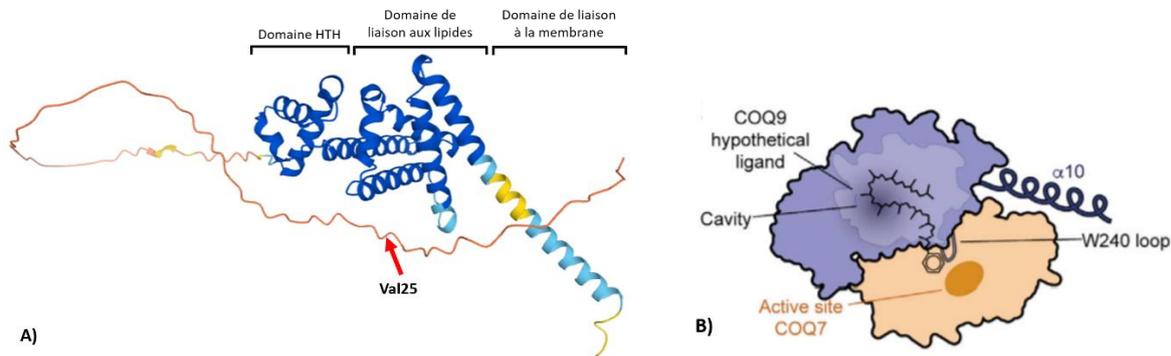


Figure 50. A) Structure tertiaire de la protéine COQ9, localisation des différents domaines et de l'emplacement de la Valine 25. Structure prédite à l'aide du logiciel AlphaFold.²⁴⁸ B) Modèle de liaison des ligands de COQ9 et de l'interaction avec COQ7.²⁴⁷

Des analyses de génétique moléculaire ont permis de caractériser plus précisément les variants du gène COQ9 mentionnés précédemment. La variation non-sens **c.730C>T p.(Arg244*)** est décrite dans la littérature et entraîne le remplacement de l'Arginine 244 (résidu très conservé) par un codon stop précoce, conduisant théoriquement à une protéine tronquée des 75 acides aminés terminaux. En utilisant des amorces situées dans l'exon 1 et dans la région 3'-UTR, l'ADN complémentaire (ADNc) du gène COQ9 a été amplifié avec succès dans des fibroblastes de 3 patients contrôles, mais n'a pu être amplifié dans les fibroblastes du patient A. Ceci suggère fortement l'occurrence d'un phénomène de dégradation des ARN messagers (*nonsense-mediated mRNA decay*) du gène COQ9 chez ce patient.²⁴³ Quinzi *et al.* ont également montré que des fibroblastes porteurs de la variation c.730C>T présentaient des taux de CoQ₁₀ réduits à 18% des valeurs normales, ainsi qu'une diminution de la production d'ATP sans augmentation du stress oxydant, suggérant que la physiopathologie liée à cette variation résultait d'un défaut de production énergétique majeur.¹²⁶

La variation **c.521+1del p.(Ser127_Arg202del)** provoque une altération de l'épissage entraînant la suppression des exons 4 et 5. L'effet attendu sur la protéine COQ9 est une délétion de 76 acides aminés constitutifs de la cavité hydrophobe.²⁴⁶ Plusieurs études fonctionnelles ont permis de confirmer la pathogénicité de ce variant.

L'expression de l'ADNc sauvage du gène *COQ9* dans les fibroblastes du patient B restaure l'activité des complexes II+III et les taux de CoQ₁₀. L'analyse des protéines COQ9 et COQ7 par Western Blot (WB) a révélé l'absence de COQ9 dans les fibroblastes du patient, ainsi qu'une réduction sévère de COQ7. Enfin, une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier la présence du métabolite intermédiaire 6-déméthoxyCoQ₁₀ (6-DMQ₁₀) dans les fibroblastes du patient mais pas dans des fibroblastes contrôles. L'expression de COQ7 et du 6-DMQ₁₀ sont normalisées après transduction par le gène *COQ9*.²²⁶ La variation **c.711+3G>C p.(Ala203_Asp237del)** entraîne également une altération de l'épissage entraînant la suppression de l'exon 6 et touche des acides aminés du site de liaison aux lipides de la protéine. L'analyse par WB de la protéine COQ9 dans les fibroblastes du patient C n'a pas permis de mettre en évidence la protéine tronquée, suggérant une absence de production de la protéine. Les auteurs signalent cependant qu'il est possible que l'anticorps anti-COQ9 utilisé ne soit pas capable de détecter la forme tronquée de la protéine.²⁴⁴ Aucune étude fonctionnelle n'a été décrite pour la variation **c.384delG p.(Gly129Valfs*17)**. Elle est cependant prédite comme pathogène car elle entraîne un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop précoce générant une protéine tronquée du domaine de liaison aux lipides.

Deux modèles de souris porteuses de deux variations homozygotes du gène *COQ9* (*Coq9*^{R239X} – équivalente à la variation *COQ9* p.(Arg244*) et *Coq9*^{Q95X}) ont été développées par Luna-Sanchez *et al.* Comme pour le patient A, les souris *Coq9*^{R239X} développent un phénotype sévère de déficit en CoQ₁₀ caractérisé par une encéphalomyopathie fatale. En revanche, les souris *Coq9*^{Q95X} présentent un phénotype modéré limité à une réduction de la respiration mitochondriale musculaire avec déficit des complexes I+III et développement tardif d'une myopathie.²⁴⁹ Les auteurs ont montré que le phénomène de mRNA decay dépendait du tissu et de la variation étudiée : l'ARNm de *Coq9* est indétectable dans le muscle, le rein et le cerveau des souris *Coq9*^{Q95X} alors qu'il est détectable à hauteur de 15% de la valeur normale dans le cerveau et le rein des souris *Coq9*^{R239X}, mais pas dans le muscle. Ainsi, alors qu'aucune protéine COQ9 n'est observée chez les souris *Coq9*^{Q95X}, il existe une protéine tronquée des 75 acides aminés terminaux chez les souris *Coq9*^{R239X}, ce qui expliquerait pourquoi deux mutations non-sens entraîneraient deux phénotypes différents. Les auteurs ont donc proposé que la présence d'une protéine COQ9 tronquée entraînerait une réduction des taux des protéines COQ7 et COQ5 ainsi qu'une déstabilisation du complexe Q, alors que l'absence complète de la

protéine COQ9 affecterait uniquement les taux de COQ7 et COQ5 sans déstabiliser le complexe Q. Nous envisageons d'étudier l'impact de cette variation sur l'expression des protéines COQ9, COQ7 et COQ5 par Western-Blot.

Dans le cas de nos 2 patients, nous avons montré que la variation **c.73G>A** entraînait d'une part la formation d'une protéine COQ9 mutée **p.(Val25Met)** et d'autre part une protéine tronquée de 81 acides aminés (dont 56 différents de la protéine native). La forme tronquée apparaît très clairement non fonctionnelle car elle supprime tous les domaines importants de la protéine. Il est en revanche plus difficile de conclure formellement sur l'effet du remplacement de la Valine 25 par une Méthionine. Cet acide aminé appartient au domaine non structuré de la protéine. Sa mutation serait donc peu délétère ce qui pourrait expliquer le phénotype moins sévère observé chez nos deux patients.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons mis au point et validé une méthode de dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire par une technique d'HPLC-MS/MS, dans l'objectif principal d'aider au diagnostic des pathologies mitochondriales. Les performances de la méthode sont conformes aux exigences des référentiels ISO 15189 et SH-GTA 04 selon les critères de 2018 de la FDA, ce qui nous permet de l'utiliser en routine au laboratoire de Biochimie du CHU de Caen. La limite de quantification de 1,6ng/mL est en particulier suffisamment basse pour nous permettre d'identifier un déficit en CoQ₁₀ avec une très bonne sensibilité. Des valeurs de référence propres à notre technique ont été définies pour les deux matrices plasmatiques et musculaires et sont comparables aux données de la littérature.

La mise en application de ce dosage nous a permis de confirmer le diagnostic de déficit en CoQ₁₀ et de suivre la supplémentation en ubiquinone chez un patient porteur d'une variation du gène *COQ8A* et dans une fratrie porteuse d'une variation du gène *COQ9*. Notre étude montre l'importance d'inclure la quantification du CoQ₁₀ dans la démarche diagnostique des pathologies mitochondriales : elle complète l'étude enzymatique de la chaîne respiratoire pour l'identification des déficits en CoQ₁₀ et des patients susceptibles de bénéficier d'une supplémentation en ubiquinone.

Suite à ce travail, plusieurs perspectives s'offrent à nous. Nous allons poursuivre la détermination des valeurs normales plasmatiques et musculaires. Il semble en effet important d'élargir la cohorte plasmatique à des contrôles féminins afin de déterminer s'il est nécessaire d'établir des intervalles de référence en fonction du sexe. Il serait également intéressant de recruter des sujets jeunes (<40 ans) qui manquent dans notre étude. Nous allons continuer le dosage rétrospectif et prospectif sur homogénats musculaires dans le but d'affiner les valeurs normales et d'étudier les relations entre les valeurs de CoQ₁₀ musculaires et les résultats enzymologiques, histologiques et génétiques.

Nous envisageons également de valider notre méthode de dosage sur fibroblastes afin de pouvoir proposer une troisième matrice sur laquelle évaluer le taux de CoQ₁₀ dans le cadre du diagnostic des pathologies mitochondriales. Des essais sur quelques lysats cellulaires nous ont permis d'observer des signaux équivalents aux dosages plasmatique et musculaire. Il reste à optimiser la préparation des lysats (choix

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

du tampon de lyse, dilution, interférence avec le dosage des protéines) et à valider la méthode selon les paramètres décrits précédemment dans ce manuscrit.

A plus long terme, compte tenu de l'implication du CoQ₁₀ dans de nombreuses pathologies, nous pourrions envisager de mettre en place le dosage du CoQ₁₀ dans d'autres matrices, comme le LCR ou l'urine. Ceci pourrait avoir un intérêt dans le cadre d'autres projets de recherche en neurologie, néphrologie ou endocrinologie. Enfin, nous avons vu qu'il était possible de préserver la forme réduite ubiquinol sur des prélèvements sanguins analysés immédiatement après prélèvement, en utilisant un protocole d'extraction rapide en une seule étape. Nous pourrions valider ce protocole afin de mesurer les deux formes oxydée et réduite, et de déterminer le ratio ubiquinol/ubiquinone qui est un bon marqueur du stress oxydant.

ANNEXE – PUBLICATION

Is plasma concentration of coenzyme Q10 a predictive marker for left ventricular remodelling after revascularization for ST-segment elevation myocardial infarction?

Fontaine F. *et al. Ann. Clin. Biochem.* **2021**, 58, 327-334.



Better Science, Better Testing, Better Care

Annals of Clinical Biochemistry
0(0) 1–8
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/
00045632211001100
journals.sagepub.com/home/acb
SAGE

Is plasma concentration of coenzyme Q10 a predictive marker for left ventricular remodelling after revascularization for ST-segment elevation myocardial infarction?

Fanny Fontaine¹, Damien Legallois^{2,3}, Christian Créveuil⁴ , Mohamed Chtourou¹, Laurent Coulbault^{1,3}, Paul Milliez^{2,3}, Amir Hodzic⁵, Eric Saloux^{2,3}, Farzin Beygui^{2,3} and Stéphane Allouche^{1,3} 

Abstract

Background: Left ventricular remodelling that frequently occurs after acute myocardial infarction is associated with an increased risk of heart failure and cardiovascular death. Although several risk factors have been identified, there is still no marker in clinical use to predict left ventricular remodelling. Plasma concentration of coenzyme Q10, which plays a key role in mitochondrial energy production and as an antioxidant, seems to be negatively correlated with left ventricular function after acute myocardial infarction.

Objective: The goal of our study was to determine whether the plasma coenzyme Q10 baseline concentrations at time of the ST-elevation myocardial infarction (STEMI) could predict left ventricular remodelling at six months' follow-up.

Methods: Sixty-eight patients who were admitted to hospital for STEMI and successfully revascularized with primary percutaneous coronary intervention were recruited. All patients underwent a 3D-echocardiography examination within the first four days after percutaneous coronary intervention and six months later then divided into two groups based on the presence or not of left ventricular remodelling. Plasma coenzyme Q10 concentration at the time of percutaneous coronary intervention was determined using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Results: While we found similar plasma coenzyme Q10 concentrations compared with other studies, no association was evidenced between coenzyme Q10 concentrations and left ventricular remodelling ($P = 0.89$).

Conclusion: We found no evidence for using plasma coenzyme Q10 concentration as an early prediction marker of left ventricular remodelling after STEMI.

