Liste des abréviations

AC : cylcarnitine

AG : acide gras

AG2 : acidémie/acidurie glutarique de type 2

AO : acidémie/acidurie organique

ßOAG : bêta oxidation des acides gras

CACT : carnitine/acylcarnitines translocase

CO : carnitine libre

CoA : coenzyme A

COFRAC : comité français d'accréditation

CPT1 : carnitine palmitoyltransferase de type 1

CPT2 : carnitine palmitoyltransferase de type 2

CQE : contrôle de qualité externe

CQI: contrôle de qualité interne

CT : carnitine totale

CV : coefficient de variation

DCI : dodecanoyl-CoA delta ismérase

EC: électrophorèse capillaire

EDTA : ethylene diamine tetra-acetic acid

ETF: electro transfer flavoprotein

ESI : electrospray ionisation

FAB: fast atom bombardment

FAD: flavine adénine dinucleotide

FI: fidélité intermédiaire

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

HAS: haute autorité de santé

HELLP syndrom: hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count

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

HPLC: chromatographie liquide à haute performance

LC: chromatographie liquide

LCAD: long chain acyl-CoA dehydrogenase

LCHAD: long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

LKAT: long chain 3-cetoacyl-CoA dehydrogenase

LOD: limit of detection

LOQ: limit of quantification

LSL: limite supérieure de linéarité

MADD: deficit multiple en acyl-CoA déshydrogénase

MCAD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase

MCD: muscular carnitine deficiency

MCKAT: medium chain 3-cetoacyl-CoA thiolase

MHM: maladie héréditaire du métabolisme

MIM: mendelian inheritance in man

MRM: multiple reaction moniotring

M/SCHAD: medium/short chain acyl-CoA dehydrogenase

MS: spectrométrie de masse

MIN: mort inattendue du nourrisson

MSMS: spectrométrie de masse en tandem

NAD: nicotinamide dinucleotide

OCTN: organic cation high affinity transporter

PCD: déficit primaire en carnitine

SCAD: short chain acyl-CoA dehydrogenase

SFEIM: société française des erreurs innées du métabolisme

TFP: protéine trifonctionnelle

TML: 6-N-triméthyl lysine

VLCAD: very long chain acyl-CoA dehydrogense

Plan

Introduction

Partie 1 Synthèse bibliographique

Partie 2 Partie expérimentale

Partie 3 Discussion

Conclusion

Bibliographie

Table des matières

Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) sont des maladies rares mais très diverses. On estime leur nombre à 500 (1). Cette diversité explique les difficultés dans leur diagnostic et leur traitement. Ces maladies sont dues à des mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies métaboliques.

Notre sujet concerne une partie de ces MHM : les anomalies de la bêta-oxydation des acides gras (ßOAG) et quelques aciduries/acidémies organiques, diagnostiquées par l'étude des acylcarnitines. On inclus dans le terme « ßOAG » le transport des acides gras dans la mitochondrie par la carnitine et la ß-oxydation de ceux-ci. Ces maladies entraînent l'accumulation toxique de certains métabolites et des déficits énergétiques. Leurs conséquences cliniques, biologiques et thérapeutiques dépendent du site du déficit et de la longueur de l'AG en cause. Bien que leur prévalence individuelle soit faible, on estime la prévalence collective de ces déficits de la ßOAG entre 1/5 000 à 1/10000 (2).

Du fait du rôle énergétique primordial des AG, tout déficit sur leur voie métabolique entraîne une carence énergétique avec diverses conséquences cliniques: hypoglycémie, rhabdomyolyse aiguë, défaillance cardiaque, faiblesse musculaire généralisée avec hypotonie et cardiomyopathie chronique hypertrophique ou dilatée (2). Des complications peuvent être associées : encéphalopathie hépatique, myopathie, cardiomyopathie aiguë, neuropathie, voire mort inattendue. Ces manifestations cliniques sont exacerbées ou induites par une situation de jeûne, une infection intercurrente, un stress, une exposition au froid, un régime riche en graisses (3). Elles peuvent se manifester tôt dans la vie du nouveau-né mais peuvent parfois se révéler plus tardivement. Le nombre de ces maladies pouvant être traitées s'accroît mais la qualité du traitement dépend étroitement de la rapidité du diagnostic et d'une coopération entre cliniciens et biochimistes spécialisés (1). En situation aiguë, l'urgence est de fournir du glucose comme substrat énergétique et de traiter la carence induite en carnitine. Le traitement de fond repose sur la prévention du jeûne et un régime contrôlé et adapté en graisses et en glucides (2).

Ces traitements sont expliqués par les rôles physiologiques de la carnitine et de la ßOAG mitochondriale. La carnitine (3-hydroxy-4-N-triethylamino butyrate), découverte au début du XXème siècle, est une molécule endogène présente dans la plupart des tissus animaux. Elle a un rôle primordial dans le métabolisme des AG et dans la production d'énergie des cellules

puisqu'elle sert au transport des AG entre les organelles cellulaires. Elle est surtout connue pour le transport des AG à longue chaîne dans la mitochondrie, permettant leur ß oxydation. La carnitine est apportée par l'alimentation (viande et produits laitiers) et par synthèse endogène à partir de L-lysine et L-methionine dans le foie et les reins principalement (4)(5). La carnitine joue aussi un rôle de « détoxification » en transportant hors de la mitochondrie des fragments d'AG partiellement oxydés lors de leur ß oxydation. Cette fonction est primordiale car elle permet d'évacuer sous forme d'acylcarnitines les acyl-CoA qui s'accumulent pathologiquement lors d'un déficit enzymatique sur cette voie (6). Trois enzymes sont nécessaires à ce transport : la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1), la carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) et la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2) (7).

La ßOAG comporte au moins 25 enzymes (8) et transporteurs spécifiques. Une séquence de quatre réactions caractérise la ß-oxydation mitochondriale des AG: c'est l'hélice de Lynen. Chaque tour d'hélice libère un acétyl-CoA qui sera utilisé à des fins énergétiques (oxydation, cétogénese).

La première démonstration d'un déficit de la ßOAG date de 1973 : DiMauro a décrit un déficit en Carnitine Palmitoyltransférase 2 (CPT2) (9), puis dix ans se sont écoulés avant la description du déficit en déshydrogenase des acyl-CoAs à chaîne moyenne (medium chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD) en 1983 (10).

Actuellement, sont dénombrés 18 déficits affectant de manière directe ou indirecte la ßOAG (3).

L'utilisation récente de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de mesurer à partir d'une seule tâche de sang (papier buvard Guthrie) différents métabolites dont les AC et les acides aminés sanguins. Le diagnostic de plus de vingt MHM est ainsi possible et certains pays l'ont intégré dans leur dépistage néonatal (11). Par exemple, le Royaume –Unis a reconnu l'intérêt du dépistage du déficit en MCAD dans une revue systématique de 2004, issue des travaux de la National Health Service (12). En France, des recommandations de la HAS émises en juillet 2011 préconisent le dépistage systématique de la MCAD (13).

La recherche d'anomalies de la ßOAG dépasse le cadre du dépistage. L'analyse des acylcarnitines fait partie du bilan devant de nombreuses situations cliniques y compris chez l'adulte ou en post-mortem. La matrice est alors souvent du plasma et non du sang total séché sur buvard. Les études concernant le dosage des acylcarnitines sur plasma sont plus rares (normales physiologiques, valeurs seuil de décision médicales…) et des méthodes de dosage adaptées doivent être développées dans les laboratoires. Pour exemple, la demande de dosage plasmatique des acylcarnitines au CHU d'Angers a été multipliée par 35 entre 2008 et 2012.

Actuellement, c'est le profil des acylcarnitines qui est effectué, avec une estimation de leur concentration par calcul de proportionnalité par rapport à un étalon interne. L'enjeu est donc de proposer un dosage quantitatif vrai avec étalonnage externe. Dans cette méthode, les échantillons ne seront pas dérivatisés par butylation pour éviter l'hydrolyse partielle des acylcarnitines et pour réduire leur temps de préparation. Le gain de sensibilité qui était obtenu grâce à la butylation (14) devra être compensé par un spectromètre de masse plus sensible, de génération récente. Nous disposons de deux spectromètres de masse (LC-MS/MS) de génération récente au laboratoire et nous déterminerons celui qui aura les meilleures performances pour ce dosage, avec notre méthode. Nous nous appuierons sur la méthode de dosage actuellement utilisée à l'hôpital Necker à Paris (Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme) pour mettre au point, adapter et valider la méthode dans notre laboratoire malgré les contraintes externes (absence de contrôles de qualité sur plasma, coût des réactifs, nécessité d'un personnel hautement qualifié …) et internes (disponibilité limitée des spectromètres de masse, contraintes techniques et humaines…).
Comment mettre au point cette méthode? Comment maîtriser effet matrice, suppression d'ionisation et autres difficultés liées à la technique ? Quelle stratégie utiliser pour la valider ? Peut-on établir une approximation des valeurs de références biologiques internes au laboratoire?
Nous avons choisi de procéder à des tests complémentaires simples lorsque la littérature ne répond pas à nos interrogations quotidiennes. Par exemple, le recueil de plasma témoin est parfois réalisé plusieurs heures après la centrifugation : les AC sont-ils stables dans le temps ?
Pour la validation de méthode, nous nous appuierons sur le Guide Technique d'Accréditation des Méthodes en Biologie Médicale du COFRAC (15)et sur les recommandations de la FDA (16).

L'objectif principal est de mettre au point et valider une méthode de dosage quantitative vraie sans dérivatisation des acylcarnitines dans le plasma. Les objectifs secondaires sont d'établir une approximation des valeurs de référence biologiques (ou « normales physiologiques ») internes au laboratoire grâce aux échantillons de la sérothèque, d'obtenir des données sur la stabilité des acylcarnitines dans le plasma avant congélation, et d'avancer dans le processus d'accréditation en portée B de ce dosage (norme ISO15189).

Ce travail de mise au point de méthode n'a été effectué que pour certains acylcarnitines et il sera nécessaire de le poursuivre pour les autres espèces nécessaires au diagnostic de ces pathologies.

Notre souhait est de répondre à la demande des cliniciens en proposant un dosage quantitatif des acylcarnitines plasmatiques performant dans les valeurs proches des seuils de décisions médicales. En effet, si l'augmentation franche d'une espèce est largement décelée sur un profil couplé à une analyse semi-quantitative de celle-ci., les augmentations faibles de certaines espèces dans les formes atypiques et dans les formes secondaires nécessitent une méthode quantitative précise. Celle-ci nous permettra d'améliorer le diagnostic des anomalies de la ßOAG. Nous espérons aussi que les performances de ce dosage permettront une utilisation en recherche de notre outil, par exemple dans les études sur le dépistage des états pré diabétiques (17)

Dans la première partie bibliographique, nous aborderons le métabolisme de la carnitine, la β-oxydation des acides gras et les MHM dont le diagnostic nécessite une étude des acylcarnitines. Nous consacrerons un chapitre à la spectrométrie de masse et à l'HPLC. Dans la seconde partie, nous exposerons la méthode mise au point et les résultats que nous avons obtenus. Dans la troisième partie, nous discuterons ces résultats afin de procéder à l'état des lieux de la technique à l'heure actuelle au CHU d'Angers. Nous ciblerons ses limites et les objectifs qu'il reste à atteindre pour proposer, en concertation avec les cliniciens, la meilleure expertise possible pour le patient, de manière compatible avec nos limites technologiques, humaines et économiques.

Rapport-Gratuit.com

Partie 1 Revue de la littérature

Chapitre 1 La carnitine

1.1 Historique et aspects généraux

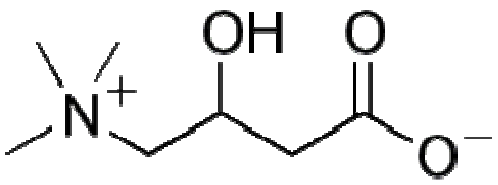
La carnitine (du latin *carnus* : viande) est une molécule ubiquitaire que l'on retrouve dans les tissus des mammifères. Elle a été découverte dans des extraits de muscle squelettique par Gulewitsch et Krimberg en 1905 (18).

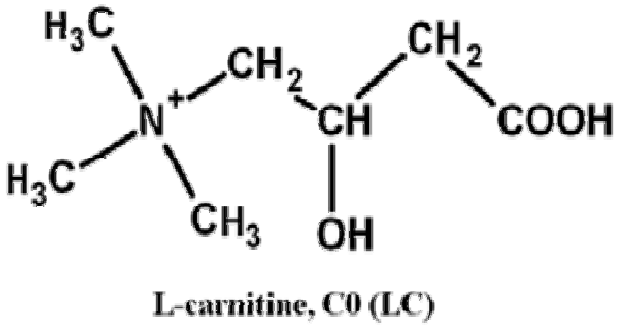
Sa structure chimique, C7H15NO3, a été établie en 1927 par Tomita et Sendju (19).

La carnitine est biologiquement active sous sa forme lévogyre. Elle est présente dans l'organisme sous ses deux formes : L- et D-carnitine.

C'est une petite molécule ayant un poids moléculaire d'environ 161,2 .Elle comprend une fonction ammonium quaternaire et est hydrosoluble.

Dans les années 1950, la carnitine a pris l'appellation de « vitamine Bt » en référence à son rôle de facteur de croissance chez le verre de terre *Tenebrio molitor*(20).





L-carnitine, C0 (LC)

Figure 1- La structure de la carnitine, formule développée, d'après (5)

Les premiers cas de pathologies concernant la carnitine dans le cadre de la ßOAG datent de 1973 : Engel et Angelini décrivirent un déficit en carnitine (21) et Di Mauro et Di Mauro un déficit en CPTII (9).

La carnitine est retrouvée quasiment chez toutes les espèces animales ainsi que chez les plantes. Les concentrations sont cependant très variables selon les tissus et les espèces. La carnitine est distribuée dans tout l'organisme. Certains tissus contiennent plus de 95% du stock total de carnitine, comme le cœur et les muscles squelettiques, principaux consommateurs de carnitine. Ils contiennent 1570 à 3010 nmol de carnitine par gramme de tissu. Le foie, principal lieu de synthèse, est le troisième organe contenant le plus de carnitine. Le plasma contient environ 0.6% du pool total de carnitine, ce qui correspond à une concentration de 36 à 56 µmol/L (22)(23).
Les mammifères sont capables de synthétiser de la carnitine à partir d'acides aminés (L-methionine et L-lysine). Les principaux sièges de synthèse endogène sont le foie, le rein et le cerveau (24). La majorité des apports (75%) est d'origine exogène. La viande, surtout la viande rouge et le poisson, sont les principales sources de carnitine, puis les produits laitiers dans une moindre mesure (25).

Tableau I : Contenu des aliments en carnitine, d'après(24)

ALIMENT	Carnitine totale (µmol) pour 100g d'aliment
Steack préparé	525
Poulet préparé	60
Riz	44
Pain	10.9
Poires	17
Tomates	18
Petits pois	5
Epinards, salade, carottes, pommes de terre	0

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chez les sujets végétariens et végétaliens, les taux de carnitine sont bas mais ils restent dans les limites physiologiques (26). La biosynthèse de carnitine peut fournir jusqu'à 90% des besoins d'un organisme n'ayant que très peu d'apports exogènes(27).
Certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia Coli* utilisent la carnitine comme source de carbone ou d'azote dans des conditions aérobies. D'autres utilisations sont possibles dans des conditions anaérobies (28).

1.2 Biosynthèse de la L-carnitine (29)

La synthèse de L-carnitine comprend, de façon schématique, cinq étapes.
Les substances initiales sont la méthionine et des dérivés de la lysine.

1 : Le produit de la première réaction est la 6-N-triméthyl lysine (TML). Il s'agit de la N-méthylation de la lysine. Elle est libérée via la protéolyse dans les lysosomes.

2 : Le produit de la seconde réaction est la 3-hydoxy-6-N-TML (HTML). Elle survient dans le cytosol par hydroxylation du carbone 3 de la TML par l'enzyme TML-dioxygénase (TMLD). Cette étape nécessite la présence de vitamine C (30), de fer ferreux (Fe 2+).