Keywords

Coenzyme Q10, mitochondria, ST-elevation myocardial infarction, left ventricular remodelling, HPLC-MSMS

Accepted: 16th February 2021

¹Department of Biochemistry, University Hospital of Caen, Caen, France

²Department of Cardiology, University Hospital of Caen, Caen, France

³Department of Signalisation, Électrophysiologie et Imagerie des Lésions d'Ischémie-Reperfusion Myocardique EA4650, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

⁴Department of Biostatistics and Clinical Research, University Hospital of Caen, Caen, France

⁵Department of Clinical Physiology, INSERM Comete, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

Corresponding author:

Stéphane Allouche, Centre Hospitalier Universitaire, Avenue de la Côte de Nacre, CS30001, 14033 Caen, Cedex 9, France.
Email: sallouche-s@chu-caen.fr

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is a frequent and severe disease which constitutes a great socioeconomic burden for society, with high mortality and morbidity.¹ Over the past few decades, reperfusion therapies and secondary prevention medications have considerably reduced short-term mortality after AMI. Following AMI, patients who develop left ventricular remodelling (LVR), a progressive alteration in ventricular function and architecture, are at increased risk of heart failure and cardiovascular death.^{2,3} Morphological changes include cardiomyocyte loss, cardiac hypertrophy and fibrosis.⁴ Several biomarkers have been investigated to predict the risk of LVR, including natriuretic peptides, markers of fibrosis (collagen peptides, matrix metalloproteinases) and markers of inflammation (soluble suppression of tumorigenicity 2 or SST2, Galectin-3).⁵ However, there is still no reliable biomarker that could be used in clinical practice for the early diagnosis and management of patients who may develop LVR.⁶ This is probably due to the complexity of the pathophysiological mechanisms involved in LVR which is a dynamic, time-dependent and multifactorial process triggered by mechanical stretch, neurohormonal activation, inflammation, metabolic abnormalities and oxidative stress.⁷ It is well admitted that mitochondrial dysfunction which results from ischaemia/reperfusion injury leads to reactive oxygen species (ROS)-induced cellular damages, including lipid peroxidation, antioxidant deficiency and decrease in energy production.^{8,9}

Coenzyme Q10 (CoQ10), or ubiquinone/ubiquinol, is a liposoluble vitamin-like molecule mainly located within the inner mitochondrial membrane.¹⁰ CoQ10 plays a key role in oxidative phosphorylation, acting as an electron transporter from mitochondrial complexes I and II to complex III.¹¹ It also acts as a powerful endogenous antioxidant and free radical scavenger due to its ability to switch from a reduced to an oxidized state (ubiquinol → semiquinone → ubiquinone).¹² Other biological functions of CoQ10 include extramitochondrial oxidative phosphorylation (platelets, myelin sheath, retina, etc.), regulation of the mitochondrial permeability transition pore, activation of mitochondrial uncoupling proteins and improvement of endothelial dysfunction (probably by increasing nitrogen oxide).¹³

In rat models of AMI, pretreatment with exogenous administration of CoQ10 has been shown to reduce infarct size and preserve ventricular function by reducing oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and pro-apoptotic factors.¹⁴⁻¹⁶ A recent clinical study suggests that early CoQ10 supplementation in patients with left ventricular ejection fraction <50% after

AMI may reduce LVR.¹⁷ In another study, plasma CoQ10 concentrations one month after percutaneous coronary intervention (PCI) in patients with STEMI are positively correlated with favourable LVR.¹⁸ These studies suggest that CoQ10 could play a role in LVR, by reducing ROS production and optimizing mitochondrial function, but data are scarce and the clinical interest of CoQ10 concentration in AMI has to be established.^{19,20}

Therefore, we aimed to assess the hypothesis that low plasma concentrations of CoQ10 at the time of myocardial infarction may be associated with an increased risk of developing adverse LVR at six months of follow-up.

Materials and methods

Patients and study protocol

A total of 68 adult patients admitted for STEMI and treated with PCI between 1 January 2017 and 30 October 2018 at Caen University Hospital (France) were retrospectively enrolled. This study is an ancillary study that was designed by Legallois et al. with inclusion and exclusion criteria previously described.²¹ The study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (protocol number A14-D17-VOL.20).

In an exploratory analysis, we compared plasma and muscle CoQ10 concentrations in an independent cohort of 12 patients who simultaneously underwent a muscle biopsy and a blood test in the course of the investigation of a putative mitochondrial disorder. Written informed consent was obtained from all patients.

Sample collection

Peripheral venous blood samples for baseline plasma CoQ10 measurement were collected at the sheath insertion prior to percutaneous coronary intervention in Vacutainer tube (Becton-Dickinson) with EDTA as anticoagulant. Samples were centrifuged at room temperature for 12 min at 2000 g and plasma was stored at -80°C until analysis. Muscle samples mainly involved deltoid or quadriceps muscle according to clinical symptoms. Biopsies were performed under local anaesthesia and stored at -80°C until their preparation.

Measurement of biochemical parameters

Plasma CoQ10 measurement. The plasma CoQ10 concentration was determined using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC/MSMS) following a slightly modified procedure described by Ruiz-Jimenez et al.²² A mixture of

100 μ L of thawed plasma and 50 μ L CoQ10-d⁹ internal standard at 2 μ g/mL was deproteinized with 500 μ L methanol and extracted three times with 1000 μ L *n*-hexane. The organic phases were pooled and evaporated to dryness using a vacuum concentrator. The dry residue was suspended within 100 μ L of ethanol, vortexed for 2 min and put into vial. Three microlitres were injected on a NexeraXR[®] system (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) with a 3 μ m (2.0 \times 150 mm) Pursuit PFP[®] column (Agilent, Santa Clara, USA). The mobile phase was methanol-formic acid 0.1% from 80:20 (v/v) to 100% methanol. The flow rate was fixed at 0.35 mL/min for 7.5 min and the temperature of the analytical column was 40°C. CoQ10 was detected and quantified using an API 5500 QTRAP[®] (ABSciex, Les Ulis, France) tandem mass spectrometer equipped with an APCI source in positive mode. CoQ10 was analysed in the MRM mode with the following transitions: CoQ10 *m/z* 863.4 \rightarrow 197.1 and CoQ10-d⁹ *m/z* 872.9 \rightarrow 206.3. Linearity was achieved over the following range: 0.02 to 2.30 μ mol/L. The intra- and inter-assay precision were, respectively, 3.3% and 6.6% for a CoQ10 concentration of 0.96 μ mol/L and 3.0% and 8.5% for a concentration of 1.97 μ mol/L. The recoveries of CoQ10 were comprised between 90 and 110%. Measurement of the patients' plasma CoQ10 concentration was performed in duplicate. Plasma CoQ10 concentration was expressed in μ mol/L or indexed to LDL or total cholesterol (μ mol/mmol).

Muscle CoQ10 measurement. Pieces of frozen tissue ($m = 30$ – 50 mg) were homogenized twice in 10 volumes of grinding buffer (mannitol 225 mM; sucrose 70 mM; Tris-HCl 10 mM; EDTA 0.1 mM; pH 7.2) using a tight-fit Potter-Elvehjem tissue grinder. Samples were centrifuged at 650 *g* for 20 min at +4°C. Supernatants were pooled and stored at -80°C until CoQ10 quantification. CoQ10 concentration was determined as previously described using 40 μ L of the muscle homogenate diluted by a two- or a four-fold in grinding buffer (according to protein content) and 40 μ L of internal standard. Linearity was achieved over the following range: 0.015 to 2.30 μ mol/L. The intra- and inter-assay precision were, respectively, 3.92% and 4.81% for a CoQ10 concentration of 0.40 μ mol/L and 2.21% and 3.53% for a concentration of 0.74 μ mol/L. Protein content of muscle homogenate was determined with the bicinchoninic acid assay, and muscle CoQ10 content was finally expressed as molar concentration per gram of protein (nmol/g of protein).²³

Other biochemical parameters. Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides were determined using enzymatic assays on an

AU680 chemistry analyser (Beckman Coulter). Evaluation of total and HDL cholesterol relied on a cholesterol oxidase method. Glycerol blanking for triglycerides determination automatically subtracted 0.11 mmol/L from the obtained value. According to the manufacturer, performance parameters were as follows for total cholesterol (analytical range: 0.5–18 mmol/L, CV = 0.8% at 2.48 mmol/L), HDL cholesterol (0.05–4.65 mmol/L, CV = 1.92% at 0.69 mmol/L) and triglycerides (1.1–11.3 mmol/L, CV = 1.76% at 0.47 mmol/L). Plasma low-density lipoprotein cholesterol concentration was calculated using the Friedwald equation when triglyceride concentration was below 3.75 mmol/L or measured using a Konelab 20 analyser (Thermo Scientific). High-sensitivity cardiac troponin I (hs-cTnI) and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) concentrations were, respectively, measured on a Unicl DxI system (Beckman Coulter) and a Cobas e411 system (Roche). The 99th percentile upper reference limit value of hs-cTnI, as determined by the manufacturer, was 17.5 ng/L and the 10% CV limit of quantification was 5.6 ng/L. The serum creatinine values were determined using an enzymatic creatinine assay with a calibration traceable to the isotope dilution mass spectrometry. Glomerular flow rate (GFR) was calculated using the Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation.²⁴

Echocardiographic assessments

All subjects had two transthoracic echocardiograms, within 48 h following PCI and after a median follow-up of seven months (6 to 10 months). Echocardiograms were performed as described by Legallois et al. and obtained by experienced ultrasonographers who were blinded to the patients' plasma CoQ10 concentrations.²¹ Left ventricular volumes and ejection fraction were measured using 3D echocardiography as recommended.²⁵ Adverse LVR was defined as a 20% increase in end-diastolic volume between baseline and follow-up imaging sessions.^{26,27}

Statistical analysis

Qualitative variables are shown as count and frequency (%). Quantitative variables are presented as mean \pm SD or median and quartiles, depending on the form of the distribution. A log-binomial regression model was used to test the association between plasma CoQ10 concentration and unfavourable LVR and to estimate a relative risk with 95% confidence interval. The same kind of analysis was done to test the association between unfavourable LVR and the baseline demographic, clinical and biological factors. All quantitative variables

were kept continuous in the models, and the fractional polynomial method was used to account for potential non-linear effects. Linearity was rejected for none of the variables. Two-group mean comparisons were done using Student's *t*-test, and Spearman correlation coefficients were used to test the association between quantitative variables. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Data were analysed with IBM SPSS version 23 and Stata version 13 (for the fractional polynomial analysis).

Results

A total of 68 patients fulfilling complete biological data and echocardiography were included in the analysis. Demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1. Mean age was 58.6 ± 12.7 years and 57 (83.8%) were men. Using the definition of adverse LVR as a 20% increase in EDV between baseline and follow-up echocardiography, we could discriminate an adverse LVR group ($n = 19$, 28%) and a no adverse LVR group ($n = 49$, 72%). As shown in Table 1, LVR was associated with none of the baseline characteristics. At the baseline, LV end-diastolic and end-systolic volumes, as well as the LV ejection fraction, were similar between the two groups. At six-month follow-up, as expected, both LV end-diastolic and end-systolic volumes were significantly higher in the adverse LVR group compared with the no adverse LVR group (Table 2). Biological data of interest for the study are depicted in Table 3. No significant associations were found between LVR and concentrations of hs-cTnI and NT-proBNP concentrations but also the lipid profile.

While investigating plasma CoQ10 concentrations, values ranged from 0.46 to 2.21 $\mu\text{mol/L}$ (mean $1.21 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$), but no association was evidenced with LVR (Risk Ratio (RR) = 0.98; $P = 0.89$) (Table 3). As expected, we found a similar positive correlation between CoQ10 and total cholesterol concentrations ($r = 0.60$; $P < 0.001$), as well as between CoQ10 and LDL-cholesterol concentrations ($r = 0.59$; $P < 0.001$) (see supplemental data). In contrast, HDL-cholesterol concentrations were not significantly related to CoQ10 concentrations ($r = 0.12$; $P = 0.360$, data not shown). Thus, CoQ10 concentrations were indexed to total and LDL cholesterol, but once more, no association with LVR was observed (T-CHL: RR = 0.76; $P = 0.38$ /LDL-CHL: RR = 0.79; $P = 0.27$) (Table 3). Among the 68 patients, 18 (26.5%) were treated with statins at the time of STEMI. We observed a trend toward a lower plasma CoQ10 concentration in patients with statins (mean $1.06 \pm 0.41 \mu\text{mol/L}$ vs. $1.26 \pm 0.38 \mu\text{mol/L}$ in patients without statins, $P = 0.06$).

Finally, skeletal muscle and plasma CoQ10 status were investigated in an independent series of 12 patients undergoing a muscle biopsy in our laboratory. Plasma CoQ10 values ranged from 0.42 to 2.04 $\mu\text{mol/L}$ and muscle values ranged from 50.00 to 1431.43 pmol/mg of protein. We found no correlation between skeletal muscle and plasma CoQ10 concentrations ($r = -0.32$, $P = 0.34$, see supplemental data).

Discussion

Among the 68 patients included in the study, 19 patients (28%) developed adverse LVR. This is in accordance with data from literature where adverse postinfarct ventricular remodelling was found in about 30% of the patients.^{28,29} We found plasma CoQ10 concentrations ranged from 0.46 to 2.21 $\mu\text{mol/L}$ which are similar to previous data.³⁰ For example, plasma concentrations of total CoQ10 in healthy subjects have been reported (means \pm SD) with different methods: $0.67 \pm 0.31 \mu\text{mol/L}$ (HPLC/MSMS),³¹ $0.75 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$ (HPLC with UV detection)³² and $1.11 \pm 0.24 \mu\text{mol/L}$ (HPLC with electrochemical detection).³³ As circulating CoQ10 is mainly transported by lipoproteins (about 58% with LDL and 26% with HDL), we studied their relationships and found a positive correlation between CoQ10 and total cholesterol concentrations ($r = 0.60$; $P < 0.001$), as well as between CoQ10 and LDL-cholesterol concentrations ($r = 0.59$; $P < 0.001$). This is also in accordance with results from Tomasetti et al. and Niklowitz et al.^{34,35} Statins, that interfere with CoQ10 synthesis by inhibiting HMG-CoA reductase activity, are well known to decrease plasma CoQ10 concentrations.³⁶ Indeed, we observed a trend toward a lower plasma CoQ10 concentration in patients treated with statins. However, we found no evidence that a lowered plasma CoQ10 concentration at the baseline was associated with unfavourable LVR six months after the STEMI.

The most probable hypothesis is that plasma CoQ10 concentrations may not accurately reflect tissue concentrations, particularly in cardiomyocytes.³⁷ As with many biomarkers, CoQ10 status in humans is determined from plasma concentrations primarily because of easy sample collection. However, plasma and tissue CoQ10 contents exhibit several differences. In heart, CoQ10 is mainly intracellular and located within the mitochondrial inner membrane where it constitutes a 50/50 ubiquinone/ubiquinol pool that both participates in the respiratory chain and as an antioxidant.³¹ In plasma, CoQ10 is known to be carried by lipoproteins and is present almost entirely – about 95% – in its reduced form to protect lipoproteins from oxidative stress and lipid peroxidation.³⁸

Table 1. Association between left ventricular remodelling and baseline demographic/clinical factors.

	Overall population ^a (n = 68)	Left ventricular remodelling		Crude RR ^a	95% CI	P
		n	%			
Age (years)	58.65 (12.73)	68		1.01	(0.75; 1.35)	0.97
Gender						
Male	57 (83.8)	57	17	1.64	(0.44; 6.11)	0.46
Female	11 (16.2)	11	2	1		
GFR (mL/min/1.73m ²)	92.87 (16.89)	61		0.87	(0.69; 1.11)	0.27
BMI (mm/kg ²)	27.37 (4.69)	67		0.95	(0.87; 1.04)	0.31
Smoking habit						
Yes	43 (63.2)	43	13	1		
No	25 (36.8)	25	6	0.80	(0.37; 1.72)	0.57
Hypertension						
Yes	25 (36.8)	25	8	1		
No	43 (63.2)	43	11	0.79	(0.35; 1.82)	0.59
Family history of cardiovascular disease						
No	56 (82.4)	56	16	1		
Yes	12 (17.6)	12	3	0.88	(0.30; 2.54)	0.81
Diabetes mellitus						
No	55 (80.9)	55	16	1		
Yes	13 (19.1)	13	3	0.79	(0.27; 2.32)	0.67
Hypercholesterolaemia						
No	36 (52.9)	36	9	1		
Yes	32 (47.1)	32	10	1.25	(0.58; 2.68)	0.57
Heart rate (beats/min)	76.91 (17.62)	68		0.97	(0.77; 1.21)	0.77
Systolic blood pressure (mmHg)	142.44 (25.46)	68		1.049	(0.91; 1.21)	0.51
Diastolic blood pressure (mmHg)	84.93 (18.62)	68		0.99	(0.81; 1.20)	0.88
Statins						
No	50 (73.5)	50	13	1		
Yes	18 (26.5)	18	6	1.28	(0.57; 2.86)	0.54

GFR: glomerular flow rate; BMI: body mass index.

^aData for overall population are presented as mean (\pm standard deviation), median (quartiles) or number (percentage).

^bAge, GFR, heart rate, systolic and diastolic blood pressure: for a 10-unit increase; BMI, Symptoms to balloon: for a 1-unit increase.

Furthermore, the correlation between tissue and plasma CoQ10 status is not obvious. For example, Duncan et al. found a close association between skeletal muscle and mononuclear cells CoQ10 concentration, but no correlation between skeletal muscle and plasma CoQ10 concentrations.³⁹ In our study, we also did not find any correlation between skeletal muscle and plasma CoQ10 concentrations either ($r = -0.32$, $P = 0.34$). A similar conclusion was drawn by Folkers et al. who showed no correlation between blood and heart CoQ10 concentrations. However, they observed low blood CoQ10 concentrations in patients suffering from cardiomyopathy but not as markedly as for the heart biopsies. Thus, they hypothesized that a correlation between plasma and organ concentrations may exist only for the most severe deficiency states.⁴⁰

In our study, since we found similar values of plasma CoQ10 concentrations to those described in the literature, we could rule out severe CoQ10 deficiency in our patients. This may explain the lack of correlation between plasma and cardiac CoQ10 concentrations and the absence of significant difference in CoQ10 concentrations between patients with and without adverse LVR. Thus, it would be interesting to investigate whether patients who exhibit a real plasma CoQ10 deficiency/overload would be more/less likely to develop LVR compared with patients with CoQ10 in the normal range.

The reason why the plasma and tissue CoQ10 concentrations are not correlated is probably due to their independent origin. In physiological conditions, tissue CoQ10 concentrations mainly rely on *de novo*

Table 2. Changes in left ventricular characteristics on 3D-echocardiography.

	Overall population (n = 68)	Left ventricular remodelling		P
		No (n = 49)	Yes (n = 19)	
At baseline				
End diastolic volume (mL/m ²)	54.38 (13.29)	55.39 (12.65)	51.75 (14.85)	0.31
End systolic volume (mL/m ²)	30.45 (10.02)	30.65 (10.44)	29.93 (9.11)	0.79
Ejection fraction (%)	44.32 (9.09)	45.12 (9.95)	42.26 (6.11)	0.25
At follow-up				
End diastolic volume (mL/m ²)	57.31 (15.89)	52.63 (11.85)	69.38 (18.77)	0.0014
End systolic volume (mL/m ²)	28.58 (11.90)	25.27 (8.94)	37.10 (14.40)	0.0028
Ejection fraction (%)	51.12 (9.65)	52.57 (9.34)	47.37 (9.66)	0.045

Note: Data are presented as mean (\pm standard deviation).

Table 3. Association between left ventricular remodelling and baseline biological factors.

	Overall population (n = 68) ^a	n	LVR	Crude RR*	95% CI	P
hs-cTnI (ng/L)	1947 (164; 9991)	67	1556 (288; 8607)	1.001	(0.998; 1.004)	0.45
NT-proBNP (ng/L)	204 (66; 1040)	68	177 (62; 907)	1.01	(1.00; 1.02)	0.17
Total cholesterol (mmol/L)	5.25 (0.98)	63	5.44 (0.97)	1.06	(0.95; 1.17)	0.30
LDL cholesterol (mmol/L)	3.38 (0.82)	58	3.55 (0.69)	1.06	(0.93; 1.21)	0.38
HDL cholesterol (mmol/L)	1.15 (0.26)	56	1.23 (0.35)	1.14	(0.96; 1.36)	0.14
Triglycerides (mmol/L)	1.52 (1.02; 2.11)	63	1.36 (0.90; 1.74)	0.96	(0.85; 1.06)	0.51
CoQ10 (μ mol/L)	1.21 (0.39)	68	1.20 (0.34)	0.98	(0.78; 1.24)	0.89
CoQ10/T-CHL (μ mol/mmol)	0.23 (0.061)	63	0.22 (0.057)	0.76	(0.41; 1.40)	0.38
CoQ10/LDL-CHL (μ mol/mmol)	0.37 (0.11)	58	0.35 (0.105)	0.79	(0.52; 1.20)	0.27

GFR: glomerular flow rate; BMI: body mass index; RR: risk ratio; NT-proBNP: N-terminal pro b-type natriuretic peptide; hs-cTnI: high sensitivity cardiac troponin I.

^aData for overall population are presented as mean (\pm standard deviation) or median (quartiles).

*hs-cTnI: for a 100-unit increase; NTproBNP: for a 50-unit increase; Total and LDL cholesterol, Triglycerides, CoQ10: for a 0.25-unit increase; HDL cholesterol, CoQ10/T-CHL, CoQ10/LDL-CHL: for a 0.1-unit increase.

synthesis. In contrast, plasma CoQ10 concentrations are significantly influenced by dietary uptake and exogenous CoQ10 does not down-regulate its endogenous synthesis.^{41,42} The situation is, however, completely different when there is a severe deficiency in CoQ10 tissue concentration, for example in patients with a genetic deficiency of CoQ10 synthesis or in patients with heart failure who exhibit low concentrations of CoQ10 in cardiomyocytes. In those cases, the plasma uptake of exogenous CoQ10 is necessary to maintain adequate tissue concentrations, suggesting that tissue deficiency precedes plasma deficiency.

Another point to consider is that we decided to investigate the plasma CoQ10 concentration at the onset of STEMI. In a similar study, Huang et al. examined the potential correlation between plasma CoQ10 concentration at baseline and three days, seven days and one month after STEMI and the LV performance. They found that CoQ10 concentrations gradually

decreased with time and that lower CoQ10 concentrations in plasma at one month was predictive of adverse LVR six months after STEMI (adverse LVR was defined as a 10% increase in end-systolic volume between baseline and follow-up).¹⁸ However, they did not interpret the prognostic value of CoQ10 at other measured times, suggesting that earlier measurements – particularly at the baseline – were not predictive of LV performance as found in our study. It is thus likely that we did not find any evidence that circulating concentrations of CoQ10 were lowered before cardiac remodelling because the CoQ10 decrease might happen as a result of compensatory mechanisms that gradually set up after the onset of STEMI. This is consistent with all findings in patients with chronic heart failure where myocardial remodelling is severely established and who exhibit low circulating and tissue concentrations of CoQ10.⁴³

When we initially designed the study, we did not consider taking a blood sample at six months of

follow-up and it would have been interesting to determine the CoQ10 concentration at that time. Another limitation is that we measured the amount of CoQ10 in its oxidized form but not the Ubiquinol (CoQ10H₂)/Ubiquinone (CoQ10) ratio. However, measurement of both reduced and oxidized forms implies great technical considerations regarding sample processing and analytical stability.²⁸ Ubiquinol is readily oxidized to Ubiquinone during sample preparation or long-term storage, even at -80°C, which is the case in our study where the first samples were collected in January 2017 and analysed two years later. A prospective study with immediate determination of CoQ10 redox state would be interesting, as altered plasma ratios reflect oxidative stress and could be involved in the LV remodelling.²⁸ At last, we did not assess the reproducibility of left ventricular volumes assessment in our STEMI population, which could have impacted the classification of patients in adverse and non-adverse LVR groups. Finally, given the low number of events (28% of LVR) – which is in accordance with the literature – we could not have performed multivariate analysis. In particular, we did not adjust the results for age and statin intake that are known to decrease CoQ10 concentrations. However, neither of these two parameters were linked to the occurrence of LVR ($P=0.97$ and $P=0.54$, Table 1).

In conclusion, we found no evidence for a role of circulating CoQ10 as an early biomarker predicting LVR in patients with STEMI. As shown by a comparison between plasma and skeletal muscle, the plasma CoQ10 concentrations presumably do not reflect CoQ10 content in cardiomyocytes. Our results highlight the difficulty to accurately assess the CoQ10 status with only one non-invasive biological sample. Even if we found no significant difference between CoQ10 concentrations in patients with or without LVR, our results cannot rule out a putative benefit of CoQ10 supplementation in STEMI.⁴⁴

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Clinical Research and Innovation Office of Caen University Hospital (grant number 20–512).

Ethical approval

The study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (NORTHWEST III HUMAN PROTECTION COMMITTEE, protocol number A14-D17-VOL.20).

Guarantor

SA.

Contributorship

FF performed the CoQ10 assays, analysed the data and drafted the manuscript. DL designed the study, extracted and analysed the data and revised the manuscript. CC performed the statistical analysis. MC and LC participated in the CoQ10 assays. AH and ES carried out echocardiography imaging. PM and FB participated in the clinical part. SA designed the study and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the article.