3 : Sous l'action de l'HTML-aldolase et du cofacteur PLP (pyridoxal 5'- phosphate), le triméthyl-aminobutyraldéhyde (TMABA) est formé. Cette réaction nécessite la présence de vitamine B6.

4 : La TMABA-déshydrogénase (TMABA-OH) transforme le TMABA en butyrobétaine (4-N-triméthylaminobutyrate)

5 : La butyrobétaine dioxygénase (BBD)/ deoxy L-carnitine hydoylase transforme la butyrobétaine en L-carnitine, en présence de vitamine C et de fer ferreux (Fe2+)(13).
Alors que les quatre premières étapes peuvent se produire dans toutes les cellules de l'organisme, l'ultime réaction ne peut intervenir que dans certains organes : le foie et le rein chez l'homme. L'enzyme catalysant cette réaction n'a été retrouvée que dans ces organes.
La disponibilité des TML déterminerait le taux de synthèse de la carnitine (27).

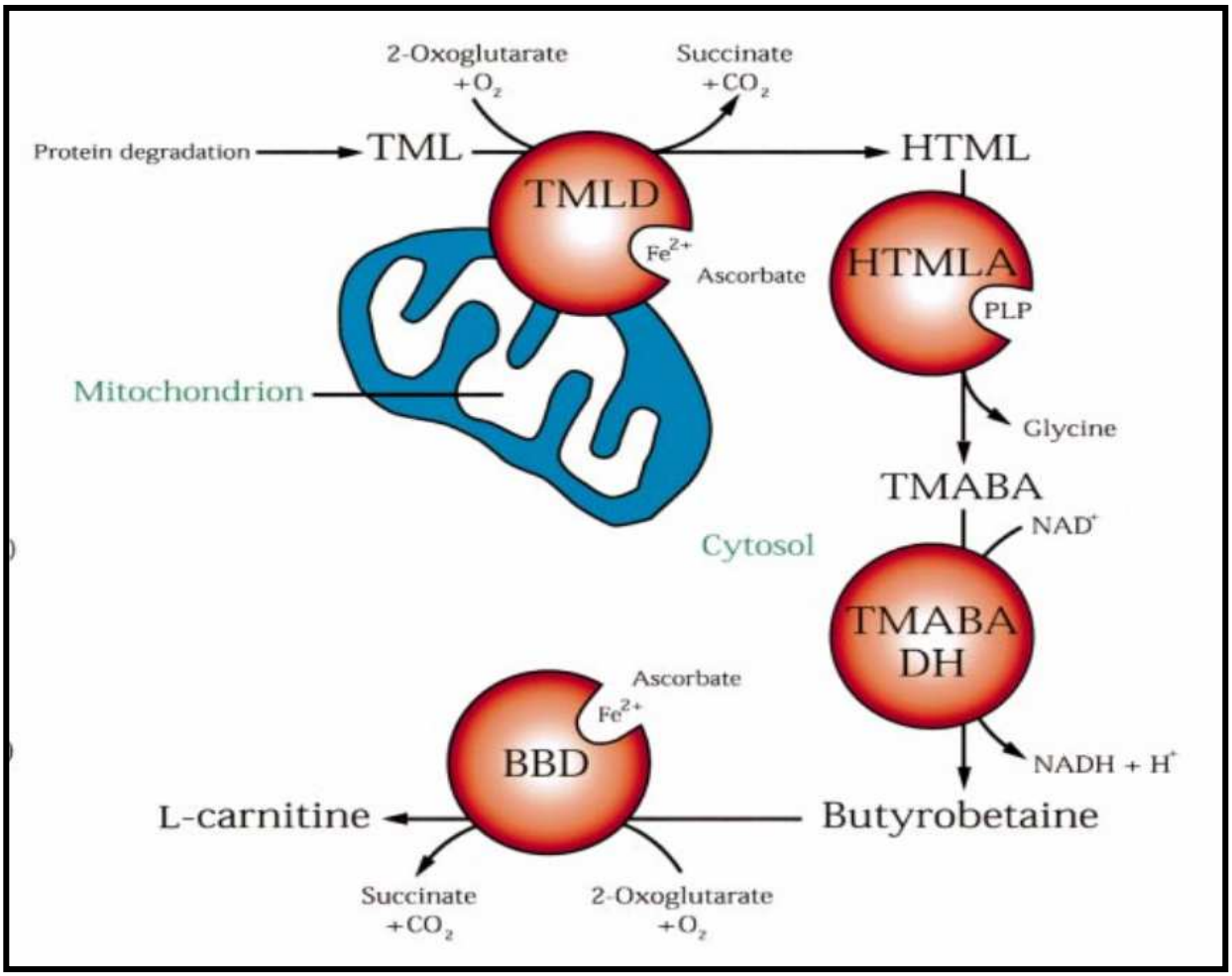
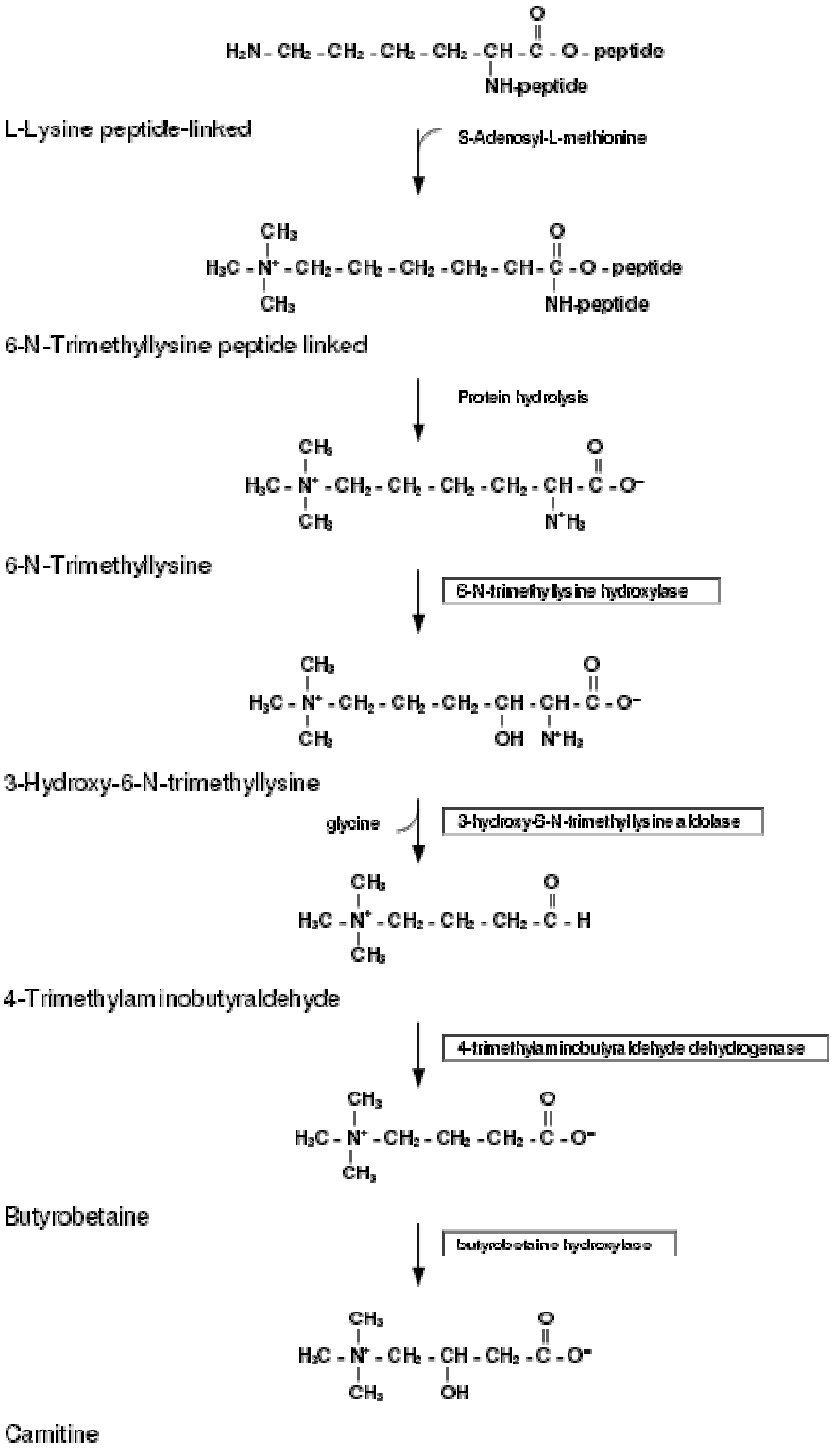


Figure 2: Biosynthèse de la carnitine à partir du TML (6-N-triméthyl lysine) d'après (29).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



<u>Figure 3: Etapes de la biosynthèse de la carnitine, structures chimiques des métabolites de cette biosynthèse</u>, d'après (31).

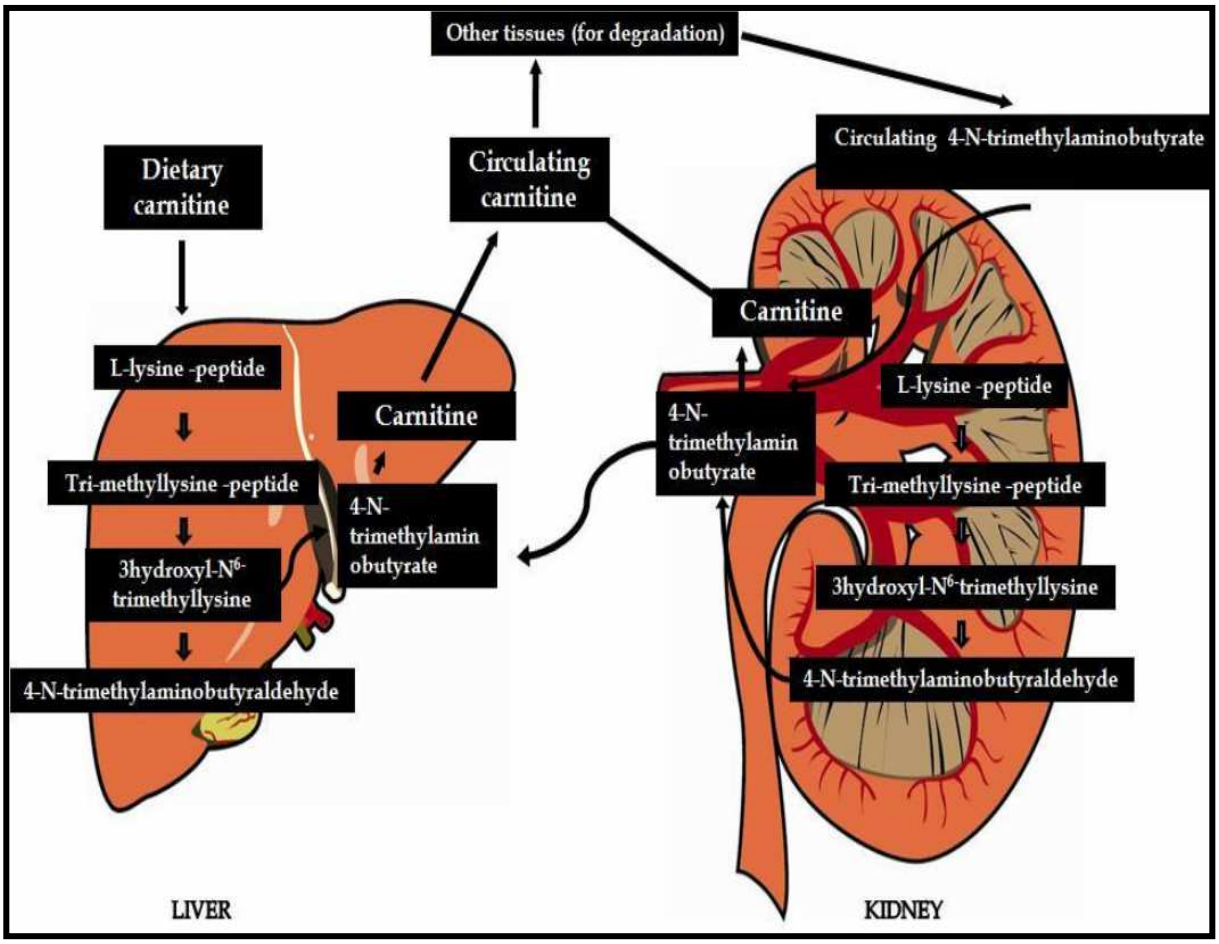


Figure 4: Synthèse et métabolisme de la carnitine, d'après (32)

1.3 Rôles de la carnitine

En 1995, il a été montré que la carnitine pouvait être acétylée de manière réversible par l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (33). La même année, il fut montré que la carnitine stimulait l'oxydation des acides gras dans le foie (34). C'est à partir de ces constatations que fut découverte l'implication de la carnitine dans le transport des acides gras à longues chaînes activés, depuis le cytosol, à travers les membranes mitochondriales, jusque dans la matrice mitochondriale, lieu de la ß oxydation des acides gras.

1.3.1 Transport des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie, lieu de leur oxydation (**figure 6**)

Le métabolisme des acides gras a lieu dans la matrice mitochondriale. Cependant, la membrane interne est imperméable aux acides gras. La carnitine transporte alors les acides gras à longues chaînes jusqu'à la matrice. Ce processus implique diverses enzymes.

Les acides gras à longues chaînes sont d'abord activés par la PCS (palmitoyl-CoA synthetase) en acyl-CoA. La PCS est située sur le versant externe de la membrane externe de la mitochondrie. Ces esters CoA présents dans le cytosol passent la membrane externe mais ils doivent être trans-ésterifiés en acylcarnitines à longues chaînes pour traverser la membrane interne. Dans cette réaction, la partie acyl des acides gras à longues chaînes est transférée du CoA vers le groupe hydroxyl de la carnitine (**figure 5**) .Cette étape est catalysée par la CPT 1 (palmitoyltransférase 1), située sur le versant interne de la membrane externe (7).

Ces acylcarnitines à longues chaînes entrent alors dans l'espace intermembranaire et sont transportés à travers la membrane interne via un transporteur spécifique : la CACT (Carnitine Acylcarnitine Translocase) (35).

Une fois à l'intérieur de la matrice, la CPT 2 (carnitine palmitoyltransférase 2) reconvertit les acylcarnitines à longues chaînes en acyl-CoA à longues chaînes respectifs. La CPT 2 est située sur le versant matricielle de la membrane interne.

Les acyl-CoA à longues chaînes libérés subissent alors leur ß-oxydation intramitochondriale. Une partie de la carnitine libérée dans la matrice mitochondriale quitte la mitochondrie via la CACT. Elle se retrouve de nouveau disponible dans le cytosol pour un nouveau cycle de transport. Une autre partie de la carnitine libre est utilisée pour former des acylcarnitines à courtes et moyennes chaînes grâce à la CAT (Carnitine Acétyl Transférase), à partir des produits libérés au cours de la ß-oxydation des acides gras à longues chaînes. Ces acylcarnitines peuvent aussi quitter la mitochondrie via la CACT. A travers ces mécanismes d'acylations réversibles, la carnitine est capable de réguler la concentration intarcellulaire du CoA libre et des acyl-CoA (29).

Trois différents groupes de transférases existent et se distinguent par leur substrat, leur localisation cellulaire et leur structure (36). L'action d'une tranférase est la suivante :

Acyl-CoA + carnitine $\leftrightarrows$ Acylcarnitine + CoASH

Les CPT 1 et 2 utilisent les groupes acyl à longues chaînes et se trouvent dans la mitochondrie (37).

La carnitine octanoytransferase (COT) utilise les acyls à moyennes chaînes comme substrats et est retrouvée dans les peroxysomes et les microsomes (37).

La carnitine acétyltransférase (CAT) utilise les groupes acyls à courtes chaînes et est retrouvée dans la mitochondrie, les peroxysomes et les microsomes (38).

Grâce à l'action des transférases, carnitine et acylcarnitines sont rapidement interchangeables (36).