ORCID iDs

Christian Crèveuil  <https://orcid.org/0000-0002-5506-5296>
Stéphane Allouche  <https://orcid.org/0000-0003-3134-7501>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

- Puymirat E, Simon T, Cayla G, et al. Acute myocardial infarction: changes in patient characteristics, management, and 6-month outcomes over a period of 20 years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation* 2017; 136: 1908–1919.
- Cohn JN, Ferrari R and Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569–582.
- Bauters C, Dubois E, Porouchani S, et al. Long-term prognostic impact of left ventricular remodeling after a first myocardial infarction in modern clinical practice. *PLoS One* 2017; 12: e0188884.
- Xie M, Burchfield JS and Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 2013; 128: 388–400.
- Chow SL, Maisel AS, Anand I, et al. Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2017; 135: 1054–1091.
- Fertin M, Dubois E, Belliard A, et al. Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2012; 110: 277–283.
- Schirone L, Forte M, Palmerio S, et al. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 3920195–3920116.
- Holley C, Long EK, Lindsey ME, et al. Recovery of hibernating myocardium: what is the role of surgical revascularization? *J Card Surg* 2015; 30: 224–231.
- Rababa'h AM, Guillory AN, Mustafa R, et al. Oxidative stress and cardiac remodeling: an updated edge. *Curr Cardiol Rev* 2018; 14: 53–59.
- Kaurolo P, Sharma V, Vonk A, et al. Distribution and dynamics of quinones in the lipid bilayer mimicking the inner membrane of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1858: 2116–2122.
- Lenaz G, Fato R, Formiggini G, et al. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 2007; 7S: S8–S33.
- Bentinger M, Brismar K and Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 2007; 7S: S41–S50.
- Turunen M, Olsson J and Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660: 171–199.
- Eleawa SM, Alkhateeb M, Ghosh S, et al. Coenzyme Q10 protects against acute consequences of experimental myocardial infarction in rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2015; 7: 1–13.
- Ivanov A, Gorodetskaya E, Kalenikova E, et al. Single intravenous injection of CoQ10 reduces infarct size in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Wjcd* 2013; 3: 1–7.
- Liang S, Ping Z and Ge J. Coenzyme Q10 regulates antioxidative stress and autophagy in acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 4: 1–12.
- Singh RB, Fedacko J, Mojto V, et al. Coenzyme Q10 modulates remodeling possibly by decreasing angiotensin-converting enzyme in patients with acute coronary syndrome. *Antioxidants* 2018; 7: 99–109.
- Huang CH, Kuo CL, Huang CS, et al. High plasma coenzyme Q10 concentration is correlated with good left ventricular performance after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Medicine* 2016; 95: 31–37.
- Martelli A, Testai L, Colletti A, et al. Coenzyme Q10: clinical applications in cardiovascular diseases. *Antioxidants* 2020; 9: 341.

20. Sharma A, Fonarow GC, Butler J, et al. Coenzyme Q10 and heart failure: a state-of-the-art review. *Circ Heart Fail* 2016; 9: e002639.
21. Legallois D, Macquaire C, Hodzic A, et al. Serum neprilysin levels are associated with myocardial stunning after ST-elevation myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 2020; 20: 316.
22. Ruiz-Jiménez J, Priego-Capote F, Mata-Granados JM, et al. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. *J Chromatogr A* 2007; 1175: 242–248.
23. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76–85.
24. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604–612.
25. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015; 16: 233–270.
26. Urbano-Moral JA, Lopez-Haldon JE, Fernandez M, et al. Prognostic value of different serum biomarkers for left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2012; 98: 1153–1159.
27. Na HM, Cho GY, Lee JM, et al. Echocardiographic predictors for left ventricular remodeling after acute ST elevation myocardial infarction with low risk group: speckle tracking analysis. *J Cardiovasc Ultrasound* 2016; 24: 128–134.
28. Galli A and Lombardi F. Postinfarct left ventricular remodeling: a prevailing cause of heart failure. *Cardiol Res Pract* 2016; 18: 2579832–2579844.
29. Huttin O, Coiro S, Selton-Suty C, et al. Prediction of left ventricular remodeling after a myocardial infarction: role of myocardial deformation: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0168349.
30. Barshop BA and Gangoiti JA. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion* 2007; 7S: S89–S93.
31. Åberg F, Appelkvist EL, Dallner G, et al. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295: 230–234.
32. Sohmiya M, Tanaka M, Tak NW, et al. Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2004; 223: 161–166.
33. Niklowitz P, Menke T, Wiesel T, et al. Coenzyme Q10 in plasma and erythrocytes: comparison of antioxidant levels in healthy probands after oral supplementation and in patients suffering from sickle cell anemia. *Clin Chim Acta* 2004; 326: 155–161.
34. Niklowitz P, Onur S, Fischer A, et al. Coenzyme Q10 serum concentration and redox status in European adults: influence of age, sex and lipoprotein concentration. *J Clin Biochem Nutr* 2016; 58: 240–245.
35. Tomasetti M, Alleva R, Solenghi MD, et al. Distribution of antioxidants among blood components and lipoproteins: significance of lipids/CoQ10 ratio as a possible marker of increased risk for atherosclerosis. *Biofactors* 1999; 9: 231–240.
36. Langsjoen PH and Langsjoen AM. The clinical use of HMG CoA-reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10: a review of animal and human publications. *Biofactors* 2003; 18: 101–111.
37. Barth E, Stämmler G, Speiser B, et al. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofibrils in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 669–681.
38. Alleva R, Tomasetti M, Battino M, et al. The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9388–9391.
39. Duncan AJ, Heales SJ, Mills K, et al. Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin Chem* 2005; 51: 2380–2382.
40. Folkers K, Vadhanavikit S and Mortensen SA. Biochemical rationale and myocardial tissue data on the effective therapy of cardiomyopathy with coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 901–904.
41. Bhagavan HN and Chopra RK. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res* 2006; 40: 445–453.
42. Bhagavan HN and Chopra RK. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion* 2007; 7S: S78–S88.
43. Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, et al. Coenzyme Q10 therapy. *Mol Syndromol* 2014; 5: 187–197.
44. Cicero AFG, Colletti A, von Haehling S, et al. Nutraceutical support in heart failure: a position paper of the International Lipid Expert Panel (ILEP). *Nutr Res Rev* 2020; 33: 155–179.

BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Festenstein G.N., Heaton F.W., Lowe J.S., Morton R.A. A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids. *Biochem. J.* **1955**, *59*, 558-566.
- ² Crane F.L., Hatefi Y., Lester R.L., Widmer C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *25*, 220-221.
- ³ Lester R.L., Crane F.L., Hatefi Y. Coenzyme Q : a new group of quinones. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4751-4752.
- ⁴ Wolf D.E., Hoffman C.H., Trenner N.R., Arison B.H., Shunk C.H., Linn, B.O., McPherson J.F., Folkers K. Coenzyme Q. I. Structure studies on the Coenzyme Q group. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4752.
- ⁵ Åberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *295*, 230-234.
- ⁶ Denis F.A., D'Oultremont P.A., Debacq J.J., Cherel J.M., Brisou J. Distribution of ubiquinones (coenzyme Q) in Gram negative bacillae. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* **1975**, *169*, 380-383.
- ⁷ Lester R.L., Crane F.L. The natural occurrence of Coenzyme Q and related compounds. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2169-2175.
- ⁸ Alcazar-Fabra M., Trevisson E., Brea-Calvo G. Clinical syndromes associated with Coenzyme Q₁₀ deficiency. *Essays in Biochemistry* **2018**, *62*, 377-398.
- ⁹ Greenberg S., Frishman W.H. Co-enzyme Q₁₀: a new drug for cardiovascular disease. *J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *30*, 596-608.
- ¹⁰ Zhang Y., Turunen M., Appelkvist E.L. Restricted uptake of dietary Coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of α -Tocopherol into rat organs and cells. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 2089-2097.
- ¹¹ Tomasetti M., Alleva R., Solenghi M.D., Littarru G.P. Distribution of antioxidants among blood components and lipoproteins : significance of lipids/CoQ₁₀ ratio as a possible marker of increased risk for atherosclerosis. *BioFactors* **1999**, *9*, 231-240.
- ¹² Mohr D., Bowry V.W., Stocker R. Dietary supplementation with coenzyme Q₁₀ results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1126*, 247-254.
- ¹³ Lenaz G., Samori B., Fato R., Battino M., Parenti Castelli G., Domini I. Localization and preferred orientations of ubiquinone homologs in model bilayers. *Biochem. Cell Biol.* **1992**, *70*, 504-514.
- ¹⁴ Afri M., Ehrenberg B., Talmon Y., Schmidt J., Cohen Y., Frimer A.A. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part III: Locating Vitamin E, ubiquinol and ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *131*, 107-121.
- ¹⁵ Hauß T., Dante S., Haines T.H., Dencher N.A. Localization of coenzyme Q₁₀ in the center of a deuterated lipid membrane by neutron diffraction. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2005**, *1710*, 57-62.
- ¹⁶ Kaurola P., Sharma V., Vonk A., Vattulainen I., Rog T. Distribution and dynamics of quinones in the lipid bilayer mimicking the inner membrane of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858*, 2116-2122.
- ¹⁷ Galassi V.V., Arantes G.M. Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1847*, 1560-1573.
- ¹⁸ Aussel L., Pierrel F., Loiseau L., Lombard M., Fontecave M., Barras F. Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1837*, 1004-1011.
- ¹⁹ Awad A.M., Bradley M.C., Fernandez-del-Rio L., Nag A., Tsui H.S., Clarke C.F. Coenzyme Q₁₀ deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 361-376.
- ²⁰ Flydal M.I., Martinez A. Phenylalanine hydroxylase : function, structure and regulation. *IUBMB Life.* **2013**, *65*, 341-349.
- ²¹ Payet L.A., Leroux M., Willison J.C., Kihara A., Pelosi L., Pierrel F. Mechanistic details of early steps in Coenzyme Q biosynthesis pathway in yeast. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 1241-1250.
- ²² Stefely J.A., Pagliarini D.J. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci.* **2017**, *42*, 824-843.
- ²³ Stefely J.A., Kwiecien N.W., Freiberger E.C., Richards A.L., Jochem A., Rush M.J.P., Ulbrich A., Robinson K.P., Hutchins P.D., Veling M.T., Guo X., Kemmerer Z.A., Connors K.J., Trujillo E.A., Sokol J., Marx H., Westphall M.S., Hebert A.S., Pagliarini D.J., Coon J.J. Mitochondrial protein functions elucidated by multi-omic mass spectrometry profiling. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 1191-1197.

- ²⁴ Xie L.X., Williams K.J., He C.H., Weng E., Khong S., Rose T.E., Kwon O., Bensinger S.J., Marbois B.N., Clarke C.F. Resveratrol and para-coumarate serve as ring precursors for coenzyme Q biosynthesis. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 909-919.
- ²⁵ Fernández-del-Río L., Nagb A., Gutiérrez Casado E., Arizaa J., Awadb A.M., Josephc A.I., Kwonb O., Verdind E., de Caboe R., Schneiderc C., Torresb J.Z., Buróna M.I., Clarkeb C.F., Villalba J.M. Kaempferol increases levels of coenzyme Q in kidney cells and serves as a biosynthetic ring precursor. *Free Radical Bio. Med.* **2017**, *110*, 176-187.
- ²⁶ Pierrel F. Impact of chemical analogs of 4-hydroxybenzoic acid on coenzyme Q biosynthesis: from inhibition to bypass of coenzyme Q deficiency. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 436.
- ²⁷ Marbois B., Xie L.X., Choi S., Hirano K., Hyman K. and Clarke C.F. para-Aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27827-27838.
- ²⁸ Tricarico P.M., Crovella S., Celsi F. Mevalonate pathway blockade, mitochondrial dysfunction and autophagy: A possible link. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16067-16084.
- ²⁹ Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1050-1052.
- ³⁰ Folkers K., Langsjoen P., Willis R., Richardson P., Xia L.J., Ye C.Q., Tamagawa H. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8931-8934.
- ³¹ Nawarskas, J.J. HMG-CoA reductase inhibitors and Coenzyme Q₁₀. *Cardiol. Rev.* **2005**, *13*, 76-79.
- ³² Ashby N.N., Edwards P.A. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13157-13164.
- ³³ Saiki R., Nagata A., Kainou T., Matsuda H., Kawamukai M. Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5606-5622.
- ³⁴ Ashby M.N., Kutsunai S.Y., Ackerman S., Tzagoloff A., Edwards P.A. COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4128-4136.
- ³⁵ Forsgren M., Attersand A., Lake S., Grunler J., Swiezewska E., Dallner G., Climent I. Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 519-526.
- ³⁶ Alam S.S., Nambudiri A.M., Rudney H. 4-Hydroxybenzoate: polyprenyl transferase and the prenylation of 4-aminobenzoate in mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* **1975**, *171*, 183-190.
- ³⁷ Jackman L.M., O'Brien I.G., Cox G.B., Gibson F. Methionine as the source of methyl groups for ubiquinone and vitamin K: a study using nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* **1967**; *141*, 1-7.
- ³⁸ Alexander K., Young I.G. Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1978**, *17*, 4745-4750.
- ³⁹ Gin P., Hsu A.Y., Rothman S.C., Jonassen T., Lee P.T., Tzagoloff A., Clarke C.F. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25308-25316.
- ⁴⁰ Doimo M., Trevisson E., Airik R., Bergdoll M., Santos-Ocana C., Hildebrandt F., Navas P., Pierrel F., Salviati L. Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1-6.
- ⁴¹ Ozeir M., Muhlenhoff U., Webert H., Lill R., Fontecave M. and Pierrel F. Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1134-1142.
- ⁴² Marbois B.N., Clarke C.F. The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2995-3004.
- ⁴³ Stenmark P., Grunler J., Mattsson J., Sindelar P.J., Nordlund P., Berthold D.A. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33297-33300.
- ⁴⁴ Clarke C.F., Williams W. and Teruya J.H. Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 16636-16644.
- ⁴⁵ Jonassen T. and Clarke C.F. Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12381-12387.
- ⁴⁶ Nguyen T.P.T., Casarin A., Desbats M.A., Doimo M., Trevisson E., Santos-Ocana C., Navas P., Clarke C.F., Salviati L. Molecular characterization of the human COQ5 C-methyltransferase in coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* **2014**, *1841*, 1628-1638.
- ⁴⁷ Barkovich R.J., Shtanko A., Shepherd J.A., Lee P.T., Myles D.C., Tzagoloff A., Clarke C.F. Characterization of the COQ5 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem.* **1997**, *272*, 9182-9188.