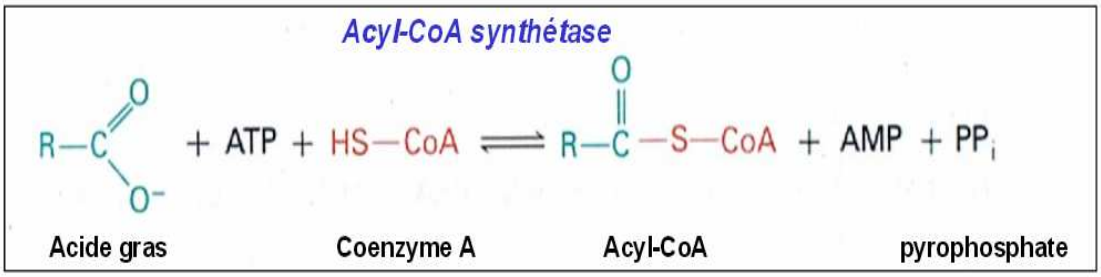


Figure 5: Schéma de l'activation des acides gras par liaison avec le coenzyme A, avec utilisation d'ATP, http://kiosque.luminy.univ-mrs.fr/upload/p222/07_AcidesGrasL2.pdf

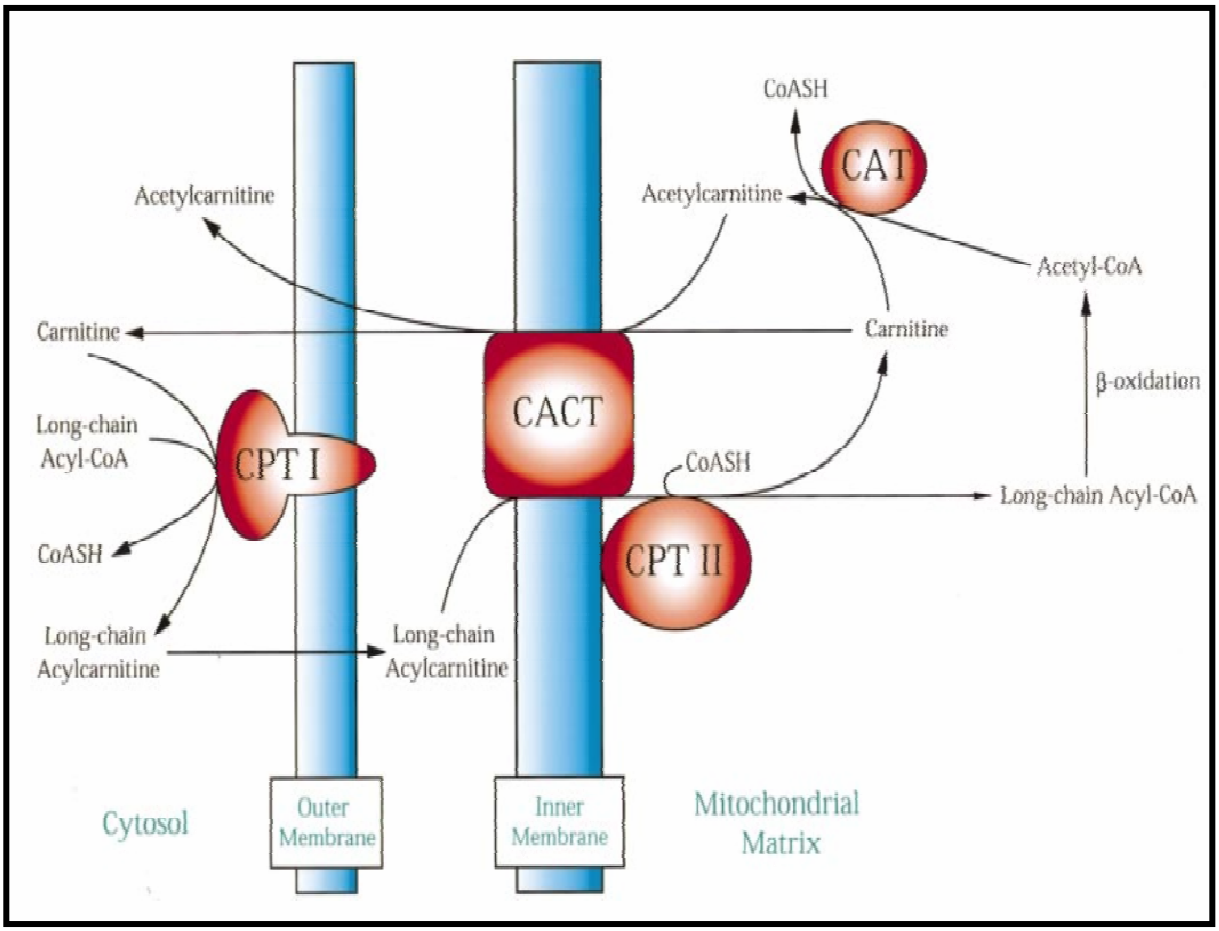


Figure 6 : Rôle de la carnitine dans le transport oxydatif des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie et dans la régulation du ratio acyl-CoA/CoA intramitochondrial, d'après (29).

1.3.2 Régulation du ratio acyl-CoA/CoA dans la mitochondrie

Des études suggèrent que la carnitine agit comme un tampon pour le CoA libre (39)(4). La carnitine a un rôle de transporteur à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie : les acyl – CoA et les acétyl-CoA sont transformés de manière réversible en acylcarnitines et acétylcarnitines. Cette action permet la régulation des concentrations intracellulaires an acétyl-CoA / CoA libre et acyl-CoA / CoA libre (40). Le pool de L-carnitine reflèterait alors le pool de CoA. Les échanges réversibles permettraient donc à la cellule de réguler ses niveaux de CoA en utilisant la carnitine comme tampon (39).

Ainsi, les pools d'acyl-CoA et d'acétyl-CoA peuvent rejoindre de nombreux processus métaboliques, en tant que substrats (cycle de Krebs, ß-oxydation des acides gras, cétogénèse… **Figure 7**).

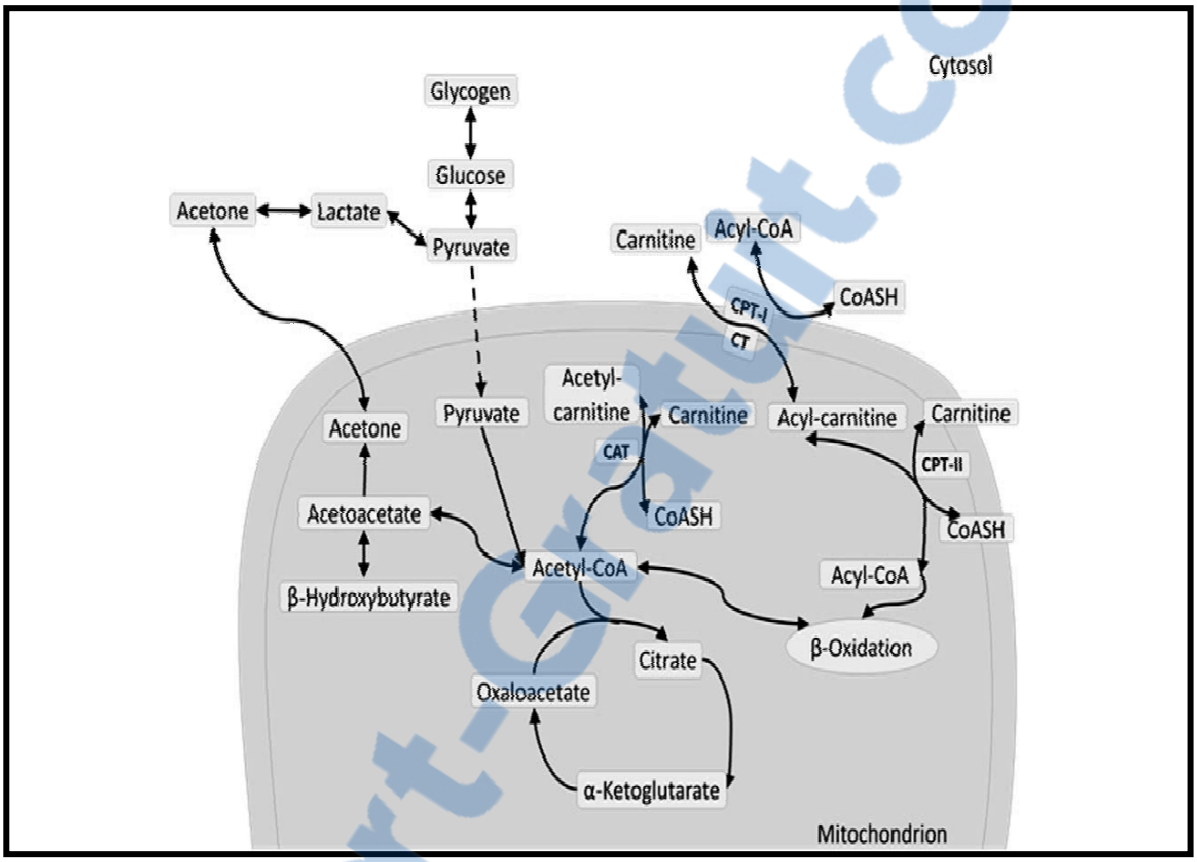


Figure 7: La carnitine au milieu des différentes voies du métabolisme énergétique, d'après (5)

1.3.3 Détoxification de métabolites pouvant être toxiques

Lorsque les acyl-CoA s'accumulent dans la mitochondrie en cas d'anomalie de la ß-oxydation des acides gras (6) ou en cas d'intoxication par certains résidus acylés issus de médicaments faiblement métabolisés (acide pivalique, valproate…) (41), le mécanisme de détoxification par la carnitine devient indispensable.

En effet, la carnitine transporte des fragments acylés issus de la ß-oxydation des acides gras ou issus d'un métabolisme partiel de médicaments hors de la mitochondrie et des peroxysomes. Ils sont alors évacués de la mitochondrie vers le cytosol sous forme d'acylcarnitines. Ils sont ensuite excrétés dans les urines. Cette action permet de régénérer le

Rapport-Gratuit.com

pool de CoA libre mais elle entraîne une déplétion en carnitine qui peut être traitée par une supplémentation en carnitine (42). L'hypocarnitinémie peut donc être le reflet d'une anomalie de la ß-oxydation des acides gras ou d'une intoxication par certaines molécules.
Dans d'autres situations pathologiques comme certaines aciduries organiques, la carnitine joue aussi un rôle d'épurateur. La décarboxylation oxydative de certains acides aminés ramifiés (dérivés de la leucine et de la valine) entraîne une production de groupes acylés qui sont transportés hors de la mitochondrie sous forme d'acylcarnitines. Ils sont ensuite éliminés dans les urines (40).
Cette voie de détoxification a récemment été accusée de jouer un rôle dans la pathogénie du diabète de type II et de l'insulino-résistance (43)(44)(45). Ces conditions pathologiques sont caractérisées par une accumulation d'acides gras dans la mitochondrie dépassant les capacités métaboliques d'épuration. Cet état est reflété par une augmentation des acylcarnitines plasmatiques et une baisse de la carnitine libre. De nouvelles approches thérapeutiques préconisent d'obtenir des taux élevés de carnitine, permettant l'exportation des acylcarnitines hors de la mitochondrie (46).

1.3.4 Oxydation des acides gras dans les peroxysomes

La carnitine est impliquée dans le transport de produits résultant de la ß-oxydation peroxysomale vers la mitochondrie. Cette ß-oxydation peroxysomale est moins complète que dans la mitochondrie et ne nécessite pas de carnitine pour assurer la transport des acides gras : sa membrane est dotée d'une perméase pour tous les acyl-CoAs (36). Les acides gras à très longues chaînes (C> 22) sont seulement dégradés en plus petits acides gras. Ces acides gras raccourcis doivent être transportés dans la mitochondrie pour subir la suite de leur oxydation.
A cet effet, les peroxysomes contiennent de la CAT et de la COT afin de convertir les acyl-CoA raccourcis en acylcarnitines en chaînes raccourcies, qui seront transportés dans la mitochondrie (47).

1.3.5 Neuroprotection

L'importance des acylcarnitines dans les tissus ayant une forte activité de ßOAG comme le cœur ou les muscles est évidente. La supplémentation en carnitine et acylcarnitines a montré

de réels bénéfices dans le traitement d'affections neurologiques diverses, alors que les acides gras ne sont pas la source majeure d'énergie pour le cerveau. Des données récentes mettent en évidence divers rôles des acylcarnitines cérébraux : participation à la synthèse de lipides, à l'altération et à la stabilisation de la composition membranaire, modulation de gènes et de protéines, amélioration des fonctions mitochondriales, augmentation de l'activité antioxydante et amélioration de la neurotransmission cholinergique (5). De plus amples recherches sont nécessaires sur l'utilisation des acylcarnitines dans le traitement des affections neurologiques.

1.3.6 Autres fonctions

La carnitine est impliquée dans la stabilisation des membranes (système cardiovasculaire) (48) et dans la métabolisme des phospholipides de la membrane des globules rouges (40)(49). La CPT aurait également un rôle dans le processus de dé/ré-acylation des phospholipides membranaires du globule rouge en permettant de réduire sa fragilité membranaire (49).

1.4 Régulation de la carnitine dans l'organisme

1.4.1 Aspects généraux

Le pool de carnitine endogène doit être maintenu de façon stable dans l'organisme. Il est constitué par la carnitine ingérée, la carnitine synthétisée de manière endogène par le foie et les reins, et la carnitine réabsorbée au niveau des tubules rénaux. Le rein permet de maintenir l'homéostasie de la carnitine. Comme la butyrobétaïne, la carnitine est réabsorbée efficacement par le rein. Cependant, l'excrétion urinaire de carnitine est largement dépendante du régime alimentaire et le rein peut réduire de manière importante la réabsorption de carnitine en cas d'apports excessifs en carnitine ou l'augmenter (50). De même, pendant la grossesse, l'excrétion urinaire augmente (51).
Dans les urines, les acylcarnitines représentent 56% de la carnitine totale alors que dans le plasma, les acylcarnitines ne représentent que 22% de la carnitine totale. Ceci pourrait être

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

expliqué par une réabsorption moindre des acylcarnitines par le rein ou par une acylation rénale de la carnitine (52).
La carnitine est aussi excrétée dans le lait. Sa concentration passerait de 39 à 63µmo/l la première semaine du post-partum et se stabiliserait à 45µmol/l après un mois (53).

La répartition de la carnitine dans la plupart des tissus est assurée par des systèmes de transport et d'échanges. Ces échanges permettent l'obtention de concentrations très élevées dans les tissus, soit 20 à 50 fois les concentrations plasmatiques (29).
Le passage de la carnitine du sang vers les organes doit donc être régi par des systèmes de transports actifs pour lutter contre le gradient de concentration.

1.4.2 Le transport de la carnitine vers les tissus périphériques

Le cœur et les muscles squelettiques, sites majeurs de consommation et de stockage de la carnitine (95% du pool de l'organisme) possèdent à la fois des transporteurs de la carnitine de haute et de faible affinité (54).
Les reins, capables de réabsorber plus de 90% de la carnitine, possèdent aussi ces deux types de transporteurs (15). Plus récemment, d'autres types transporteurs de la carnitine ont été décrits.
On distingue d'abord la famille des transporteurs des cations organiques (Organic Cation high affiniy Transporters OCT). Leur fonction première est l'élimination de certains médicaments. Les transporteurs OCTN2 de haute affinité, OCTN1 de faible affinité et OCTN3 d'affinité intermédiaire font partie de cette famille (55).
OCNT2 et OCNT1 sont très fortement exprimés dans le tissu rénal et seraient aussi fortement exprimés dans le muscle squelettique (56), mais les études à ce sujet sont contradictoires (57). Ils transportent aussi les acylcarnitines C2 et C3.
Un autre transporteur de la carnitine et du C3, de faible affinité, a été mis en évidence. Il appartiendrait à une autre famille de transporteurs (amino acid transporter) et sa distribution serait particulière (tractus digestif, poumon et glande mammaire) (58).