- ⁴⁸ Marbois B., Gina P., Gulmeziana M., Clarke C.F. The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for Coenzyme Q biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1791, 69-75.
- ⁴⁹ Casarin A., Jimenez-Ortega J.C., Trevisson E., Pertegato V., Doimo M., Ferrero-Gomez M.L., Abbadi S., Artuch R., Quinzii C., Hirano M., Basso G., Ocaña C.S., Navas P., Salviati L. Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q₁₀ biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 372, 35-39.
- ⁵⁰ Rea S.L., Graham B.H., Nakamaru-Ogiso E., Kar A., Falk M.J. Bacteria, yeast, worms, and flies: Exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **2010**, 16, 200-218.
- ⁵¹ Xie L.X., Hsieh E.J., Watanabe S., Allan C.M., Chen J.Y., a, Tran U.C., Clarke C.F. Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, 1811, 348-360.
- ⁵² He C.H., Xie L.X., Allan C.M., Tran U.C., Clarke C.F. Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, 1841, 630-644.
- ⁵³ Reidenbach A.G., Kemmerer Z.A., Aydin D., Jochem A., McDevitt M.T., Hutchins P.D., Stark J.L., Stefely J.A., Reddy T., Hebert A.S., Wilkerson E.M., Johnson I.E., Bingman C.A., Markley J.L., Coon J.J., Dal Peraro M., Pagliarini D.J. Conserved lipid and small molecule modulation of COQ8 reveals regulation of the ancient kinase-like UbiB family. *Cell Chem. Biol.* **2018**, 25, 154-165.
- ⁵⁴ He C.H., Black D.S., Nguyen T.P.T., Wang C., Srinivasan C., Clarke C.F. Yeast Coq9 controls deamination of coenzyme Q intermediates that derive from para-aminobenzoic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **2015**, 1851, 1227-1239.
- ⁵⁵ Lohman D.C., Forouhar F., Beebe E.T., Stefely M.S., Minogue C.E., Ulbrich, Stefely J.A., Sukumar S., Luna-Sánchez M., Jochem A., Lew S., Seetharaman J., Xiao R., Wang H., Westphall M.S., Wrobel R.L., Everett J.K., Mitchell J.C., López L.C., Coon J.J., Tong L., Pagliarini D.J. Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *PNAS* **2014**, E4697-E4705.
- ⁵⁶ Barros M.H., Johnson A., Gin P., Marbois B.N., Clarke C.F., Tzagoloff A. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START Domain protein required for function of Coenzyme Q in respiration. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 42627-42635.
- ⁵⁷ Allan C.M., Hill S., Morvaridi S., Saiki R., Johnson J.S., Liau W.S., Hirano K., Kawashima T., Ji Z., Loo J.A., Shepherd J.N., Clarke C.F. A conserved START Domain Coenzyme Q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1831, 776-791.
- ⁵⁸ Tsui H.S., Pham N.V.B., Amer B.R., Bradley M.C., Gosschalk J.E., Gallagher-Jones M., Ibarra H., Clubb R.T., Blaby-Haas C.E., Clarke C.F. Human COQ10A and COQ10B are distinct lipid-binding START domain proteins required for coenzyme Q function. *J. Lipid. Res.* **2019**, 60, 1293-1310.
- ⁵⁹ Allan C.M., Awad A.M., Johnson J.S., Shirasaki D.I., Wang C., Blaby-Haas C.E., Merchant S.S., Loo J.A., Clarke C.F. Identification of Coq11, a new Coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-Synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 7517-7534.
- ⁶⁰ Baertling F., Sánchez-Caballero L., van den Brand M.A.M., Fung C.W., Chan S.H.S., Wong V.C.N., Hellebrekers D.M.E., de Coo I.F.M., Smeitink J.A.M., Rodenburg R.J.T., Nijtmans L.G.J. NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect. *Clin. Genet.* **2018**, 93, 111-118.
- ⁶¹ Tran U.C., Clarke C.F. Endogenous synthesis of Coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* **2007**, 7, S62-S71.
- ⁶² Weber C., Bysted A., Holmer G. Coenzyme Q₁₀ in the diet - daily Intake and relative bioavailability. *Molec. Aspects Med.* **1997**, 18, S251-S254.
- ⁶³ Yubero D., Montero R., Artuch R., Land J.M., Heales S.J.R., Hargreaves I.P. Biochemical diagnosis of Coenzyme Q10 deficiency. *Mol. Syndromol.* **2014**, 5, 147-155.
- ⁶⁴ Bhagavan H.N., Chopra R.K. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Res.* **2006**, 40, 445-453.
- ⁶⁵ Martelli A., Testai L., Colletti A., Cicero A.F.G. Coenzyme Q₁₀: Clinical applications in cardiovascular diseases. *Antioxidants* **2020**, 9, 341-367.
- ⁶⁶ Mantle D., Dybring A. Bioavailability of Coenzyme Q₁₀: an overview of the absorption process and subsequent metabolism. *Antioxidants* **2020**, 9, 386.
- ⁶⁷ Miles M.V. The uptake and distribution of coenzyme Q(10). *Mitochondrion* **2007**, 7S, S72-S77.
- ⁶⁸ Hosoe K., Kitano M., Kishida H., Kubo H., Fujii K., Kitahara M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH™) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 47, 19-28.
- ⁶⁹ Bentinger M., Dallner G., Chojnacki T., Swiezewska E. Distribution and breakdown of labeled Coenzyme Q10 in rat. *Free Radical Bio. Med.* **2003**, 34, 563-575.

- ⁷⁰ Zierz S., von Wersebe O., Bleistein J., Jerusalem F. Exogenous coenzyme Q (CoQ) fails to increase CoQ in skeletal muscle of two patients with mitochondrial myopathies. *J. Neurol. Sci.* **1990**, *95*, 283-290.
- ⁷¹ Rötig A., Appelkvist E.L., Geromel V., Chretien D., Kadhon N., Edery P., Lebideau M., Dallner G., Munnich A., Ernster L., Rustin P. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q₁₀ deficiency. *The Lancet* **2000**, *356*, 391-395.
- ⁷² Thelin A., Schedin S., Dallner G. Half-life of ubiquinone-9 in rat tissues. *FEBS Lett.* **1992**, *313*, 118-120.
- ⁷³ Tomono Y., Hasegawa J., Seki T., Motegi K., Morishita N. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **1986**, *24*, 536-541.
- ⁷⁴ Nakamura T., Ohno T., Hamamura K., Sato T. Metabolism of coenzyme Q10: biliary and urinary excretion study in guinea pigs. *Biofactors* **1999**, *9*, 111-119.
- ⁷⁵ Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, **2020**, *37*, 101674.
- ⁷⁶ Wirth C., Brandt U., Hunte C., Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857*, 902-914.
- ⁷⁷ Fullerton M., McFarland R., Taylor R.W., Alston C.L. The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **2020**, *131*, 53-65.
- ⁷⁸ Fernandez-Vizarra E., Zeviani M. Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 134.
- ⁷⁹ Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principles of biochemistry 5th edition. **2008** W.H. Freeman and Company.
- ⁸⁰ Kadenbach B. Complex IV – the regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion* **2020**, *20*, S1567-S7249.
- ⁸¹ Belevich I., Gorbikova E., Belevich N.P., Rauhamäki V., Wikström M., Verkhovsky M.I. Initiation of the proton pump of cytochrome c oxidase. *PNAS* **2010**, *107*, 18469-18474.
- ⁸² Neupane P., Bhuju S., Thapa N., Bhattarai H.K. ATP Synthase: Structure, function and inhibition. *Biomol Concepts* **2019**, *10*, 1-10.
- ⁸³ Weber J. ATP synthase – the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 53-56.
- ⁸⁴ Wang Y., Hekimi S. Understanding ubiquinone. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 367-378.
- ⁸⁵ Caruana N.J., Stroud D.A. The road to the structure of the mitochondrial respiratory chain supercomplex. *Biochem. Soc. T.* **2020**, *48*, 621-629.
- ⁸⁶ Lobo-Jarne T., Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: structures, function and biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *76*, 179-190.
- ⁸⁷ Hidalgo-Gutiérrez A., González-García P., Díaz-Casado M.E., Barriocanal-Casado E., López-Herrador S., Quinzii C.M., López L.C. Metabolic targets of Coenzyme Q₁₀ in mitochondria. Antioxidants **2021**, *10*, 520.
- ⁸⁸ Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1660*, 171-199.
- ⁸⁹ Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, 60438.
- ⁹⁰ Mellors A., Tappel L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4353-4356.
- ⁹¹ Ernster L., Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*, 195-204.
- ⁹² Takayanagi R., Takeshige K., Minakami S. NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *Biochem. J.* **1980**, *192*, 853-860.
- ⁹³ Bentinger M., Brismar K., Dallner G. The antioxidant role of Coenzyme Q. *Mitochondrion* **2007**, *7S*, S41-S50.
- ⁹⁴ Alleva R., Tomasetti M., Battino M., Curatola G., Littarru G.P., Folkers K. The roles of coenzyme Q₁₀ and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *PNAS* **1995**, *92*, 9388-9391.
- ⁹⁵ Kehm R., Baldensperger T., Raupbach J., Höhn A. Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology* **2021**, *42*, 101901.
- ⁹⁶ Ouznadji A., Desmons A. Les réactions d'oxydation des protéines et leurs biomarqueurs. *Revue Francophone des Laboratoires* **2020**, *522*, 31-38.
- ⁹⁷ Forsmark-André P., Dallner G., Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radical Bio. Med.* **1995**, *19*, 749-757.
- ⁹⁸ Ernster L., Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*, 195-204.

- ⁹⁹ Tomasetti M., Alleva R., Borghi B., Collins A.R. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1425-1427.
- ¹⁰⁰ Peixoto de Barcelos I., Haas R.H. Coenzyme Q₁₀ and aging. *Biology* **2019**, *8*, 28.
- ¹⁰¹ Evans D.R., Guy H.I. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33035-33038.
- ¹⁰² Loffler M., Fairbanks L.D., Zameitat E., Marinaki A.M., Simmonds A. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 430-437.
- ¹⁰³ Metabolic-Database. Nucleogenesis: Dihydroorotate dehydrogenase [Internet]. **2011** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : <https://www.metabolic-database.com/html/dhodh.html>.
- ¹⁰⁴ Olschewski A., Weir E.K. Redox regulation of ion channels in the pulmonary circulation. *Antioxid. Redox. Sign.* **2015**, *22*, 465-485.
- ¹⁰⁵ Hyun D.H., Hernandez J.O., Mattson M.P., de Cabo R. The plasma membrane redox system in aging. *Ageing Res. Rev.* **2006**, *5*, 209-220.
- ¹⁰⁶ Singh P., Kesharwani R.K., Misra K., Rizvi S.I. Modulation of erythrocyte plasma membrane redox system activity by curcumin. *Biochem. Res. Int.* **2016**, Article ID 6025245.
- ¹⁰⁷ Nohi H., Gille L. The existence and significance of redox-cycling ubiquinone in lysosomes. *Protoplasma* **2001**, *217*, 9-14.
- ¹⁰⁸ Bonora M., Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Frontiers in Oncology* **2014**, *4*, article 302.
- ¹⁰⁹ Di Lisa F., Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *70*, 191-199.
- ¹¹⁰ Fontaine E., Ichas F., Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25734-25740.
- ¹¹¹ Walter L., Nogueira V., Leverve X., Heitz M.P., Bernardi P., Fontaine E. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29521-29527.
- ¹¹² Devun F., Walter L., Belliere J., Cottet-Rousselle C., Leverve X., Fontaine E. Ubiquinone analogs: a mitochondrial permeability transition pore-dependent pathway to selective cell death. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11792.
- ¹¹³ Sabbatinelli J., Orlando P., Galeazzi R., Silvestri S., Cirilli I., Marcheggiani F., Dلدla P.V., Giuliani A., Bonfigli A.R., Mazzanti L., Olivieri F., Antonicelli R., Tiano L. Ubiquinol ameliorates endothelial dysfunction in subjects with mild-to-moderate dyslipidemia: a randomized clinical trial. *Nutrients* **2020**, *12*, 1098.
- ¹¹⁴ Watts G.F., Playford D.A., Croft K.D., Ward N.C., Mori T.A., Burke V. Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **2002**, *45*, 420-426.
- ¹¹⁵ Groneberg D.A., Kindermann B., Althammer M., Klapper M., Vormann J., Littarru G.P., Döring F. Coenzyme Q₁₀ affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2005**, *37*, 1208-1218.
- ¹¹⁶ Schmelzer C., Lindner I., Rimbach G., Niklowitz P., Menke T., Döring F. Functions of coenzyme Q₁₀ in inflammation and gene expression. *BioFactors* **2008**, *32*, 179-183.
- ¹¹⁷ Zhai J., Bo Y., Lu Y., Liu C., Zhang L. Effects of Coenzyme Q₁₀ on markers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170172.
- ¹¹⁸ Salviati L., Trevisson E., Doimo M., Navas P. Primary coenzyme Q10 deficiency [Internet] *Gene Reviews* **2017** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410087>.
- ¹¹⁹ Mero S., Salviati L., Leuzzi V., Rubegni A., Calderan C., Nardecchia F., Galatolo D., Desbats M.A., Naef V., Gemignani F., Novelli M., Tessa A., Battini R., Santorelli F.M., Marchese M. New pathogenic variants in COQ4 cause ataxia and neurodevelopmental disorder without detectable CoQ10 deficiency in muscle or skin fibroblasts. *J. Neurol.* **2021**, *268*, 3381-3389.
- ¹²⁰ Träschütz A., Schirinzi T., Laugwitz L., Murray N.H., Bingman C.A., Reich S., Kern J., Heinzmann A., Vasco G., Bertini E., Zanni G., Durr A., Magri S., Taroni F., Malandrini A., Baets J., de Jonghe P., de Ridder W., Bereau M., Demuth S., Ganos C., Basak N. Clinico-Genetic, Imaging and Molecular Delineation of COQ8A-Ataxia: A Multicenter Study of 59 Patients. *Ann. Neurol.* **2020**, *88*, 251-263.
- ¹²¹ Sadowski C.E., Lovric S., Ashraf S., Pabst W.L., Gee H.Y., Kohl S., Engelmann S., Vega-Warner V., Fang H., Halbritter J., Somers M.J., Tan W., Shril S., Fessi I., Lifton R.P., Bockenbauer D., El-Desoky S., Kari J.A., Zenker M., Kemper M.J., Mueller D., Fathy H.M., Soliman N.A., the SRNS Study Group, Hildebrandt F. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 1279-1289.
- ¹²² Li M., Yue Z., Lin H., Wang H., Chen H., Sun L. COQ2 mutation associated isolated nephropathy in two siblings from a Chinese pedigree. *Renal Failure* **2021**, *43*, 97-101.

- ¹²³ Perrin R.J., Rousset-Rouvière C., Garaix F., Cano A., Conrath J., Boyer O., Tsimaratos M. COQ6 mutation in patients with nephrotic syndrome, sensorineural deafness, and optic atrophy. *J. Inherit. Metab. Dis. Reports* **2020**, *54*, 37-44.
- ¹²⁴ Song X., Fang X., Tang X., Cao Q., Zhai Y., Chen J., Liu J., Zhang Z., Xiang T., Qian Y., Wu B., Wang H., Zhou W., Liu C., Shen Q., Xu H., Rao J. COQ8B nephropathy : early detection and optimal treatment. *Mol. Genet. Genomic Med.* **2020**, *8*, e1360.
- ¹²⁵ Sondheimer N., Hewson S., Cameron J.M., Somers G.R., Dunning Broadbent J., Ziosi M., Quinzii C.M., Naini A.B. Novel recessive mutations in COQ4 cause severe infantile cardiomyopathy and encephalopathy associated with CoQ₁₀ deficiency. *Mol. Genet. Metab. Reports* **2017**, *12*, 23-27.
- ¹²⁶ Quinzii C.M., Lopez L.C., Gilkerson R.W., Dorado B., Coku J., Naini A.B., Lagier-Tourenne C., Schuelke M., Salviati L., Carrozzo R., Santorelli F., Rahman S., Tazir M., Koenig M., DiMauro S., Hirano M. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ₁₀ deficiency. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3733-3743.
- ¹²⁷ Quinzii C.M., Lopez L.C., Von-Moltke J., Naini A., Krishna S., Schuelke M., Salviati L., Navas P., DiMauro S., Hirano M. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ₁₀ deficiency. *FASEB J.* **2008**, *22*, 1874-1885.
- ¹²⁸ Lopez-Martin J.M., Salviati L., Trevisson E., Montini G., DiMauro S., Quinzii C., Hirano M., Rodriguez-Hernandez A., Cordero M.D., Sanchez-Alcazar J.A., Santos-Ocana C., Navas P. Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and *de novo* pyrimidine synthesis. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 1091-1097.
- ¹²⁹ Rodriguez-Hernandez A., Cordero M.D., Salviati L., Artuch R., Pineda M., Briones P., Gómez Izquierdo L., Cotán D., Navas P., Sánchez-Alcázar J.A. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* **2009**, *5*, 19-32.
- ¹³⁰ Montero R., Grazina M., López-Gallardo E., Montoya J., Briones P., Navarro-Sastre A., Land J.M., Hargreaves I.P., Artuch R., Coenzyme Q₁₀ deficiency study group. Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 337-341.
- ¹³¹ Cotán D., Cordero M.D., Garrido-Maraver J., Oropesa-Ávila M., Rodríguez-Hernández A., Gómez Izquierdo L., De la Mata M., De Miguel M., Lorite J.B., Rivas Infante E., Jackson S., Navas P., Sánchez-Alcázar J.A. Secondary coenzyme Q₁₀ deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2669-2687.
- ¹³² Villanueva-Paz M., Povea-Cabello S., Villalón-García I., Álvarez-Córdoba M., Suárez-Rivero J.M., Talaverón-Rey M., Jackson S., Falcón-Moya R., Rodríguez-Moreno A., Sánchez-Alcázar J.A. Parkin-mediated mitophagy and autophagy flux disruption in cellular models of MERRF syndrome. *BBA – Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, 165726.
- ¹³³ Montero R., Pineda M., Aracil A., Vilaseca M.A., Briones P., Sánchez-Alcázar J.A., Navas P., Artuch R. Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q₁₀ deficiency. *Cerebellum* **2007**, *6*, 118-122.
- ¹³⁴ Yubero D., Montero R., Martín M.A., Montoya J., Ribes A., Grazina M., Trevisson E., Rodriguez-Aguilera J.C., Hargreaves I.P., Salviati L., Navas P., Artuch R., CoQ deficiency study group. Secondary coenzyme Q₁₀ deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. *Mitochondrion* **2016**, *30*, 51-58.
- ¹³⁵ Hargreaves I., Heaton R.A., Mantle D. Disorders of human coenzyme Q₁₀ metabolism : an overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6695.
- ¹³⁶ Desbats M.A., Lunardi G., Doimo M., Trevisson E., Salviati L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 145-156.
- ¹³⁷ Castellotti B., Mariotti C., Rimoldi M., Fancellu R., Plumari M., Caimi S., Uziel G., Nardocci N., Moroni I., Zorzi G., Pareyson D., Di Bella D., Di Donato S., Taroni F., Gellera C. Ataxia with oculomotor apraxia type1 (AOA1): novel and recurrent aprataxin mutations, coenzyme Q₁₀ analyses, and clinical findings in Italian patients. *Neurogenetics* **2011**, *12*, 193-201.
- ¹³⁸ Aeby A., Sznajder Y., Cavé H., Rebuffat E., Van Coster R., Rigal O., Van Bogaert P. Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q₁₀ deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2007**, *30*, 827.
- ¹³⁹ Gueguen N., Baris O., Lenaers G., Reynier P., Spinazzi M. Secondary coenzyme Q deficiency in neurological disorders. *Free Radical Bio. Med.* **2021**, *165*, 203-218.
- ¹⁴⁰ Martelli A., Testai L., Colletti A., Cicero A.F.G. Coenzyme Q₁₀ : clinical applications in cardiovascular diseases. *Antioxidants* **2020**, *9*, 341.
- ¹⁴¹ Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* **1989**, *24*, 579-584.
- ¹⁴² Hidaka T., Fujii K., Funahashi I., Fukutomi N., Hosoe K. Safety assessment of coenzyme Q₁₀. *BioFactors* **2008**, *32*, 199-208.
- ¹⁴³ Shults C., Beal M.F., Song D., Fontaine D. Pilot trial of high dosages of coenzyme Q₁₀ in patients with Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **2004**, *188*, 491-494.

- ¹⁴⁴ Emmanuele V., López L.C., Berardo A., Naini A., Tadesse S., Wen B., D'Agostino E., Salomon M., DiMauro S., Quinzii C.M., Hirano M. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 978-983.
- ¹⁴⁵ Public summary of opinion on orphan designation - Ubiquinol for the treatment of primary coenzyme Q₁₀ deficiency syndrome. [Internet] **2016** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3161765>.
- ¹⁴⁶ Ogasahara S., Engel A.G., Frens D., Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2379-2383.
- ¹⁴⁷ Rötig A., Appelkvist E.L., Geromel V., Chretien D., Kadhom N., Edery P., Lebideau M., Dallner G., Munnich A., Ernster L., Rustin P. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q₁₀ deficiency. *The Lancet* **2000**, *356*, 391-395.
- ¹⁴⁸ Montini G., Malaventura C., Salviati L. Early coenzyme Q₁₀ supplementation in primary coenzyme Q₁₀ deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2849-2850.
- ¹⁴⁹ Salviati L., Sacconi S., Murer L., Zacchello G., Franceschini L., Laverda A.M., Basso G., Quinzii C., Angelini C., Hirano M., Naini A.B., Navas P., DiMauro S., Montini G. Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ₁₀ deficiency: a CoQ₁₀-responsive condition. *Neurology* **2005**, *65*, 606-608.
- ¹⁵⁰ Garrido-Maraver J., Cordero M.D., Oropesa-Avila M., Vega A.F., de la Mata M., Delgado Pavon A., de Miguel M., Pérez Calero C., Villanueva Paz M., Cotan D., Sanchez-Alcazar J.A. Coenzyme Q₁₀ therapy. *Mol. Syndromol.* **2014**, *5*, 187-197.
- ¹⁵¹ Ogasahara S., Yorifuji S., Nishikawa Y., Takahashi M., Wada K., Hazama T., Nakamura Y., Hashimoto S., Kono N., Tarui S. Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q₁₀ in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* **1985**, *35*, 372-377.
- ¹⁵² Ihara Y., Namba R., Kuroda S., Sato T., Shirabe T. Mitochondrial encephalomyopathy (MELAS): pathological study and successful therapy with coenzyme Q₁₀ and idebenone. *J. Neurol. Sci.* **1989**, *90*, 263-271.
- ¹⁵³ Steele P.E., Tang P.H., DeGrauw A.J., Miles M.V. Clinical laboratory monitoring of Coenzyme Q₁₀ use in neurologic and muscular diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *121 (Suppl 1)*, S113-S120.
- ¹⁵⁴ Matthews P.M., Ford B., Dandurand R.J., Eidelman D.H., O'Connor D., Sherwin A., Karpati G., Andermann F., Arnold D.L. Coenzyme Q₁₀ with multiple vitamins is generally ineffective in treatment of mitochondrial disease. *Neurology* **1993**, *43*, 884-890.
- ¹⁵⁵ Pineda M., Montero R., Aracil A., O'Callaghan M.M., Mas A., Espinos C., Martinez-Rubio D., Palau F., Navas P., Briones P., Artuch R. Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up. *Mov. Disord.* **2010**, *25*, 1262-1268.
- ¹⁵⁶ Yubero D., Allen G., Artuch R., Montero R. The value of Coenzyme Q₁₀ determination in mitochondrial patients. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 37-47.
- ¹⁵⁷ Sladky J.T. Histopathological features of peripheral nerve and muscle in mitochondrial disease. *Semin. Neurol.* **2001**, *21*, 293-302.
- ¹⁵⁸ Allouche S., Schaeffer S., Chapon F. Les maladies mitochondriales de l'adulte : mise au point. *Rev. Med. Interne* **2021**, *42*, 541-557.
- ¹⁵⁹ Miles M.V., Miles L., Tang P.H., Horn P.S., Steele P.E., DeGrauw A.J., Wong B.L., Bove K.E. Systematic evaluation of muscle Coenzyme Q₁₀ content in children with mitochondrial respiratory chain enzyme deficiencies. *Mitochondrion* **2008**, *8*, 170-180.
- ¹⁶⁰ López L.C., Luna-Sánchez M., García-Corzo L., Quinzii C.M., Hirano M. Pathomechanisms in Coenzyme Q10-deficient human fibroblasts. *Mol. Syndromol.* **2014**, *5*, 163-169.
- ¹⁶¹ Quinzii C., Naini A., Salviati L., Trevisson E., Navas P., DiMauro S., Hirano M. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Human. Genet.* **2006**, *78*, 345-349.
- ¹⁶² Sato Y., Yokoyama S., Yamaki Y., Nishimura Y., Miyashita M., Maruyama S., Takekuma Y., Sugawara M. Enhancement of intestinal absorption of coenzyme Q₁₀ using emulsions containing oleyl polyethylene acetic acids. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **2020**, *142*, 105144.
- ¹⁶³ Arias A., Garcia-Villoria J., Rojo A., Bujan N., Briones P., Ribes A. Analysis of coenzyme Q(10) in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *908*, 23-26.
- ¹⁶⁴ Zhang Y., Liao X., Jiang Y., Lv X., Yu Y., Dai Q., Ao L., Tao L., Peng Z. Urinary coenzyme Q₁₀ as a diagnostic biomarker and predictor of remission in a patient with ADCK4-associated Glomerulopathy: a case report. *BMC Nephrol.* **2021**, *22*, 11.
- ¹⁶⁵ Compta Y., Giraldo D.M., Munoz E., Antonelli F., Fernandez M., Bravo P., Soto M., Camara A., Torres F., Martí M.J., on behalf of the Catalan MSA Registry (CMSAR). Cerebrospinal fluid levels of coenzyme Q₁₀ are reduced in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. D.* **2018**, *46*, 16-23.
- ¹⁶⁶ Duberley K.E.C., Hargreaves I.P., Chaiwatanasirikul K.A., Heales S.J.R., Land J.M., Rahman S., Mills K., Eaton S. Coenzyme Q10 quantification in muscle, fibroblasts and cerebrospinal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a novel deuterated internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 924-930.