1.4.3 Régulation de la distribution tissulaire de la carnitine

La distribution tissulaire et l'assimilation de la carnitine sont partiellement contrôlées par les hormones (36)(59).

La concentration en carnitine chez l'homme est dépendante du sexe et de l'âge. Elle augmente durant la première année de vie d'environ 15µM à environ 40µM. Elle reste ensuite stable pour les deux sexes jusqu'à la puberté (60)(61). A partir de la puberté jusqu'à l'âge adulte, la concentration en carnitine augmente chez les hommes et se stabilise à un niveau plus élevé que celui des femmes (respectivement 50µM et 40µM) (60)(62)(63). Une étude a montré que le niveau de carnitine plasmatique chez les femmes augmentait avec l'âge et que, chez les hommes, le taux de carnitine dans le muscle squelettique diminuait avec l'âge. La différence homme/femme semble donc s'amenuiser après la ménopause (64). Ces résultats suggèrent que les hormones sexuelles ont un rôle important dans la régulation des concentrations plasmatiques et tissulaires en carnitine (60)(63).

1.5 Les déficits acquis en carnitine

Il existe des pathologies propres au transport de la carnitine et à la ßOAG qui sont responsables d'une diminution primitive ou secondaire de la carnitine, voire d'une augmentation. Il faut cependant garder à l'esprit que de nombreuses situations pathologiques extérieures aux anomalies de l'oxydation des acides gras entraînent une diminution de la carnitine ainsi que certains médicaments et quelques situations physiologiques. Les anomalies du cycle de la carnitine et de la ßOAG seront abordées dans le chapitre correspondant.

1.5.1 Situations pathologiques

1- Hémodialyse et maladies rénales

En cas d'insuffisance rénale, la clairance de la carnitine diminue et entraîne une élévation plasmatique de celle-ci. En cas d'hémodialyse chronique, le régime diététique hypoprotéiné et la perte excessive de carnitine due à la dialyse entraînent un déficit en carnitine (la carnitine, soluble dans l'eau est facilement dialysable) et une accumulation d'acylcarnitines à courtes et moyennes chaînes. Un traitement par L-carnitine est recommandé afin de restaurer les stocks

musculaires en carnitine, prévenant d'éventuelles myopathies et impotences fonctionnelles (32).

2- Insuffisance hépatique

Le déficit en carnitine est lié à une perte de capacité du foie à synthétiser la carnitine et à un défaut d'apport en carnitine exogène et en lysine et méthionine, précurseurs de leur synthèse endogène (32).

3- Syndromes de malabsorption

La mucoviscidose (atteintes digestives), le short-gut syndrome (malabsorption suite à une résection importante d'intestin grêle), la maladie coeliaque et d'autres syndromes de malabsorption entraînent une diminution de celle-ci par défaut d'absorption (65).

4- Malnutrition : cette situation d'hypocarnitinémie est réversible après une prise en charge diététique adaptée (32).

5- Prématurité

Les prématurés qui ne disposent pas d'un apport exogène suffisant en carnitine souffrent d'un déficit en carnitine qui peut se manifester par différents symptômes : apnées, cardiomyopathie, troubles gastro-intestinaux, myopathies préiphériques… Cette hypocarnitinémie est due à plusieurs facteurs : immaturité du système enzymatique, faibles réserves en carnitine en raison de leur faible poids et de leur naissance prématurée qui n'a pas permis la constitution de leurs réserves (66).

6- Nutrition parentérale exclusive

Elle entraîne parfois une stéatohépatite ou une cirrhose dont un des mécanismes pourrait être un déficit secondaire en carnitine, en cas d'absence de supplémentation (67).

7- Obésité, diabète de type 2 et désordres endocriniens

Le métabolisme de la carnitine serait perturbé lors de ces états pathologiques. L'adjonction de carnitine serait bénéfique chez les sujets obèses. Les dysthyroïdiens auraient une excrétion urinaire de carnitine perturbée et les diabétiques de types 2 seraient particulièrement à risque de déficit secondaire en carnitine (32).

8- Sepsis, traumatismes, grands brûlés (32)

Les patients victimes de sepsis et de traumatismes sont carencés en carnitine du fait de l'intense protéolyse, qui entraîne une importante perte musculaire. Ce déficit en carnitine jouerait un rôle négatif dans la réponse immune et inflammatoire contre les agents infectieux et il serait en cause dans le mécanisme du choc septique. Les grands brûlés ont un déficit en carnitine proportionnel à l'étendue de leurs brûlures. Il est accentué par les dialyses.

1.5.2 Situations physiologiques

1-La grossesse

Au moment de l'accouchement, le taux de carnitine peut être deux fois plus faible que les valeurs physiologiques. Ceci pourrait être expliqué par les besoins accrus du fœtus (68)

2-Le régime végétarien : l'apport en carnitine exogène étant diminué, le taux plasmatique est bas mais il reste en général dans les valeurs physiologiques. Le rein s'adapte (26).

1.5.3 Effet de certains médicaments

1-Traitement chronique par acide valproïque (Dépakine*)

Cet antiépileptique est un acide gras ayant une chaîne ramifiée contenant huit carbones. Il est métabolisé lors de la ßOAG. Se forment alors de la valproylcarnitine et d'autres acylcarnitines (dont du C5-OH) en grande quantité (voir chapitre sur le acylcarnitines), ce qui engendre un déficit en carnitine. Plusieurs mécanismes sont suspectés. Cependant la relation entre les effets sur le métabolisme de la carnitine et les effets secondaires hépatiques semble difficile à établir (69)(70).

2-Autres traitements qui entraîneraient un déficit en carnitine

*la zidovudine (AZT) (71)
*certains anti-cancéreux : cisplatine, taxol, adriamycine…(72)
*certaines ß-lactamines : céphaloridine, cefépime (C4G)…(31)
*autres : émétine (alcaloïde), vérapamil, quinidine …(31)

Nous avons vu que la carnitine jouait de nombreux rôles dont un rôle majeur dans la ßOAG. Nous allons donc détailler cette voie métabolique, et notamment la seconde partie, qui fait suite au transport des acides gras activés dans la mitochondrie : la ß oxydation mitochondriale des acides gras.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 2 La béta-oxydation des acides gras (ßOAG)

2.1 Son rôle

Le glucose, les acides gras et les acides aminés sont les trois substrats utilisables par l'organisme à des fins énergétiques et pour la biosynthèses de molécules. La première voie de dégradation des acides gras est la ß-oxydation. Elle est primordiale pour des organes tels que le foie, le cœur et le muscle squelettique, particulièrement durant le jeûne. Dans ces conditions de glucopénie, tous les organes sauf les hématies et le cerveau peuvent utiliser cette voie métabolique pour produire de l'énergie. On estime que l'oxydation des acides gras chez un sujet soumis à un régime normal fournit plus de 40% des besoins énergétiques et durant le jeûne, elle peut fournir jusqu'à 80% des besoins énergétiques totaux (73). De plus la ßOAG est nécessaire au foie qui transforme les acides gras en corps cétoniques, utilisables par tous les organes, y compris le cerveau.

La ßOAG a été découverte par Georg Franz Knoop en 1904. Elle fait intervenir plus de 25 enzymes (74). Cette ßOAG a principalement lieu dans la mitochondrie, mais le peroxysome possède aussi l'arsenal enzymatique complet nécessaire à cette voie (6)(2). Après hydrolyse des triglycérides, les acides gras sont transportés vers les mitochondries par des protéines de liaison FABP (Fatty Acid Binding Protein). La ßOAG se fait en deux phases majeures : la première partie concerne le transport mitochondrial des acides gras à longues chaînes qui a déjà été évoqué dans le paragraphe précédent (activation des acides gras par l'acyl-CoA synthétase, transfert dans la mitochondrie avec implication de la carnitine et des CPT1 et CPT2 pour les acides gras à longues chaînes: 12 à 20 carbones ; par simple diffusion pour les autres). La seconde partie concerne la ß-oxydation intra-mitochondriale qui va être développée dans ces paragraphes. La ß-oxydation permet la production d'acétyl-CoA dont l'utilisation directe dans le cycle de Krebs (**figure 11**) ou indirecte par le biais des corps cétoniques (**figure 12**) permet la fourniture de l'ATP mitochondrial.

2.2 Le cycle de la ß-oxydation (6)(2)(73)

Une fois dans la mitochondrie, les acyl-CoAs sont dégradés en unités d'acétyl-CoA via une série de 4 réactions enzymatiques, appelée ß-oxydation ou hélice de Lynen (**figures 8 et 9**).

Cette oxydation est un processus cyclique dans lequel les acyl-CoAs sont raccourcis : à chaque fois que le cycle est complet (à chaque tour d'hélice), deux atomes de carbone du groupe carboxy-terminal sont relargués sous forme d'un résidu d'acétyl-CoA. Un acyl-CoA saturé est dégradé par une séquence récurrente de quatre réactions:

1- Déshydrogénation par une acyl-CoA déshydrogénase, avec le FAD (Flavine-Adenine-Dinucléotide) comme cofacteur issu de la vitamine B (riboflavine), intervention du système de transport d'électrons ETF. Cette enzyme existe sous plusieurs formes afin de s'adapter à la longueur de la chaîne de l'acide gras :
*la SCAD pour l'oxydation des AG à coutres chaînes (2 à 4 C)
*la MCAD pour les AG à chaînes moyennes (6 à 10 C)
*la LCAD pour les AG à chaînes ramifiées
*la VLCAD pour les AG à longues chaînes (12 à 20 C) et à très longues chaînes (jusqu'à 24 C).
Cette étape aboutit à la formation d'énoyl-CoA et de FAD réduit (FADH2).

2- Hydratation de la double liaison via une hydratase (activité enoyl-CoA hydratase de la protéine trifonctionnelle) pour les AG à longues chaînes ou par une cronatase pour les AG à courtes et moyennes chaînes. Cette étape aboutit à la formation de 3-OH-acyl-CoA.

3- Déshydrogénation par la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase dont il existe deux iso-enzymes spécifiques des chaînes longues (LCHAD dont l'activité enzymatique est détenue par la protéine trifonctionnelle) et des chaînes moyennes et courtes (M/SCHAD). Ces enzymes possèdent une coenzyme à NAD qui est réduit lors de la réaction et réoxydé dans la chaîne respiratoire. A l'issu de cette réaction, le 3-OH-acyl-CoA est transformé en 3-céto-acyl-CoA.

4- Clivage du 3-céto-acyl-CoA par la 3-cétothiolase avec libération d'acétyl-CoA. Pour les chaînes longues, il s'agit de la LKAT, dont l'activité enzymatique est détenue par la protéine trifonctionnelle. Pour les chaînes moyennes et courtes, il s'agit de la MKAT.

Le bilan est alors le suivant : l'acyl-CoA initial est donc amputé de deux carbones (acétyl-CoA) puis il subit d'autres réactions jusqu'à l'obtention d'un 3-céto-acyl-CoA (quatre carbones) qui donnera deux acétyl-CoA . Ainsi, à chaque tour d'hélice une molécule d' acétyl-

CoA , une molécule de FADH2, et une molécule de NADH,H seront produites (exemple de acide stéarique **figure 10**).

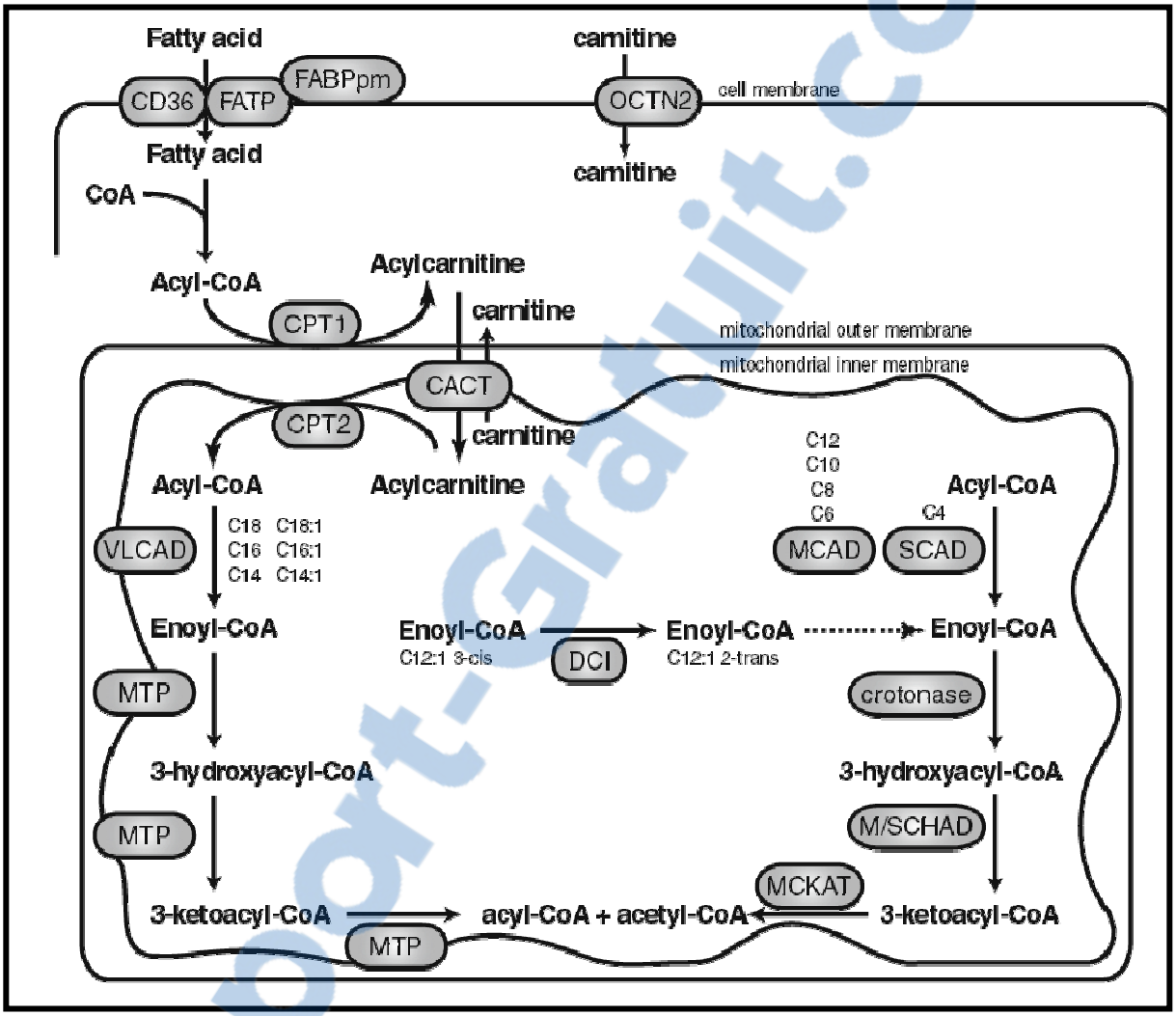


Figure 8: Cycle de la ß oxydation des acides gras intra mitochondriale, d'après (6).

Enzymes impliquées : CPT1; CACT; CPT2; VLCAD; MTP (mitochondrial trifunctional protein) ; LCHAD; MCAD; SCAD; M/SCHAD; MCKAT; DCI (dodecanoyl-CoA delta isomérase).