- ¹⁶⁷ Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L., on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405-423.
- ¹⁶⁸ Ruiz-Jiménez J., Piego-Capote F., Mata-Granados J.M., Quesada J.M., Luque de Castro M.D. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q₁₀) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1175*, 242-248.
- ¹⁶⁹ Yamashita S., Yamamoto Y. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 66-73.
- ¹⁷⁰ Rouessac F., Rouessac A. Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales – 9^{ème} édition. **2019**. Dunod.
- ¹⁷¹ Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation – Guidance for industry. Mai 2018.
- ¹⁷² Menet M.C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires.* **2001**, *437*, 41-53.
- ¹⁷³ Huang E.C., Wachs T., Conboy J.J., Henion J.D. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 713-725.
- ¹⁷⁴ Interfaces for LCMS [Internet] **2021** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/interfaces_for_lcms.html#section2.
- ¹⁷⁵ Quadripôle – principe de fonctionnement [Internet] **2021** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : <http://cbm.cnrs-orleans.fr/5-quadripole>.
- ¹⁷⁶ Boja E.S., Rodriguez H. The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J. Lab. Med.* **2011**, *31*, 61-71.
- ¹⁷⁷ Claessens A.J., Yeung C.K., Risler L.J., Phillips B.R., Himmelfarb J., Shen D.D. Rapid and sensitive analysis of reduced and oxidized coenzyme Q₁₀ in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to studies in healthy human subjects. *Ann. Clin. Biochem.* **2016**, *53*, 265-273.
- ¹⁷⁸ Muraca R.F., Whittick J.S., Doyle Daves Jr G., Friis P., Folkers K. Mass spectra of ubiquinones and ubiquinols. *JACS* **1967**, *89*, 1505-1508.
- ¹⁷⁹ COFRAC Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Avril 2011 révision 01.
- ¹⁸⁰ Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- ¹⁸¹ Medja F., Allouche S., Frachon P., Jardel C., Malgat M., Mousson de Camaret B., Slama A., Lunardi J., Mazat J.P., Lombès A. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* **2009**, *9*, 331-339.
- ¹⁸² Finckh B., Kontush A., Commentz J., Hübner C., Burdelski M., Kohlschütter A. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsomes using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 210-216.
- ¹⁸³ Tang P.H., Miles M.V., Miles L., Quinlan J., Wong B., Wenisch A., Bove K. Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q₉ and coenzyme Q₁₀ levels in mouse tissues by HPLC with coulometric detection. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *341*, 173-184.
- ¹⁸⁴ Mosca F., Fattorini D., Bompadre S., Littarru G.P. Assay of Coenzyme Q₁₀ in plasma by a single dilution step. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 49-54.
- ¹⁸⁵ Karpinska J., Mikołuc B., Motkowski R., Piotrowska-Jastrzebska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and coenzyme Q₁₀ in human plasma. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2006**, *42*, 232-236.
- ¹⁸⁶ Paliakov E.M., Crow B.S., Bishop M.J., Norton D., George J., Bralley J.A. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 89-94.
- ¹⁸⁷ Turkowicz M.J., Karpinska J. Analytical problems with the determination of Coenzyme Q₁₀ in biological samples. *BioFactors* **2013**, *39*, 176-185.
- ¹⁸⁸ Mathieu Jr R.E., Riley C.P. Quantitation of ubiquinone (Coenzyme Q₁₀) in serum/plasma using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS). *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* **2016**, *1378*, chapitre 8, 61-69.
- ¹⁸⁹ Tang Z., Li S., Guan X., Schmitt-Kopplin P., Lin S., Cai Z. Rapid assessment of the coenzyme Q₁₀ redox state using ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, **2014**, *139*, 5600-5604.

- ¹⁹⁰ Strazisar M., Fir M., Golc-Wondra A., Milivojevic L., Prosek M. Quantitative determination of coenzyme Q₁₀ by liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in dairy products. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1020-1027.
- ¹⁹¹ Hansen G., Christensen P., Tüchsen E., Lund T. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q₁₀ in human serum by negative APCI LC-MS. *Analyst* **2004**, *129*, 45-50.
- ¹⁹² Pandey R., Riley C.L., Mills E.M., Tiziani S. Highly sensitive and selective determination of redox states of Coenzymes Q₉ and Q₁₀ in mice tissues: application of orbitrap mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* **2018**, *1011*, 68-76.
- ¹⁹³ Franke A.A., Morrison C.M., Bakke J.L., Custer L.J., Li X., Cooney R.V. Coenzyme Q₁₀ in human blood: native levels and determinants of oxidation during processing and storage. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 1610-1617.
- ¹⁹⁴ Lagendijk J., Ubbink J.B., Hayward Vermaak W.J. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q₁₀ in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 67-75.
- ¹⁹⁵ Guaras A., Perales-Clemente E., Calvo E., Acin-Pérez R., Loureiro-Lopez M., Pujol C., Martinez-Carrascoso I., Nunez E., Garcia-Marqués F., Rodriguez-Hernandez M.A., Cortés A., Diaz F., Pérez-Martos A., Moraes C.T., Fernandez-Silva P., Trifunovic A., Navas P., Vazquez J., Enriquez J.A. The CoQH₂/CoQ ratio serves as a sensor of respiratory chain efficiency. *Cell Reports* **2016**, *15*, 197-209.
- ¹⁹⁶ Kaikkonen J., Nyyssonen K., Salonen J.T. Measurement and stability of plasma reduced, oxidized and total coenzyme Q₁₀ in humans. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1999**, *59*, 457-466.
- ¹⁹⁷ Wang Z., Senn T., Kalthorn T., Zheng X.E., Zheng S., Davis C.L., Hebert M.F., Lin Y.S., Thummel K.E. Simultaneous measurement of plasma vitamin D₃ metabolites including 4β,25-dihydroxyvitamin D₃ using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011**, *418*, 126-133.
- ¹⁹⁸ Karpinska J., Mikołuc B., Piotrowska-Jastrzebska J. Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceuticals and plasma. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1998**, *17*, 1345-1350.
- ¹⁹⁹ Adamec J., Jannasch A., Huang J., Hohman E., Fleet J.C., Peacock M., Ferruzzi M.G., Martin B., Weaver C.M. Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D₂, vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 11-20.
- ²⁰⁰ Huang C.H., Kuo C.L., Huang C.S., Tseng W.M., Lian L.B., Chang C.C., Liu C.S. High plasma coenzyme Q₁₀ concentration is correlated with good left ventricular performance after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Medicine* **2016**, *95*, 31.
- ²⁰¹ Annual report 2020 – Special Assays in Serum [Internet] **2020** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : https://www.erndim.org/store/docs/AnnualReportSAS2020_V2-RUKAUGGU704203-09-02-2021.pdf.
- ²⁰² Puymirat E., Simon T., Cayla G., Cottin Y., Elbaz M., Coste P., Lemesle G., Motreff P., Popovic B., Khalife K., Labèque J.N., Perret T., Le Ray C., Orion L., Jouve B., Blanchard D., Peycher P., Silvain J., Steg P.G., Goldstein P., Guéret P., Belle L., Aissaoui N., Ferrières J., Schiele F., Danchin N., USIK, USIC 2000, and FAST-MI investigators. Acute myocardial infarction : changes in patient characteristics, management and 6-month outcomes over a period of 20 years in the FAST-MI program (French Registry of Acute ST-Elevation or NON-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation* **2017**, *35*, 569-582.
- ²⁰³ Blin P., Philippe F., Bouée S., Laurendeau C., Torreton E., Gourmelin J., Leproust S., Levy-Bachelot L., Steg P.G. Outcomes following acute hospitalised myocardial infarction in France: an insurance claims database analysis. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *219*, 387-393.
- ²⁰⁴ Cohn J.N., Ferrari R., Shape N. Cardiac remodelling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2000**, *35*, 569-582.
- ²⁰⁵ Bauters C., Dubois E., Porouchani S., Saloux E., Fertin M., de Groote P., Lamblin N., Pinet F. Long-term prognostic impact of left ventricular remodeling after a first myocardial infarction in modern clinical practice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0188884.
- ²⁰⁶ Xie M., Burchfield J.S., Hill J.A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* **2013**, *128*, 388-400.
- ²⁰⁷ Chow S.L., Maisel A.S., Anand I., Bozkurt B., de Boer R.A., Felker G.M., Fonarow G.C., Greenberg B., Januzzi Jr J.L., Kiernan M.S., Liu P.P., Wang T.J., Yancy C.W., Zile M.R. Role of biomarkers for the prevention, assessment and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **2017**, *135*, 1054-1091.
- ²⁰⁸ Fertin M., Dubois E., Belliard A., Amouyel P., Pinet F., Bauters C. Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **2012**, *110*, 277-283.