Rapport-Gratuit.com

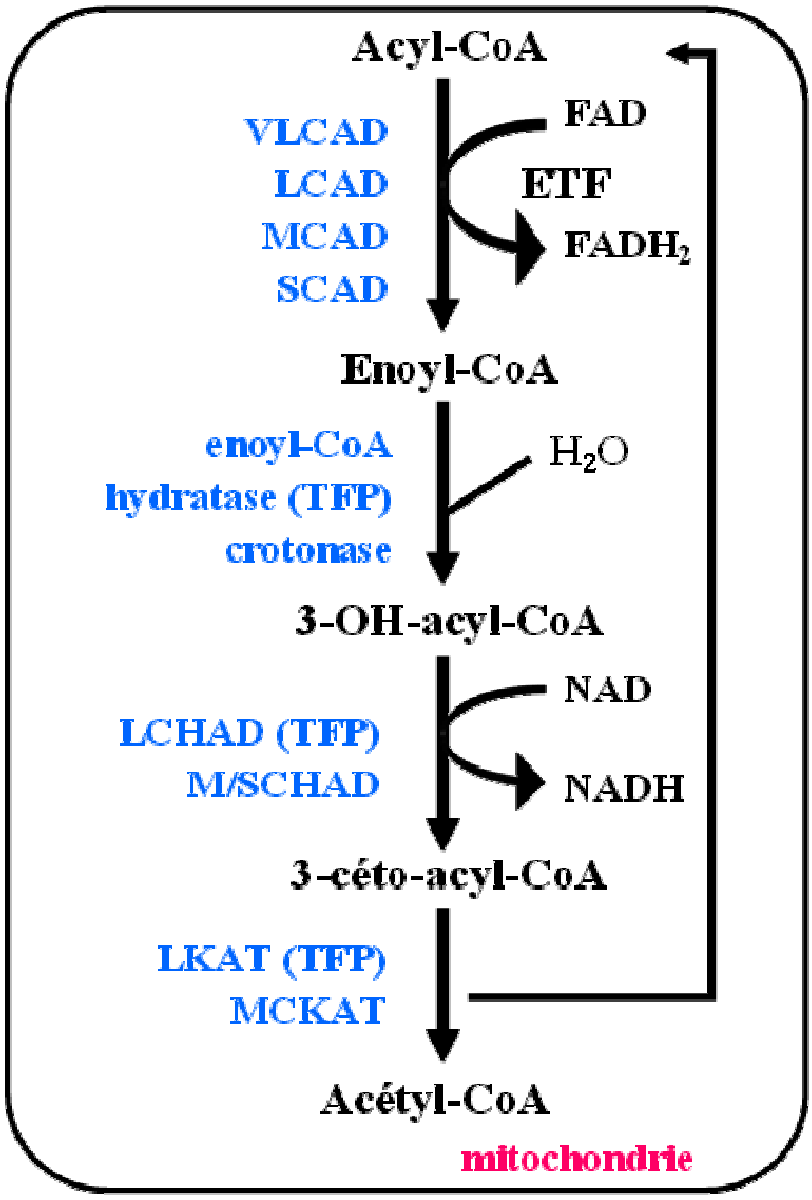


Figure 9: Cycle de la ß oxydation des acides gras intra mitochondriale, schéma simplifié, d'après (73) et (2).

Dans ce schéma, la TFP (enzyme trifonctionnelle), correspond à la MTP de la figure 8. ETF = Electron Transfer Flavoprotein.

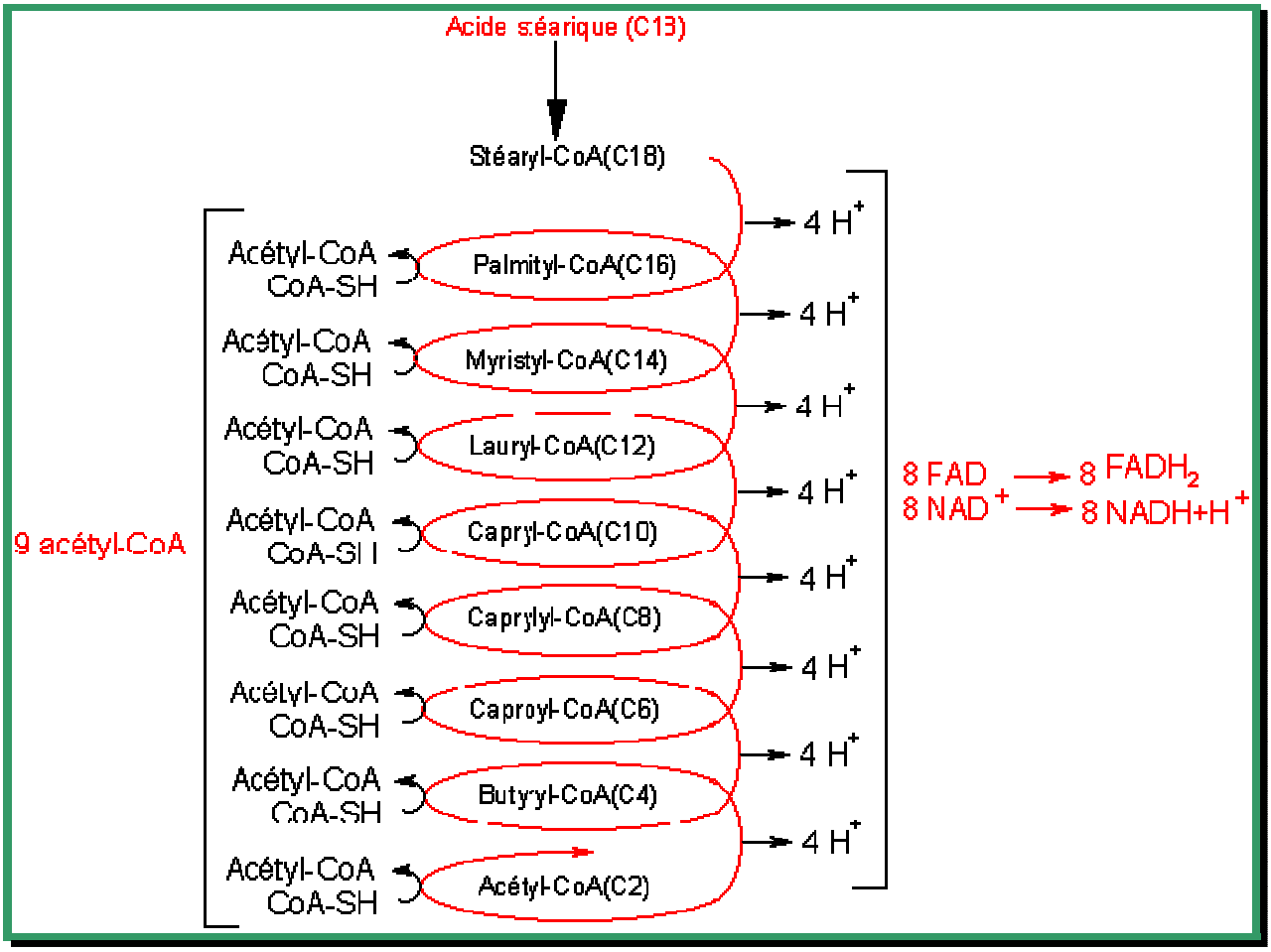


Figure 10: Exemple de la ß oxydation de l'acide stéarique (C18) : après son entrée dans la mitochondrie, il subit son premier cycle d'oxydation (ou tour d'hélice) qui conduit à la formation d'un acides gras amputé de deux carbones (C16 acide palmitique) et d'acétyl-CoA. Le cycle recommence sept fois jusqu'à obtention de deux acétyl-CoA, d'après wikibooks.org/wiki/Les_principales_voies_du_métabolisme

2.3 Devenir des substrats : les acétyl-CoA

2.3.1 Oxydation dans le cycle de Krebs (**Figure 11**)

Les acétyl-CoA sont complètement oxydés en CO2 suivant la réaction globale suivante :

Acétyl-CoA + 3 NAD_+ + FAD + GDP + Pi → 2 CO_2 + HSCoA + 3 NADH,H_+ + $FADH_2$ + GTP

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

2.3.2 Précurseurs de la biosynthèse des lipides et des phospholipides

Ils sont des précurseurs dans la synthèse des acides gras, des lipides, du cholestérol et des corps cétoniques via la cétogénèse (Figure 12).

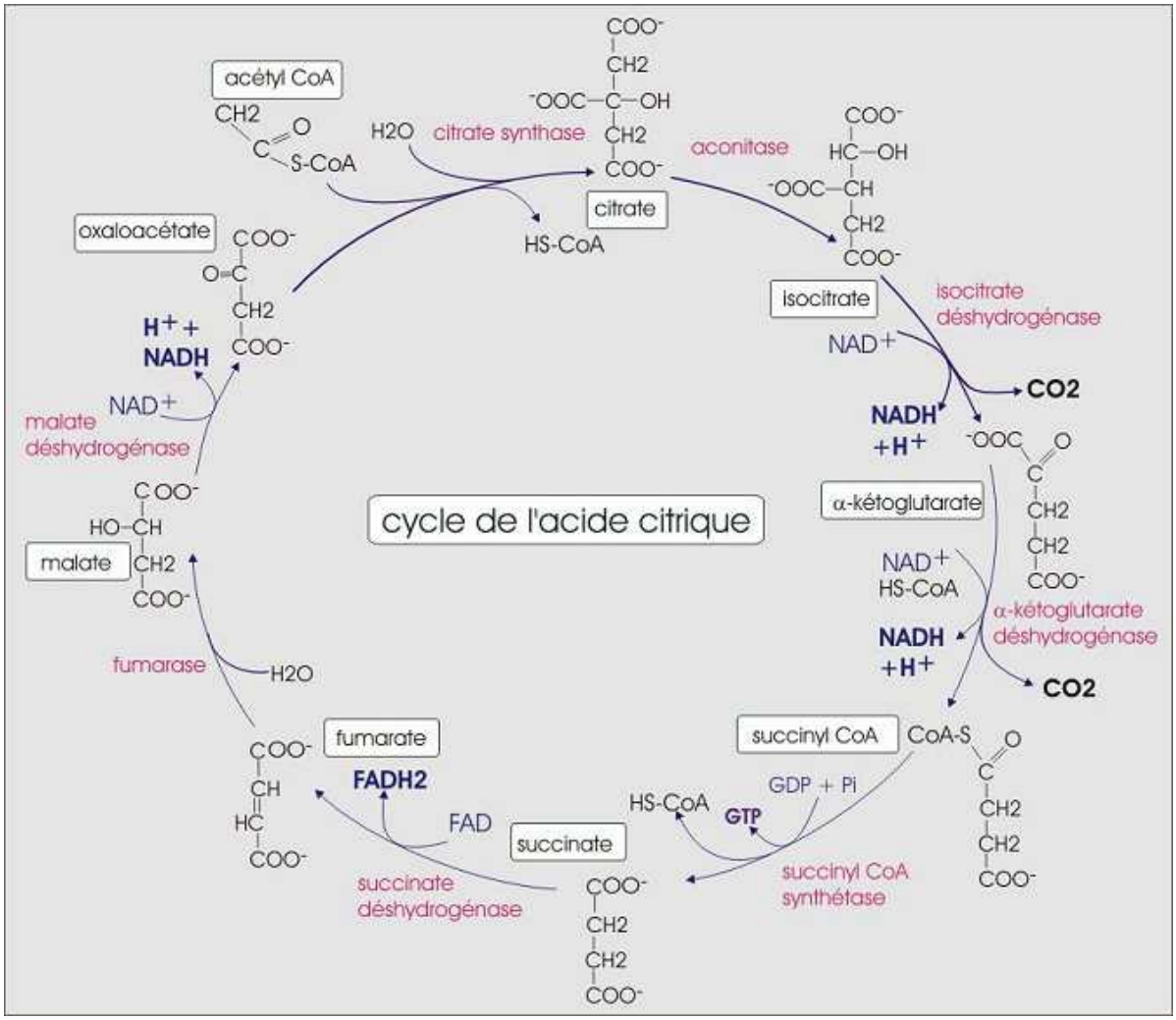


Figure 11: Cycle de Krebs (ou de l'acide citrique), d'après (75).

L'acétyl-CoA issu de l'oxydation des acides gras se condense avec l'oxaloacétate pour donner du citrate, qui sera oxydé dans le cycle de Krebs et fournira de l'ATP pour la chaîne respiratoire mitochondriale.

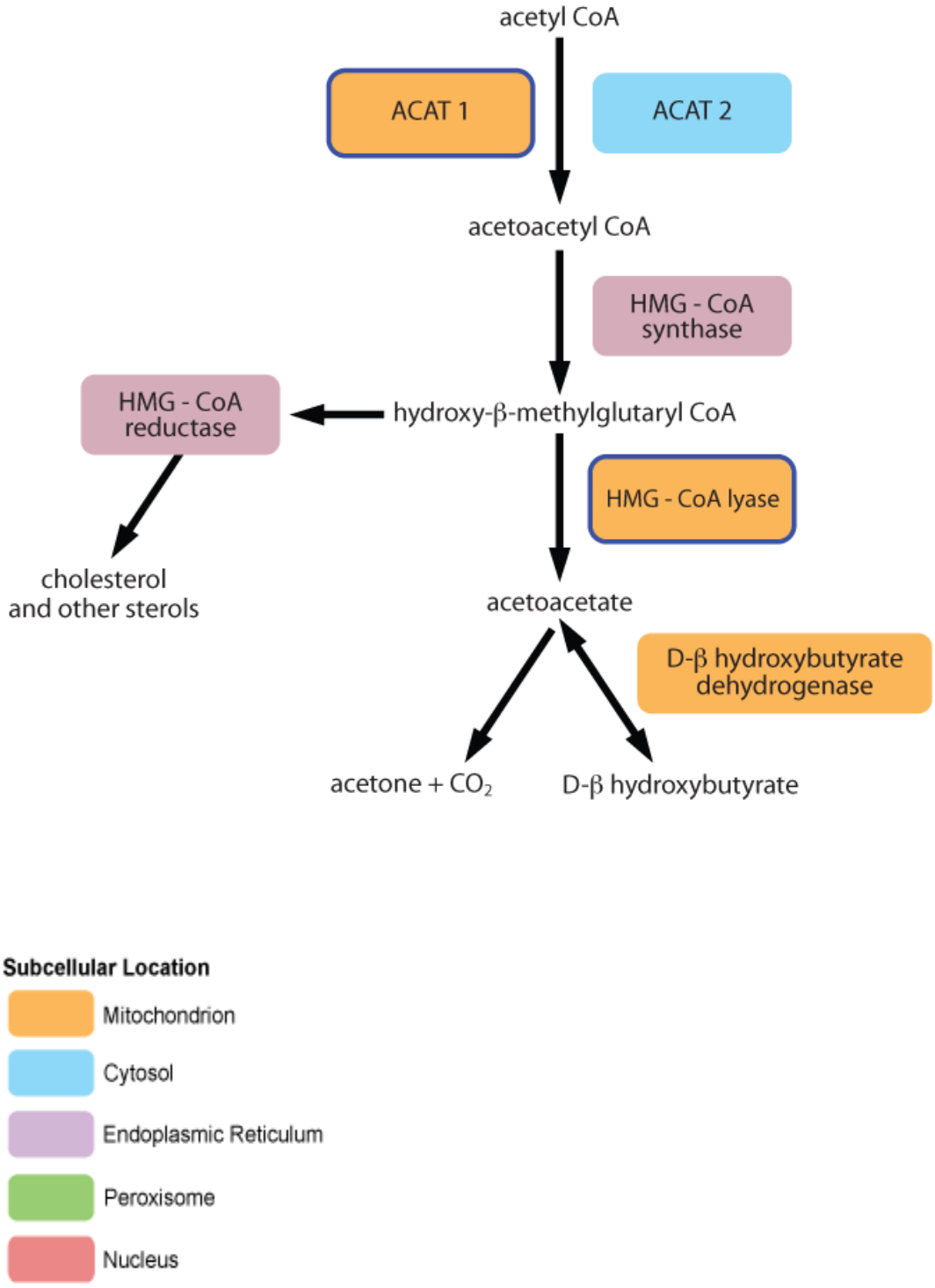


Figure 12: Schéma de la cétogénèse, voie métabolique utilisée uniquement par les hépatocytes, d'après (76).

C'est la seconde voie d'utilisation de l'acétyl-CoA. La première étape est l'obtention d'un acétoacétyl-CoA à partir de deux acyl-CoA. Cette réaction est catalysée par une thiolase aussi appelée ACAT1 (acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1). La cétogénèse aboutit à la formation de trois corps cétoniques : l'acétoacétate, le 3-hydroxybutyrate et l'acétone.

2.4 Régulation de la ß oxydation des acides gras

La régulation de la ß oxydation des acides gras est complexe. L'orientaion vers la ß oxydation ou vers la lipogénèse dépend de la balance état nourri/état de jeûne. A l'état nourri, l'augmentation du rapport insuline/glucagon favorise la lipogénèse. A l'état de jeûne, la diminution de ce rapport favorise la lipolyse, la ß oxydation et la cétogénèse.

2.5 Oxydation microsomale et peroxysomale des acides gras

A côté de l'oxydation mitochondriale des acides gras, il existe une oxydation microsomale et peroxysomale dont le rendement énergétique est faible. Elles expliquent cependant la présence de certains métabolites au cours des déficits de l'oxydation mitochondriale (2).

Chapitre 3 Les acylcarnitines

3.1 Aspects généraux

La carnitine est présente sous forme de carnitine libre et de dérivés acétylés : les acylcarnitines. Ils sont le résultats de réactions catalysées par des acyltransférases qui transfèrent les acides gras activés sur la carnitine et utilisant les acyl-CoA (36) (**figure 13**). La carnitine libre est la composante majeure du pool. Les acylcarnitines sont caractérisés par la longueur de leur chaîne carbonée, issue de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras correspondant. Ce sont des molécules difficiles à analyser du fait de leur structure aliphatique simple (structure carbonée en chaînes linéaires), de leur centre chiral et de leur charge positive permanente. La principale technique d'analyse utilisée actuellement est l'étude en spectrométrie de masse en tandem, avec ou sans dérivatisation préalable des acylcarnitines.

3.2 Les différents types d'acylcarnitines

Il existe 12 acylcarnitines « basiques » issus de l'oxydation mitochondriale des acides gras et de nombreux dérivés qui ont, pour certains, une importance capitale en pathologie (8). Les principaux acylcarnitines sont listés dans le **Tableau III** (d'après 81: reproduction interdite).
Nous différencierons ces deux types d'acylcarnitines en utilisant des termes informels : on distingue les acylcarnitines "simples" des acylcarnitines "complexes". Les molécules "simples" sont listées dans le **Tableau II**. Les acylcarnitines "complexes" correspondent aux molécules dicarboxyliques, hydroxylées (ω oxydation microsomale), aux acylcarnitines insaturés n fois (ß oxydation des acides gras insaturés) et aux isomères n'ayant pas de signification pathologique et pouvant induire de faux positifs (8). Les acylcarnitines dicarboxyliques et hydroxylés (marqueurs de certains déficits) sont issus de la ω-oxydation des AG dans les microsomes, la ß-oxydation mitochondriale étant bloquée (3). Il existe des isomères pour les acylcarnitines C4, C5, C4-OH, et C5-OH. Il est difficile en pratique de les identifier avec les techniques courantes sur la seule base de leur masse (77). Il en est de même pour certains dérivés. Par exemple, en spectrométrie de masse, leur transition MRM peut être très proche, ce qui rend délicate leur séparation. De nombreuses équipes travaillent sur l'amélioration de leur détection afin de réduire les cas de faux positifs (8)(78).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

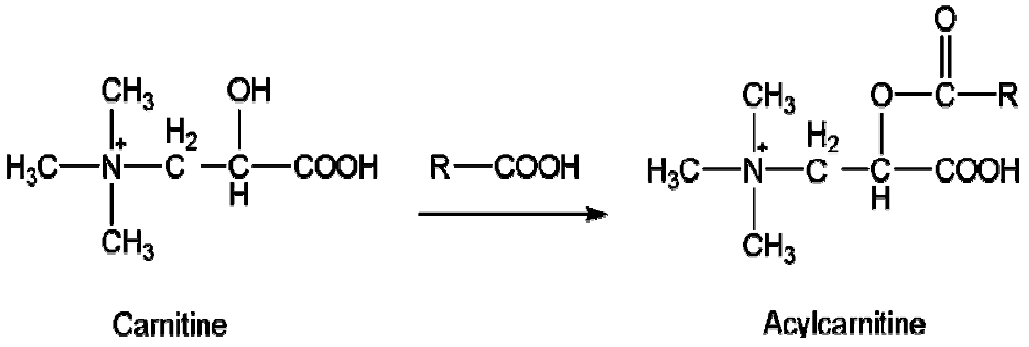


Figure 13: Structures de la carnitine et des acylcarnitines. « R-COOH » représente l'acide gras et « R » est le groupement acyl comportant un nombre variable de carbone, d'après (79).

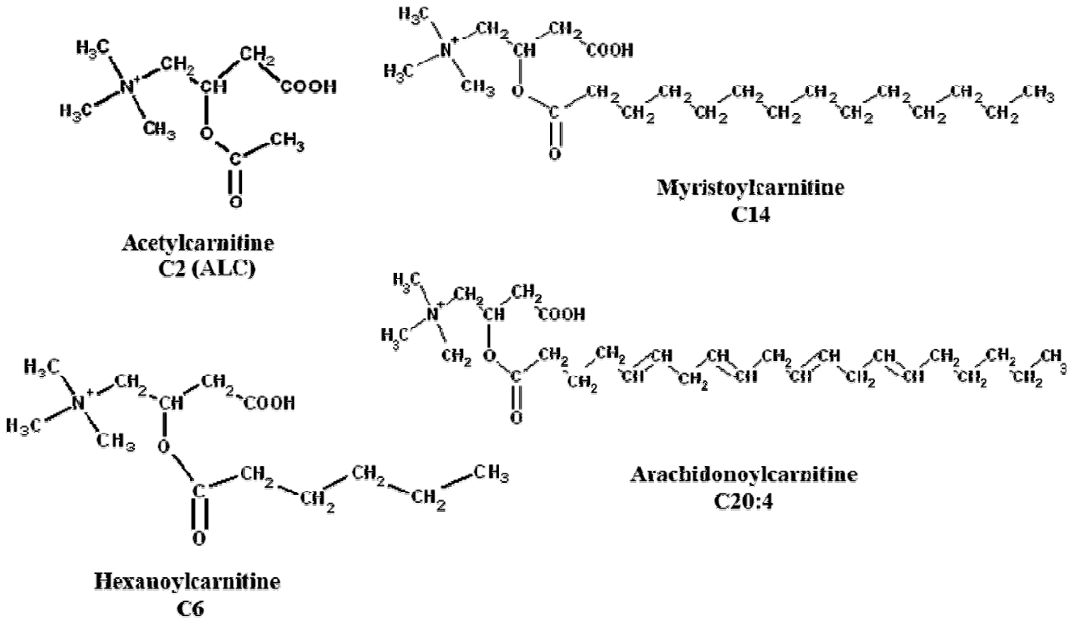


Figure 14: Exemples d'acylcarnitines ayant des longueurs de chaînes carbonées différentes : acétylcarnitine (C2), hexanoylcarnitine (C6), myristoylcarnitine (C14), arachidonoylcarnitine (C20 :4), d'après (5)

Tableau II: Acylcarnitines (1ère colonne) associés à leur abréviation (longueur de chaîne, 2éme colonne), d'après (80), DC= dicarboxylique, -OH= 3-hydroxy, Cn= résidu acyl avec n carbones, Cn :1= résidu acyl avec n carbones et monoinsaturé. Les isomères, les acylcarnitines hydroxylés, dicarboxyliques et insaturés ne seront pas développés dans notre partie expérimentale mais nous expliquerons leur importance en pathologie.

Compound	Abbreviation	R
Carnitine	C_0	H
Acetylcarnitine	C_2	$COCH_3$
Propionylcarnitine	C_3	$COCH_2CH_3$
Butyrylcarnitine	C_4	$CO(CH_2)_2CH_3$
Valerylcarnitine	C_5	$CO(CH_2)_3CH_3$
Hexanoylcarnitine	C_6	$CO(CH_2)_4CH_3$
Octanoylcarnitine	C_8	$CO(CH_2)_6CH_3$
Decanoylcarnitine	C_{10}	$CO(CH_2)_8CH_3$
Dodecanoylcarnitine	C_{12}	$CO(CH_2)_{10}CH_3$
Tetradecanoylcarnitine	C_{14}	$CO(CH_2)_{12}CH_3$
Hexadecanoylcarnitine	C_{16}	$CO(CH_2)_{14}CH_3$
Octadecanoylcarnitine	C_{18}	$CO(CH_2)_{16}CH_3$

Tableau III : Nomenclature et structure chimique des AC saturés,d'après (81).

Free carnitine	—
Acetyl-	C2
Acrylyl-	C3:1
Propionyl-	C3
Formiminoglutamate (FIGLU)	—
Isobutyryl-/butyryl-	C4
Tiglyl-	C5:1
Isovaleryl-/2-methylbutyryl- (*)	C5
3-hydroxybutyryl-	C4-OH
Hexanoyl-	C6
3-hydroxyisovaleryl- 2-methyl-3-hydroxybutyryl-	C5-OH
Benzoyl-	—
Dextrose (fragment)	—
Heptanoyl-	C7
3-hydroxyhexanoyl-	C6-OH
Phenylacetyl-	—
Salicylyl- (*)	—
Octenoyl- (*)	C8:1
Octanoyl-	C8
Malonyl-	C3-DC
Decadienoyl-	C10:2
Decenoyl-	C10:1
Decanoyl-	C10
Methylmalonyl-/succinyl-	C4-DC
3-hydroxydecenoyl-	C10:1-OH
Glutaryl-/3-hydroxydecanoyl-	C5-DC/C10-OH
Dodecenoyl-	C12:1
Dextrose (fragment)	—
Dodecanoyl-	C12
3-hydroxydodecenoyl-	C12:1-OH
3-hydroxydodecanoyl-	C12-OH
Tetradecadienoyl-	C14:2
Tetradecenoyl-	C14:1
Tetradecanoyl- (myristoyl-)	C14
3-hydroxytetradecenoyl-	C14:1-OH
3-hydroxytetradecenoyl-	C14-OH
Hexadecenoyl-	C16:1
Hexadecanoyl- (palmitoyl-)	C16
3-hydroxyhexadecenoyl-	C16:1-OH
3-hydroxyhexadecanoyl-	C16-OH
Octadecadienoyl-	C18:2
Octadecenoyl-	C18:1
Octadecanoyl- (stearyl-)	C18
3-hydroxyoctadecadienoyl-	C18:2-OH
3-hydroxyoctadecenoyl-	C18:1-OH
3-hydroxyoctadecanoyl-	C18-OH

3.3 Méthodes d'exploration des acylcarnitines

3.3.1 Aspects généraux

La détection de la carnitine et des acylcarnitines est la clé du diagnostic de nombreuses anomalies du métabolisme. De même, la détermination des énantiomères de la carnitine est primordiale en thérapeutique afin de préparer des traitements contenant de la L-carnitine et non de la D-carnitine, potentiellement toxique pour l'organisme (31). Un grand nombre de techniques d'analyse des acylcarnitines nécessite un prétraitement particulier de l'échantillon : la dérivatisation des acylcarnitines.

3.3.2 Point sur la dérivatisation des acylcarnitines

La dérivatisation consiste à ajouter un groupement sur la molécule d'intérêt afin de lui conférer des propriétés physico-chimiques facilitant leur analyse par la technique choisie. Par exemple, les acylcarnitines peuvent être butylés (par du butanol en milieu acide, le plus fréquent) ou méthylés. Les groupements acides carboxyliques des acylcarnitines les rendent trop polaires pour une analyse directe dans certaines techniques. Cette transformation permettrait alors un gain de sensibilité analytique en bloquant les fonctions acides, ce qui améliorerait l'ionisation des molécules et la symétrie des pics chromatographiques. L'utilisation d'un spectromètre plus sensible (de dernière génération) doit pouvoir pallier à l'absence de dérivatisation.

Les inconvénients de la dérivatisation sont :

- l'hydrolyse partielle des acylcarnitines durant la préparation (milieu acide et température élevée) des échantillons, aboutissant à une surestimation de la carnitine libre (79). Il est d'ailleurs préconisé de procéder à un dosage séparé de la carnitine libre lorsque l'on utilise une technique nécessitant la dérivatisation des acylcarnitines (82).
- le temps supplémentaire de traitement de l'échantillon avant analyse (15 min à 60 min).

Rapport-Gratuit.com

3.3.3 Historique des techniques

- dans les années 1950 : méthodes chimiques basées sur la formation de complexes colorés entre l'ammonium quaternaire de la carnitine et les composants chromogéniques (83)
- 1964 : utilisation par Marquis et Fritz d'une carnitine acétyltransférase en présence d'acétyl-CoA dans une méthode enzymatique avec détection spectrophotométrique du produit formé.
- vers 1972 : développement d'une méthode radio-enzymatique qui permet la détermination de la L-carnitine et des acylcarnitines après préparation appropriée des échantillons (84).
- vers 1975 : chromatographie gazeuse (GC). Etant donné que la carnitine et ses esters sont hautement polaires et non volatiles, une dérivatisation est nécessaire avant toute analyse par GC. La GC a été couplée à la MS dans les années 1990, par exemple pour la détermination qualitative des acylcarnitines dans les urines (85).
- vers 1984 : HPLC avec colonne en phase inverse couplée à des détecteurs d'UV ou de fluorescence. La méthode a été développée afin de pouvoir déterminer la carnitine et onze acylcarnitines (dérivatisations préalables, utilisation de plusieurs gradients…) (74).
- vers 1995 : électrophorèse capillaire (EC). La carnitine est un bon candidat à cette technique car la séparation est basée sur la capacité de migration des molécules chargées selon leur rapport charge / masse, dans un champ électrique. En effet, la carnitine est chargée positivement en conditions acides (pKa=3.8). Les détecteurs et les réactifs utilisés pour la dérivatisation sont les mêmes qu'en HPLC. La détection UV est meilleure après dérivatisation (87). Cette technique, de haute résolution séparative, peu consommatrice en solvants et rapide présente aussi l'inconvénient de devoir ajouter des solvants organiques dans les tampons hydro-électrolytqiues afin de solubiliser les molécules les plus apolaires. Les tampons sont alors plus sujets à l'évaporation, obligeant à des renouvellements fréquents, a priori incompatibles avec l'automatisation de la technique (31).
- à partir des années 1990 : spectrométrie de masse (MS). Cette technique donne des informations structurelles sur les molécules à analyser. Elle peut être utilisée seule ou faire office de détecteur lorsqu'elle est couplée à une technique séparative. Les

molécules polaires, thermo-labiles et non volatiles comme la carnitine et ses dérivés sont adaptées à cette technique. Milligton et ses collègues ont été les précurseurs dans l'analyse de ces molécules en spectrométrie de masse en tandem (FAB-MS/MS ; voir le chapitre consacré à la MS) après dérivatisation. Puis, l'ESI (electrospry ionization), plus robuste et sensible, a remplacé la source FAB.

- années 2000 : HPLC-MS/MS, développement de méthodes quantitatives.

3.3.4 Acylcarnitines: approches qualitatives, quantitatives, semi-quantitatives et ratios

L'approche qui consiste à apprécier des pics sur un profil (normal, élevé, faible) est une approche quantitative relative que l'on peut apparenter à une analyse qualitative (73).
L'utilisation d'étalons internes deutérés permet cette approche quantitative des acylcarnitines. Cependant, le calcul des concentrations est basé sur une proportionnalité avec l'étalon interne ajouté en quantité connue. Cette approche est peu fiable dans le domaine des faibles valeurs qui sont pourtant le domaine des valeurs physiologiques des acylcarnitines. La seconde approche quantitative consiste à réaliser en plus une gamme d'étalonnage externe.
Chaque acylcarnitine a une valeur seuil définie qui doit tenir compte de la population. Les concentrations physiologiques et valeurs seuils seraient dépendantes du poids de naissance, du terme du nouveau-né et de l'âge (88). Une grande précision est nécesaire dans l'estimation des valeurs faibles.
Le diagnostic des désordres métaboliques repose aussi sur des données basées sur un ratio entre deux acylcarnitines. Par exemple, selon Rashed (89), l'acidurie isovaléryl correspond à un ratio isovalérylcarnitine (C5) / acétylcarnitines (C2)> 0.09 et Chace considère qu'un taux d'octanoylcarnitine (C8) > 0.3 µM associé à un ratio C8 /C 2> 0.1 est très en faveur d'un déficit en MCAD (90). Selon certaines équipes, l'utilisation du ratio entre deux acylcarnitines réduirait les risques de faux positifs, pouvant être dus à une augmentation des acylcarnitines à courtes chaînes (91). Ces études ont été réalisées sur sang total séché sur buvards. C'est la matrice la plus utilisée actuellement dans le cadre des divers programmes étatiques de dépistage néonatal. En dehors de ce cadre de dépistage, environ 50% des analyses des acylcarnitines sont réalisées sur buvards (par exemple, au CHU de Lille) et 50% sur plasma (CHU de Lyon, Angers…).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.3.5 Différences entre acylcarnitines réalisés sur papier buvard et sur plasma

La carnitine et ses esters peuvent être retrouvés dans tous les fluides biologiques. La matrice la plus adaptée pour les patients symptomatiques ou non est le plasma ou le sérum. De nombreux laboratoires préfèrent utiliser les échantillons secs de sang total sur papier buvard car le transport et la conservation sont facilités (81) et cela évite certains écueils pré-analytiques (délais d'acheminement, de centrifugation…).