- ²⁰⁹ Holley C., Long E.K., Lindsey M.E., McFalls E.O., Kelly R.F. Recovery of hibernating myocardium: what is the role of surgical revascularization? *J. Card. Surg.* **2015**, *30*, 224-231.
- ²¹⁰ Pepe S., Marasco S.F., Haas S.J., Sheeran F.L., Krum H., Rosenfeldt F.L. Coenzyme Q₁₀ in cardiovascular disease. *Mitochondrion* **2007**, *7S*, S154-S167.
- ²¹¹ Cour M., Argaud L. Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation* **2010**, *19*, 185-190.
- ²¹² Zozina V.I., Covantev S., Goroshko O.A., Krasnykh L.M., Kukes V.G. Coenzyme Q₁₀ in cardiovascular and metabolic diseases: current state of the problem. *Curr. Cardiol. Rev.* **2018**, *14*, 164-174.
- ²¹³ Jafari M., Mousavi S.M., Asgharzadeh A., Yazdani N. Coenzyme Q₁₀ in the treatment of heart failure: A systematic review of systematic reviews. *Ind. Heart J.* **2018**, *70S*, S111-S117
- ²¹⁴ Mortensen A.L., Rosenfeldt F., Filipiak K.J. Effect of coenzyme Q₁₀ in Europeans with chronic heart failure: a subgroup analysis of the Q-SYMBIO randomized double-blind trial. *Card. J.* **2019**, *26*, 147-156.
- ²¹⁵ Ivanov A., Gorodetskaya E., Kalenikova E., Medvedev O. Single intravenous injection of CoQ₁₀ reduces infarct size in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *World J. Card. Dis.* **2013**, *3*, 1-7.
- ²¹⁶ Eleawa S.M., Alkhateeb M., Ghosh S., Al-Hashem F., Shatoor A.S., Alhejaily A., Khalil M.A. Coenzyme Q₁₀ protects against acute consequences of experimental myocardial infarction in rats. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2015**, *7*, 1-13.
- ²¹⁷ Liang S., Ping Z., Ge J. Coenzyme Q₁₀ regulates antioxidative stress and autophagy in acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *4*, 1-12.
- ²¹⁸ Huang C.H., Kuo C.L., Huang C.S., Tseng W.M., Lian B., Chang C.C., Liu C.S. High plasma coenzyme Q₁₀ concentration is correlated with good left ventricular performance after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Medicine* **2016**, *95*, 31-37.
- ²¹⁹ Singh R.B., Fedacko J., Mojto V., Pella D. Coenzyme Q₁₀ modulates remodeling possibly by decreasing angiotensin-converting enzyme in patients with acute coronary syndrome. *Antioxidants* **2018**, *7*, 99-109.
- ²²⁰ Fontaine F., Legallois D., Créveuil C., Chtourou M., Coulbault L., Milliez P., Hodzic A., Saloux E., Beygui F., Allouche S. Is plasma concentration of coenzyme Q₁₀ a predictive marker for left ventricular remodelling after revascularization for ST-segment elevation myocardial infarction? *Ann. Clin. Biochem.* **2021**, *58*, 327-334.
- ²²¹ Fragaki K., Chaussenot A., Benoist J.F., Ait-El-Mkadem S., Bannwarth S., Rouzier C., Cochaud C., Paquis-Flucklinge V. Coenzyme Q₁₀ defects may be associated with a deficiency of Q10-independent mitochondrial respiratory chain complexes. *Biol. Res.* **2016**, *49*, 4.
- ²²² Louw R., Smuts I., Wilsenach K.L., Jonck L.M., Schoonen M., van der Westhuizen F.H. The dilemma of diagnosing coenzyme Q10 deficiency in muscle. *Mol. Genet. Metabol.* **2018**, *125*, 38-43.
- ²²³ Gerards M., van den Bosch B., Calis C., Schoonderwoerd K., van Engelen K., Tijssen M., de Coo R., van der Kooi A., Smeets H. Nonsense mutations in *CABC1/ADCK3* cause progressive cerebellar ataxia and atrophy. *Mitochondrion* **2010**, *5*, 510-515.
- ²²⁴ Varsome [Internet] **2021** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : [https://varsome.com/variant/hg19/COQ9\(NM_020312.4\)%3A%3Ac.73G%3EA?annotation-mode=germline](https://varsome.com/variant/hg19/COQ9(NM_020312.4)%3A%3Ac.73G%3EA?annotation-mode=germline).
- ²²⁵ <https://gnomad.broadinstitute.org/>
- ²²⁶ Danhauser K., Herebian D., Haack T.B., Rodenburg R.J., Strom T.M., Meitinger T., Klee D., Mayatepek E., Prokisch H., Distelmaier F. Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a homozygous loss-of-function variant in *COQ9*. *Eur. J. Hum. Gen.* **2016**, *24*, 450-454.
- ²²⁷ Pastore A., Di Giovamberardino G., Bertini E., Tozzi G., Gaeta L.M., Federici G., Piemonte F. Simultaneous determination of ubiquinol and ubiquinone in skeletal muscle of pediatric patients. *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 352-355.
- ²²⁸ Fiche du Précis de Biopathologie [Internet] **2012** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/COENZYME_Q10.pdf.
- ²²⁹ Référentiel des examens CHU de Liège https://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_442253/fr/coenzyme-q10-sang (date de dernière consultation : 22/08/2021).
- ²³⁰ Miles M.V., Horn P.S., Morrison J.A., Tanga P.H., DeGrauw T., Pesce A.J. Plasma coenzyme Q₁₀ reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *332*, 123-132.
- ²³¹ Montero R., Yubero D., Salgado M.C., González M.J., Campistol J., O'Callaghan M., Pineda M., Delgado V., Maynou J., Fernandez G., Montoya J., Ruiz-Pesini E., Meavilla S., Neergheen V., García-Cazorla A., Navas P., Hargreaves I., Artuch R. Plasma coenzyme Q₁₀ status is impaired in selected genetic conditions. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 793.
- ²³² Kaikkonen J., Tuomainen T.P., Nyssonen K., Salonen J.T. Coenzyme Q₁₀: Absorption, antioxidative properties, determinants, and plasma levels. *Free Radical Res.* **2002**, *36*, 389-397.

- ²³³ Niklowitz P., Onur S., Fischer A., Laudes M., Palussen M., Menke T., Döring F. Coenzyme Q₁₀ serum concentration and redox status in European adults: influence of age, sex, and lipoprotein concentration. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2016**, 3, 240-245.
- ²³⁴ Hughes K., Lee B.L., Feng X., Lee J., Ong C.N. Coenzyme Q₁₀ and differences in coronary heart disease risk in Asian Indians and Chinese. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32, 132-138.
- ²³⁵ Montero R., Artuch R., Briones P., Nascimento A., Garcia-Cazorla A., Vilaseca M.A., Sanchez-Alcazar J.A., Navas P., Montoya J., Pineda M. Muscle coenzyme Q₁₀ concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *BioFactors* **2005**, 25, 109-115.
- ²³⁶ Ikonen O., Suomalainen A., Turpeinen U. Mitochondrial Coenzyme Q₁₀ determination by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* **2013**, 59, 1260-1267.
- ²³⁷ Sacconi S., Trevisson E., Salviati L., Aymé S., Rigal O., Redondo A.G., Mancuso M., Siciliano G., Tonin P., Angelini C., Auré K., Lombès A., Desnuelle C. Coenzyme Q₁₀ is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **2010**, 20, 44-48.
- ²³⁸ Träschütz A., Schirinzi T., Laugwitz L., Murray N.H., Bingman C.A., Reich S., Kern J., Heinzmann A., Vasco G., Bertini E., Zanni G., Durr A., Magri S., Taroni F., Malandrini A., Baets J., de Jonghe P., de Ridder W., Bereau M., Demuth S., Ganos C., Basak A.N., Hanagasi H., Kurul S.H., Bender B., Schöls L., Grasshoff U., Klopstock T., Horvath R., van de Warrenburg B., Burglen L., Rougeot C., Ewencyk C., Koenig M., Santorelli F.M., Anheim M., Munhoz R.P., Haack T., Distelmaier F., Pagliarini D.J., Puccio H., Synofzik M. Clinico-genetic, imaging and molecular delineation of COQ8A-ataxia: a multicenter study of 59 patients. *Ann. Neurol.* **2020**, 88, 251-263.
- ²³⁹ <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COQ8A> (date de dernière consultation)
- ²⁴⁰ Gerards M., van den Bosch B., Calis C., Schoonderwoerd K., van Engelen K., Tijssen M., de Coo R., van der Kooi A., Smeets H. Nonsense mutations in CABC1/ADCK3 cause progressive cerebella ataxia and atrophy. *Mitochondrion* **2010**, 10, 510-515.
- ²⁴¹ Stefely J.A., Reidenbach A.G., Ulbrich A., Orugent K., Floyd B.J., Jochem A., Saunders J.M., Johnson I.E., Minogue C.E., Wrobel R.L., Barber G.E., Lee D., Li S., Kannan N., Coon J.J., Bingman C.A., Pagliarini D.J. Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis. *Mol. Cell* **2015**, 57, 83-94.
- ²⁴² Stefely J.A., Licitra F., Laredj L., Reidenbach A.G., Kemmerer Z.A., Grangeray A., Jaeg-Ehret T., Minogue C.E., Ulbrich A., Hutchins P.D., Wilkerson E.M., Ruan Z., Aydin D., Hebert A.S., Guo X., Freiberger E.C., Reutenauer L., Jochem A., Chergova M., Johnson I.E., Lohman D.C., Rush M.J.P., Kwiecien N.W., Singh P.K., Schlagowski A.I., Floyd B.J., Forsman U., Sindelar P.J., Westphall M.S., Pierrel F., Zoll J., Dal Peraro M., Kannan N., Bingman C.A., Coon J.J., Isope P., Puccio H., Pagliarini D.J. Cerebellar ataxia and Coenzyme Q deficiency through loss of unorthodox kinase activity. *Mol. Cell* **2016**, 63, 608-620.
- ²⁴³ Duncan A.J., Bitner-Glindzicz M., Meunier B., Costello H., Hargreaves I.P., López L.C., Hirano M., Quinzii C.M., Sadowski M.I., Hardy J., Singleton A., Clayton P.T., Rahman S. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q₁₀ deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2009, 84, 558-566.
- ²⁴⁴ Smith A.C., Ito Y., Ahmed A., Schwartzentruber J.A., Beaulieu C.L., Aberg E., Majewski J., Bulman D.E., Horsting-Wethly K., Koning D.V., Rodenburg R.J., Boycott K.M., Penney L.S. A family segregating lethal neonatal coenzyme Q deficiency caused by mutations in COQ9. *J. Inher. Metab. Dis.* **2018**, 41, 719-729.
- ²⁴⁵ Olgac A., Öztoprak U., Kasapkara C.S., Kılıç M., Yüksel D., Derinkuyu E.B., Yıldız Y.T., Ceylaner S., Ezgu F.S. A rare case of primary coenzyme Q₁₀ deficiency due to COQ9 mutation. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2020**, 33, 165-170.
- ²⁴⁶ Lohman D.C., Forouhar F., Beebe E.T., Stefely M.S., Minogue C.E., Ulbrich A., Stefely J.A., Sukumar S., Luna-Sánchez M., Jochem A., Lew S., Seetharaman J., Xiao R., Wang H., Westphall M.S., Wrobel R.L., Everett J.K., Mitchell J.C., López L.C., Coon J.J., Tong L., Pagliarini D.J. Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *PNAS* **2014**, 111, E4697-E4705.
- ²⁴⁷ Lohman D.C., Aydin D., Von Bank H.C., Smith R.W., Linke V., Weisenhorn E., McDevitt M.T., Hutchins P., Wilkerson E.M., Wancewicz B., Russell J., Stefely M.S., Beebe E.T., Jochem A., Coon J.J., Bingman C.A., Dal Peraro M., Pagliarini D.J. An isoprene lipid-binding protein promotes eukaryotic Coenzyme Q biosynthesis. *Mol. Cell* 2019, 73, 763-774.
- ²⁴⁸ AlphaFold Protein Structure Database [Internet] **2021** [consulté le 27/09/2021]. Disponible sur : <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O75208>.
- ²⁴⁹ Luna-Sánchez M., Díaz-Casado E., Barca E., Tejada M.A., Montilla-García A., Cobos E.J., Escames G., Acuña-Castroviejo D., Quinzii C.M., López L.C. The clinical heterogeneity of coenzyme Q₁₀ deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene. *EMBO Mol. Med.* **2015**, 7, 670-687.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE PAR HPLC-MS/MS DU COENZYME Q10
PLASMATIQUE ET MUSCULAIRE

Résumé

Le Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) est un composant majeur de la membrane interne mitochondriale où il joue un rôle primordial dans le transport des électrons dans la chaîne respiratoire et dans la production d'ATP cellulaire. Les déficits primaires en CoQ₁₀ se caractérisent par une grande variabilité clinique, pouvant aller d'une myopathie ou d'une néphropathie isolée à une atteinte multisystémique avec encéphalomyopathie et ataxie cérébelleuse. En raison de cette variabilité phénotypique, les patients atteints d'un déficit en CoQ₁₀ souffrent souvent d'un retard au diagnostic alors que ces déficits sont les seules mitochondriopathies potentiellement traitables par supplémentation en CoQ₁₀. Des activités enzymatiques réduites des complexes I+III et II+III orientent vers un déficit en CoQ₁₀ mais seule la mise en évidence d'un déficit dans le muscle ou le plasma permet de confirmer le diagnostic. Dans ce contexte, nous avons mis au point une méthode de dosage du CoQ₁₀ plasmatique et musculaire par technique de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La validation de la méthode a été réalisée selon les exigences de la norme ISO 15 189. Cette étude nous a permis d'établir des intervalles de référence pour ce paramètre dans le plasma et le muscle, puis de confirmer le diagnostic de déficit en CoQ₁₀ chez un patient porteur d'une variation du gène *CoQ8A* et dans une fratrie porteuse d'une variation du gène *COQ9*. Notre étude montre l'importance d'inclure la quantification du CoQ₁₀ dans la démarche diagnostique des pathologies mitochondriales afin d'identifier les patients susceptibles de bénéficier d'une supplémentation en ubiquinone.

TITLE

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC-MS/MS ASSAY FOR PLASMA AND MUSCLE COENZYME Q10

Summary

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is a major component of the mitochondrial inner membrane where it plays a key role in the production of cellular ATP as an electron carrier in the respiratory chain. Primary CoQ₁₀ deficiency is characterized by great clinical variability, ranging from isolated myopathy or nephropathy to multisystem involvement with encephalomyopathy and cerebellar ataxia. Because of these different presentations, patients with CoQ₁₀ deficiency often suffer from delayed diagnosis but these diseases are the only mitochondrial pathologies that may benefit from CoQ₁₀ supplementation. Reduced enzymatic activities of complex I + III and II + III point to a CoQ₁₀ deficiency, but only the detection of reduced CoQ₁₀ levels in skeletal muscle or plasma can confirm the diagnosis. In this context, we developed a method for plasma and muscle CoQ₁₀ using high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Method validation was conducted following the ISO 15189 guidelines. This study allowed us to determine reference ranges for this parameter in plasma and muscle, then to confirm the diagnosis of CoQ₁₀ deficiency in a patient with a variant in *CoQ8A* gene and in siblings with a variant in *COQ9* gene. Our study shows the importance of including CoQ₁₀ quantification in the diagnostic process of mitochondrial pathologies in order to identify patients that may benefit from ubiquinone supplementation.

Mots-clés

Coenzyme Q₁₀, mitochondrie, HPLC-MS/MS, ubiquinone, chaîne respiratoire, maladie mitochondriale