Peu d'études sont disponibles sur les différences existant entre ces deux prélèvements. Récemment, une équipe a comparé des échantillons de patients connus sur ces deux matrices (92). La technique comprenait une étape de butylation.

- La carnitine libre plasmatique était de 36% supérieure à la carnitine libre sur buvards.

- Les patients ayant un déficit en CPT1 avaient un taux de carnitine libre quatre fois supérieur sur buvards que sur plasma.

- Les patients ayant un déficit en CPT2 avaient des marqueurs diagnostiques anormaux sur plasma alors qu'ils pouvaient être normaux sur buvards.

- Les ratios utilisés pour le diagnostic des déficits en CPT1 (C0/(C16+C18)) et CPT2 ((C16+C18 :1)/C2) étaient bien anormaux sur plasma mais certains patients déficitaires en CPT2 avaient des résultats normaux sur buvard.

Ainsi, d'après ces résultats, un déficit en CPT1 peut ne pas être diagnostiqué sur plasma si l'on utilise uniquement les marqueurs primaires mais l'utilisation des ratios rattrape le diagnostic. Un déficit en CPT2 peut être omis s'il est uniquement réalisé sur buvards.

D'après le centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme de Paris Necker, les valeurs des C16 et C18 :1 sur sang séché diffèrent des valeurs plasmatiques.

3.4 Interférences analytiques

3.4.1 Les toxiques

Certains médicaments peuvent interférer avec le dosage de la carnitine libre (voir le chapitre sur les déficits acquis en carnitine) et des acylcarnitines. Par exemple, l'amoxicilline augmenterait artéfactuellement le C5, le céfotaxime augmenterait artéfactuellement le C14:1

et le C16:1 OH (artéfacts), et l'acide valproïque augmenterait de manière réelle C6, C8, C10 et C8DC (82).

3.4.2 L'hémolyse

Avec l'augmentation de l'hémolyse, on observe une augmentation des chaînes courtes (C2, C3, C4) et des chaînes longues (C12, C14, C16, C18). En revanche, la lactescence ne semble pas avoir d'influence significative (73).

3.4.3 L'anticoagulant EDTA

L'EDTA est déconseillé en raison de l'exctinction chimique qu'il induit sur les acylcarnitines (73).

3.4.4 La cétose

Elle produit des molécules qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation : élévation de l'acétylcarnitine, de la 3-hydroxybutyrylcarnitine et de certains acylcarnitines à chaînes moyennes ou longues saturés ou insaturés (82).

3.5 Valeurs physiologiques des acylcarnitines et de la carnitine

Comme nous l'avons vu, de nombreuses techniques existent pour l'analyse des acylcarnitines et chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence biologiques en fonction de sa technique. Par exemple, le type de spectrométrie de masse utilisée (source d'ionisation, analyseur quadripolaire, à trappe d'ions ou mixte, les paramètres de l'appareil, le mode de scan…), l'utilisation ou non d'une technique préalable de séparation, la dérivatisation ou non des échantillons et le type de matrice oblige à recueillir ses propres valeurs de référence.
Nous n'étudierons que les valeurs des acylcarnitines « simples » (C0 à C18, objet de notre travail), ce qui est largement incomplet pour une investigation exhaustive des pathologies de la ß-oxydation des acides gras.

Nous présentons, à type d'exemple, deux séries de valeurs de référence plasmatiques adultes dans le **tableau IV** et les données de D. Rabier dans le **tableau V** issues d'une

méthode radio-enzymatique (population pédiatrique et adulte). Le **tableau VI** présente des valeurs de référence pour différentes tranches d'âges, obtenues en spectrométrie de masse sur papier buvard (sang total).

Tableau IV: Exemples de valeurs de référence biologiques adulte de la carnitine et de acylcarnitines : 1) Intervalles de référence ou limites de décision médicales d'après l'hôpital Necker à Paris (APHP), ESI-MS/MS sans dérivatisation ; 2) Valeurs de référence (à jeun et post prandial) de patients ne souffrant pas d'anomalies de l'oxydation des acides gras, n=530 (ESI-MS/MS, après butylation) pour une étude Néerlando-Portuguaise (69), NR= Non Renseigné. 3) Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez l'adulte, n=25, âgés de 16 à 93 ans, 10 hommes et 15 femmes, en FIA-MS/MS, d'après (73).

Analyte	Adultes étude 1) en µM	Adultes étude 2) en µM 5éme percentile-95ème percentile	Adultes étude 3) 5éme percentile-95ème percentile
CT	25-70	NR	NR
C0	20-60	22.3 - 54.85	22.94 – 59.12
C2	2-16	3.39 - 12.96	6.32 – 22.32
C3	<0.75	0.14 – 0.94	0.21 – 0.77
C4	<0.43	0.07 – 0.58	0.15 – 0.47
C5	<0.37	0.04 – 0.22	0.09 - 0.26
C6	<0.25	0.02 – 0.12	0.04 – 0.17
C8	<0.22	0.04 – 0.22	0.09 – 0.25
C10	<0.34	0.04 – 0.30	0.11 – 0.5
C12	<0.17	0.04 – 0.14	0.04 – 0.11
C14	<0.10	NR	0.02 – 0.06
C16	<0.27	0.06 – 0.24	0.06 – 0.16
C18	<0.09	0.02 – 0.1	0.02 – 0.06

Tableau V : Concentrations plasmatiques en fonction de l'âge chez des individus sains sans distinction de sexe. Les valeurs sont exprimées en moyenne +/- un écart-type. Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs extrêmes. Méthode radio-enzymatique, d'après (93).

Age	N	Carnitine totale CT en µM	Carnitine libre CO en µM	Acylcarnitines AC en µM	Rapport AC/CO
1 jour	30	36.4 +/-10.8 (23.3 – 67.9)	20.1 +/-6.7 (11.5 – 36)	16.3 +/-5.7 (7 – 36.6)	0.87 +/-0.33 (0.37 -1.68)
2 -7 jours	44	25.2 +/-4.1 (17.4 – 40.6)	14.9 +/-3 (10.1 – 21)	10.3 +/-3.7 (2.9 – 23.8)	0.73 +/-0.31 (0.15 – 1.44)
8 – 28 jours	9	36.7 +/-10.5 (18.5 -58.7)	27.6 +/-9.7 (12.3 – 46.2)	9.2 +/-3.2 (4.1 – 14.5)	0.37 +/-0.16 (0.11 – 0.65)
29 j – 1 an	16	47.6 +/-7.7 (38.1 – 68)	35.5 +/-6.5 (26.9 – 49)	12 +/-3.1 (7.4 – 19)	0.35 +/-0.1 (0.23 – 0.5)
1 – 6 ans	72	54.4 +/-9.9 (34.6 – 83.6)	41.7 +/-7.9 (25.3 – 62.5)	12.8 +/-5.9 (4 – 28.3)	0.32 +/-0.16 (0.11 – 0.83)
6- 10 ans	85	56.2 +/-11.4 (27.8 – 82.9)	41.1 +/-10 (21.7 – 66.4)	14.7 +/-6 (3.1 – 32.1)	0.38 +/-0.19 (0.08 – 0.87)
10- 17 ans	97	53.4 +/-9.5 (33.7 -77)	39.4 +/-8.7 (21.3 – 64.5)	14 +/-5.1 (3.7 – 29.2)	0.38 +/-0.17 (0.09 – 0.88)
adultes	41	54 +/-12.6 (33.8 – 77.5)	39.1 +/- 8.6 (25.4 – 54.1)	14.9 +/-7 (5.4 – 30.1)	0.39 +/- 0.17 (0.11 – 0.78)

3.6 Place de l'exploration des acylcarnitines en pathologie (81)

L'analyse des acylcarnitines est réalisée dans le cadre de la recherche d'anomalies de la ß oxydation des acides gras et d'anomalies du métabolisme des acides organiques. Le résultat de cette analyse peut, dans certains cas, apporter un diagnostic évident alors que dans d'autres cas, il est nécessaire de préciser le diagnostic à l'aide d'investigations complémentaires. Ces pathologies touchant les acylcarnitines ont en commun une accumulation des espèces C2 à C18, substrats d'une ou plusieurs acyl-CoA transférases exprimées dans différents compartiments intracellulaires. Les acylcarnitines sont explorés dans les situations suivantes :

1) évaluation des patients symptomatiques, si possible dès les « pré-symptômes »
2) évaluation de la fratrie de patients atteints
3) dépistage des nouveaux-nés (fonction des pays), investigation du nouveau-né lors de certaines pathologies rencontrées au cours de la grossesse (HELLP Syndrome, stéatose hépatique gravidique…)
4) évaluation post-mortem.

La grande majorité des laboratoires utilise la MS/MS. Parfois, certains laboratoires ont des techniques faisant appel à la GC/MS, à l'HPLC ou à l'électrophorèse capillaire.
Comme toute analyse de désordres métaboliques complexes, l'étude des acylcarnitines requiert à la fois de grandes compétences analytiques et une interprétation poussée des résultats, basée sur des informations cliniques et paracliniques. Une collaboration étroite avec les cliniciens est primordiale.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 4 Carnitine, acylcarnitines et erreurs innées du métabolisme

4.1 Le contexte

L'incidence confondue des désordres métaboliques est de 1/5000 à 1/10 000 naissances vivantes (2). Pour comparaison, les incidences de certaines erreurs innées du métabolisme figurent dans le **Tableau VI**. Il s'agit de données nord américaines.

Depuis la découverte du premier déficit en 1973 dans la voie de la ß oxydation des acides gras (Di Mauro, déficit en CPT2) puis du déficit en MCAD en 1980, une vingtaine de déficits est actuellement décrite, affectant directement ou indirectement cette voie métabolique. Parmi cette vingtaine d'anomalies enzymatiques connues, quinze gènes ont été identifiés (77). Les symptômes inauguraux peuvent se présenter à n'importe quel âge, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte. Ils correspondent à des épisodes de décompensation métabolique survenant en période de jeûne ou lors d'affections intercurrentes et pouvant engager le pronostic vital. Les manifestations les plus typiques sont l'hypoglycémie hypocétosique, les désordres hépatiques, les myopathies, cardiomyopathie et morts subites.

Les acidémies organiques sont un groupe plus hétérogène d'erreurs innées du métabolisme. Elles se présentent typiquement sous la forme de pathologies aiguës menaçant le pronostic vital : hypo/hypertonie, retard de croissance, retard du développement. Les manifestations aiguës habituellement retrouvées sont les suivantes : vomissements, léthargie, coma et crises comitiales.

En présence de ces points d'appel, le diagnostic est souvent fait au laboratoire grâce à l'analyse des acylcarnitines. Une investigation complète comprend en général aussi une analyse des acides aminés plasmatiques, des acides aminés urinaires et de la carnitine plasmatique libre et totale. En fonction des résultats, des investigations complémentaires peuvent être nécessaires.

Chaque erreur innée du métabolisme détectable par une analyse des acylcarnitines est de type autosomique récessive à l'exception du déficit en 2-méthyl-3-hydroxybutyryl-CoA, qui est lié à l'X (94).

Le **tableau VII** reprend les différentes pathologies diagnostiquées grâce aux acylcarnitines.

Tableau VI: Incidence des erreurs innées du métabolisme des acides aminés, des acides gras et des acides organiques aux Etats-Unis, d'après (95).

Group	Condition (inborn errors of amino acid, fatty acid, and organic acid metabolism)	US incidence
AA[a]	Argininosuccinic acidemia	<1:100 000
AA	Citrullinemia	<1:100 000
AA	Homocystinuria (CBS deficiency)	<1:100 000
AA	MSUD	<1:100 000
AA	PKU	>1:25 000
AA	Tyrosinemia type I	<1:100 000
AA	Argininemia	<1:100 000
AA	Benign hyperphenylalaninemia	<1:100 000
AA	Citrullinemia type II	<1:100 000
AA	Defects of biopterin cofactor biosynthesis	<1:100 000
AA	Disorders of biopterin cofactor regeneration	<1:100 000
AA	Hypermethioninemia	<1:100 000
AA	Tyrosinemia type II	<1:100 000
AA	Tyrosinemia type III	<1:100 000
AA	Nonketotic hyperglycinemia	<1:100 000
AA	Pyruvate carboxylase deficiency	<1:100 000
FAO	Carnitine uptake defect	<1:100 000
FAO	Long-chain 3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency	>1:75 000
FAO	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	>1:25 000
FAO	Trifunctional protein deficiency	<1:100 000
FAO	Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	>1:75 000
FAO	Dienoyl reductase deficiency	<1:100 000
FAO	Carnitine palmitoyl-transferase Ia deficiency (liver)	<1:100 000
FAO	Carnitine palmitoyl-transferase II deficiency	<1:100 000
FAO	Glutaric acidemia type II	<1:100 000
FAO	Medium-/short-chain 3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency	>1:100 000
FAO	Medium-chain ketoacyl-CoA dehydrogenase deficiency	<1:100 000
FAO	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	>1:75 000
FAO	Carnitine/acyl-carnitine translocase deficiency	<1:100 000
OA	3-Methyl crotonyl-CoA carboxylase deficiency	>1:75 000
OA	3-Hydroxy 3-methyl glutaric aciduria	<1:100 000
OA	Beta-ketothiolase deficiency	<1:100 000
OA	Glutaric acidemia type I	>1:75 000
OA	Isovaleric acidemia	<1:100 000
OA	Methylmalonic acidemia (A,B)	<1:100 000
OA	Methylmalonic acidemia (mutase)	>1:75 000
OA	Multiple carboxylase deficiency	<1:100 000
OA	Propionic acidemia	>1:75 000
OA	2-Methyl 3-hydroxy butyric aciduria	<1:100 000
OA	2-Methyl butyryl-CoA dehydrogenase deficiency	<1:100 000

OA	3-Methyl glutaconic aciduria	<1:100 000
OA	Isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency	<1:100 000
OA	Malonic aciduria	<1:100 000
OA	Methylmalonic acidemia (Cbl C,D)	<1:100 000
OA	Ethylmalonic encephalopathy	<1:100 000

AA= anomalie du catabolisme des acides aminés et de leur transport, OA= acidurie organique, FAO= anomalie de l'oxydation des AG. Hormis les aminoacidopathies, l'anomalie la plus fréquents est le déficit en MCAD. Cette pathologie a été rajoutée au programme du dépistage néonatal en 2011 par l'HAS (13).

Tableau VII: Nomenclature des pathologies métaboliques (1ére colonne) nécessitant une exploration des acylcarnitines, d'après (96). La seconde colonne correspond au code de l' American College of Medical Genetics (ACMG) de la pathologie. La troisième colonne mentionne le marqueur primaire de chaque pathologie. MIM: Online Mendelian Inheritance in Man (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db; contains link to Swiss-Prot entries); EC: Enzyme Commission, nomenclature des enzymes (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme /). Certaines de ces pathologies seront détaillées ci-dessous.

Rapport-Gratuit.com

Metabolic disorders		
Organic acid disorders		
Propionic acidemia (MIM 606054) (propionyl-CoA carboxylase deficiency [EC 6.4.1.3])	PROP[a]	C3
Methylmalonic acidemia (MIM 251000) (methylmalonyl-CoA mutase deficiency [EC 5.4.99.2])	MUT[a]	C3
Methylmalonic acidemia (Cbl A, MIM 251100; Cbl B, MIM 251110; EC 5.4.99.2)	Cbl A,B[a]	C3
Methylmalonic acidemia (Cbl C, MIM 277400; Cbl D, MIM 277410; EC 5.4.99.2)	Cbl C,D[a]	C3
Malonic acidemia (MIM 248360) (malonyl-CoA decarboxylase deficiency [EC 4.1.1.9])	MAL	C3DC
Isobutyrylglycinuria (MIM 604773) (isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.1.1.157])	IBG[a]	C4
Isovaleric acidemia (MIM 243500) (isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.3.99.10])	IVA[a]	C5
2-Methylbutyrylglycinuria (MIM 600301) (2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.3.99.12])	2MBG[a]	C5
3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency I (MIM 210200, MIM 210210, EC 6.4.1.4)	3MCC[a]	C5-OH
3-Methylglutaconic aciduria (MIM 250950) (3-methylglutaconyl-CoA hydratase deficiency [EC 4.2.1.8])	3MGA[a]	C5-OH
3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (MIM 300438) (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency [EC 4.1.3.4])	HMG[a]	C5-OH
Holocarboxylase synthetase deficiency (MIM 253270) (multiple carboxylase deficiency [EC 6.3.4.11])	MCD[a]	C5-OH and/or C3
2-Methyl-3-hydroxybutyric aciduria (MIM 300438) (2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.1.1.178])	2M3HBA[a]	C5-OH
β-Ketothiolase deficiency (MIM 203750) (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency [EC 2.3.1.16, EC 2.3.1.9])	βKT	C5:1 and/or C5-OH
Glutaric acidemia type I (MIM 231670) (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.3.99.7])	GA1	C5DC
Fatty acid oxidation disorders		
Carnitine uptake defect/carnitine transport defect (MIM 212140; Swiss-Prot entries: O76082 and Q9HO15)	CUD	CO (free carnitine)
Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MIM 201470, EC 1.3.99.2)	SCAD[a]	C4
Medium/short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (MIM601609, EC 1.1.1.35)	M/SCHAD[a]	C4-OH
Glutaric acidemia type II (MIM 231680) (multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency [EC 1.5.5.1])	GA2[a]	C4–C18 saturated and unsaturated species
Medium-chain ketoacyl-CoA thiolase deficiency (MIM 602299, EC 2.3.1.16)	MCAT[a]	C8, C8-OH, and C10-OH
Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MIM 607008, EC 1.3.99.3)	MCAD[a]	C8
2,4-Dienoyl-CoA reductase deficiency (MIM 222745, EC 1.3.1.34)	DERED[a]	C10:2
Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MIM 201475, EC 1.3.99.13)	VLCAD	C14:1
Carnitine palmitoyltransferase I deficiency (MIM 255120, EC 2.3.1.21)	CPT IA[a]	C16 (low)
Carnitine palmitoyltransferase II deficiency (MIM 255110, EC 2.3.1.21)	CPT II[a]	C16 (high)
Carnitine acylcarnitine translocase deficiency (MIM 212138; Swiss-Prot entry: O43772)	CACT[a]	C16 (high)
Long-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (MIM 609016, EC 1.1.1.211)	LCHAD[a]	C16-OH and/or C18:1-OH
Trifunctional protein deficiency (MIM 600015, EC 1.1.1.211)	TFP[a]	C16-OH and/or C18:1-OH

4.2 Les anomalies de transport de la carnitine et du cycle de la carnitine (97)

La carnitine joue un rôle essentiel dans le transfert des acides gras à longues chaînes vers la matrice mitochondriale. Ce transfert nécessite de nombreuses enzymes et transporteurs pour accumuler la carnitine dans la cellule (OCTN2, transporteur de la carnitine), la conjuguer avec un acide gras à longue chaîne (CACT), et conjuguer les acides gras avec le CoA afin de subir la ß oxydation intra mitochondriale (CPT2).

4.2.1 Les anomalies de transport de la carnitine

4.2.1.1 Le déficit primaire en carnitine (PCD) ou systemic carnitine deficiency (SCD)

Le déficit primaire en carnitine est une affection autosomique récessive rare causée par une anomalie fonctionnelle de l'OCTN2, transporteur de la carnitine. Cette anomalie est codée par le gène SLC22A5, localisé en 5q31.1 (phenotype MIM number : 212140 ; OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*™). L'incidence en Europe serait identique à celle du Japon :1/40 000 nouveaux-nés (98).

La perte de ce transporteur situé dans la membrane plasmique entraîne une fuite urinaire de carnitine, une hypocarnitinémie et une baisse du pool de carnitine tissulaire. Les individus hétérozygotes ont une hypocarnitinémie modérée, expliquée par une fuite urinaire plus modeste en carnitine (99).

La présentation clinique correspond à un tableau métabolique (atteinte neurologique : hypoglycémie hypocétosique avec encéphalopathie hépatique) ou à un tableau de défaillance myocardique associé à une myopathie musculaire squelettique. La présentation métabolique est plus fréquente avant deux ans. L'administration par voie intra veineuse de glucose doit être rapide afin de prévenir le coma et le décès. Chez les patients plus âgés, c'est la présentation cardiaque qui prédomine. La cardiomyopathie peut être associée à une hypotonie (atteinte musculaire squelettique) et la composante métabolique est plus discrète par rapport aux symptômes cardiaques.

Le diagnostic biologique repose sur la mise en évidence de taux de carnitine libre et totale très bas (carnitine libre de 0 à 5µM pour une normale en 25 et 50µM) avec une excrétion urinaire sélective de carnitine. Il faut différencier les atteintes rénales où d'autres composants sont éliminés dans les urines du PDC. Les autres diagnostics différentiels doivent aussi être éliminés : acidémies organiques, anomalies de la ß oxydation ou du cycle de la carnitine. Le

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

diagnostic est confirmé par une exploration in vitro de la captation de la carnitine par les lymphocytes ou les fibroblastes du patient, cette recapture étant réduite (100).
Une recherche parmi les 49 mutations actuellement disponibles du gène SLC22A5 peut être proposée (97).
Le traitement de fond repose sur la supplémentation en carnitine, initiée de préférence avant une crise majeure. La dose doit être adaptée au taux plasmatique car la carnitine à haute dose provoque diarrhées et inconfort digestif. Le pronostic est favorable si le traitement est suivi à vie, évitant la survenue d'épisodes de décompensation.

4.2.1.2 Le MCD (Muscular Carnitine Deficiency)

Le PCD peut aussi être limité au muscle squelettique : il s'agit du MCD, phenotype MIM number : 212160.

4.2.2 Les anomalies du cycle de la carnitine

4.2.2.1 Le déficit en Carnitine Palmitoyl Transférase de type 1 (CPT1 ; phenotype MIM number : 255120) (97)(73)(101)

Il s'agit de l'isoforme retrouvé dans le foie, les reins, les lymphocytes et les fibroblastes : la CPT 1A.
Fréquence : Une trentaine de cas a été répertorié.
Clinique : période néonatale ou petite enfance, encéphalopathie hépatique (type syndrome de Reye), malaises hypoglycémiques
Biologie : parfois hyperammoniémie, parfois acidose tubulaire, carnitine libre presque toujours élevée, diminution des acylcarnitines à longues chaînes avec augmention des acylcarnitines à courtes chaînes dans le plasma.

4.2.2.2 Le déficit en Carnitine Palmitoyl Transférase de type 2 (CPT2 ; phenotype MIM number : 600650) (73)(101)

Il n'existe qu'un isoforme.
Fréquence : anomalie parmi les plus communes de la ßOAG avec plus de 300 cas publiés.
Trois formes cliniques existent:

*forme adulte (la plus fréquente) : forme modérée principalement musculaire (myalgies, faiblesses musculaires…) déclenchée par l'exercice prolongé, le jeûne, le stress… pourvoyeuses de rhabdomyolyses, avec des périodes asymptomatiques entre les crises.
*forme infantile : début entre 6 mois et 2 ans, forme intermédiaire, atteinte hépatique, hépatomégalie transitoire, hypoglycémie hypocétosique causée par un jeûne ou une infection, voire atteinte cardiaque (cardiomyopathie, troubles du rythme).
*forme néonatale : la plus sévère, souvent létale, hypoglycémie hypocétosique, hépatomégalie, troubles respiratoires, cardiomégalie avec troubles du rythme et de la conduction.
Biologie: acidose métabolique et hyperammoniémie dans les formes infantiles et néonatales ; augmentation de la CK et des transaminases chez l'adulte ; de manière quasi constante : baisse de la carnitine libre et totale, augmentation des acylcarnitines à longues chaînes

4.2.2.3 Le déficit en Carnitine Acylcarnitine Translocase (CACT ; phenotype MIM number : 613698) (73)(97)

La CACT est nécessaire au transport des AG de C10 à C24.
Fréquence : rare mais découverte de quelques cas grâce aux programmes de dépistage de certains pays.
Clinique : période néonatale, épisodes d'hypoglycémie, cardiomyopathie, arythmie, apnées ; séquelles neurologiques fréquentes et décès le plus souvent ; rares formes tardives.
Biologie : hyperammoniémie, hypoglycémie hypocétosique, CK et transaminases élévées, carnitine libre basse et élévation des acylcarnitines à chaînes longues. Une mesure de l'activité enzymatique de la CACT est nécessaire pour la différencier du déficit néonatal en CPTII.

4.3 Les anomalies du cycle de la ßOAG (à l'intérieur de la mitochondrie)

4.3.1 Le déficit en Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD ; phenotype MIM number : 609575) (66)(102)

Ce déficit fait partie du programme de dépistage néonatal dans certains pays. Plus d'une centaine de cas ont été rapportés.

Clinique : trois phénotypes majeurs

*forme néonatale : sévère, précoce, cardiomyopathies, mortalité très élevée.

*forme infantile : intermédiaire, hypoglycémies hypocétosiques, rares cardiomyopathies, mortalité plus faible.

*forme adulte : rhabdomyolyses et myoglobinurie.

Biologie : élévation des acylcarnitines à longues chaînes avec prédominance du C14 :1 (tétradécénoylcarnitine).

4.3.2 Le déficit en Medium chain Acy-CoA Dehydrogenase (MCAD ; phenotype MIM number : 607008) (66)(13)

C'est le déficit de la ßOAG le plus fréquent. Sa prévalence dans les pays européens est estimée entre 1/10 000 et 1/26 000. Il n'y a pas d'estimation précise de son incidence en France. Sa caractérisation date du début des années 1980. La HAS recommande son dépistage en France depuis la publication de son rapport en Juin 2011. Le dépistage est déjà en place dans de nombreux pays européens, au Canada, en Australie, aux Etats-Unis…

Clinique : essentiellement hépatique et très proche du déficit en CPTIA, premiers symptômes lors d'un épisode de jeûne prolongé souvent en lien avec une infection virale survenant entre le premier jour de vie et environ 6 ans, la première crise est fatale dans plus de 20% des cas, hypoglycémie hypocétosique, nausées, hépatomégalie, encéphalopathie, léthargie voire arrêt cardio-respiratoire. Des cas chez l'adolescent et l'adulte ont étés retrouvés.

Biologie : acidose métabolique, hyperammoniémie, transaminases élevées concomitantes de la crise ; augmentation dans les urines de certains acylglycines (habituellement métabolites mineurs de l'oxydation des acides gras) : suberylglycine, phénylpropionyglycine et hexanoylglycine ; taux de carnitine libre et total normal ou bas, augmentation des acylcarnitines à chaînes moyennes.

4.3.3 Le déficit en Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD; phenotype MIM number : 606885) (103)

Clinique : premiers symptômes avant l'âge de 5 ans, retard de développement, hypotonie, épilepsie, troubles du comportement, hypoglycémie ; en général, amélioration spontanée des symptômes voire disparition au cours du suivi mettant en cause l'existence même de la pathologie ou son caractère multifactoriel.

Biologie : augmentation du C4 (butyrylcarnitine) plasmatique, élévation d'acides organiques urinaires : acide éthylmalonique, acide méthylsuccinique voire de butyrylglycine.

4.3.4 Le déficit en Long Chain 3 Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD)/ protéine trifonctionnelle (TFP) (104) (105) (66)

La protéine trifonctionnelle (TFP) est un complexe enzymatique présentant plusieurs sous-unités α et plusieurs sous-unités ß. Elle est dotée de trois activités enzymatiques agissant sur les chaînes longues : l'énoyl CoA hydratase et LCHAD sur la sous-unité α, LKAT sur la sous-unité ß.

Il existe deux déficits affectant ce complexe : un déficit isolé en LCHAD et un déficit touchant les trois activités enzymatiques (TFP). Le déficit isolé en LCHAD est de loin le plus fréquent.

Clinique du déficit en LCHAD :

*forme sévère : symptômes apparaissant dans les premiers mois de la vie, encéphalopathie, hypoglycémie hypocétosique, décès quasi constant.

*forme moins sévère : hypoglycémie hypocétosique, vomissements, hypotonie, hépatomégalie, signes de toxicité des métabolites accumulés : rétinite pigmentaire, neuropathie périphérique.

*cas des femmes enceintes porteuses d'un enfant déficitaire en LCHAD : prévalence accrue de HELLP syndrome (Hemolytic anemia, Elevated Liver enzymes and Low Platelet Count), de SHAG (Stéatose Hépatique Aigue Gravidique) de mauvais pronostic pour la mère et l'enfant.

Pour le déficit en TFP, la clinique est la même mais plus sévère que pour le déficit en LCHAD. Les anomalies biologiques sont identiques.

Biologie : élévation de la CK, des transaminases, des 3-hydroxyacylcarnitines (C14 :OH, C16 :OH, C18 :OH) plasmatiques, élévation des acides 3-hydroxycarboxyliques dans les urines.

4.3.5 Une forme mixte entre anomalie de la ßOAG et anomalie du catabolisme d'acides aminés ramifiés : l'acidurie glutarique de type 2 (AG2) / déficit multiple en acyl-CoA dehydrogénase (MADD) (104)(73)

Ce déficit correspond à une baisse ou un absence d'activité de protéines assurant le transport des électrons à la chaîne mitochondriale (electron transfer flavoprotein, electron transfer protein coenzyme Q oxydoreductase), ce qui entraîne un dysfonctionnement de l'activité enzymatique de plusieurs acyl-CoA déshydrogénases (dont la VLCAD, la LCAD, la MCAD et la SCAD) et de d'enzymes intervenant dans le métabolisme de certains acides aminés ramifiés, de la lysine, de l'acide 2-hydroxyglutarique et de la sarcosine.

Cliniques : trois phénotypes

*phénotype néonatal avec anomalies congénitales : prématurité, hypoglycémie hypocétosique, acidose métabolique sévère, dysplasie rénale, dysmorphie faciale ; décès dans la première semaine de vie.

*phénotype néonatal sans anomalies congénitales graves : survie au-delà de la première semaine de vie mais décès fréquent au cours d'une décompensation métabolique grave ou d'une cardiomyopathie.

*phénotype d'apparition tardive : présentation hétérogène, possibles épisodes de vomissements avec acidose métabolique et hypoglycémie les premiers mois de la vie, ou pseudo syndrome de Reye (vomissements, déshydratation, encéphalopathie apyrétique, hépatomégalie) et myopathie proximale à l'âge adulte.

Biologie : augmentation de la glutarylcarnitine (C5-DC), de tous les acylcarnitines plasmatiques (chaînes courtes moyenne et longues), saturés et insaturés ; excrétion urinaire massive d'acide glutarique, des acides dicarboxyliques et des nombreuses glycines.

La **figure 15** reprend les différentes pathologies citées dans le chapitre.

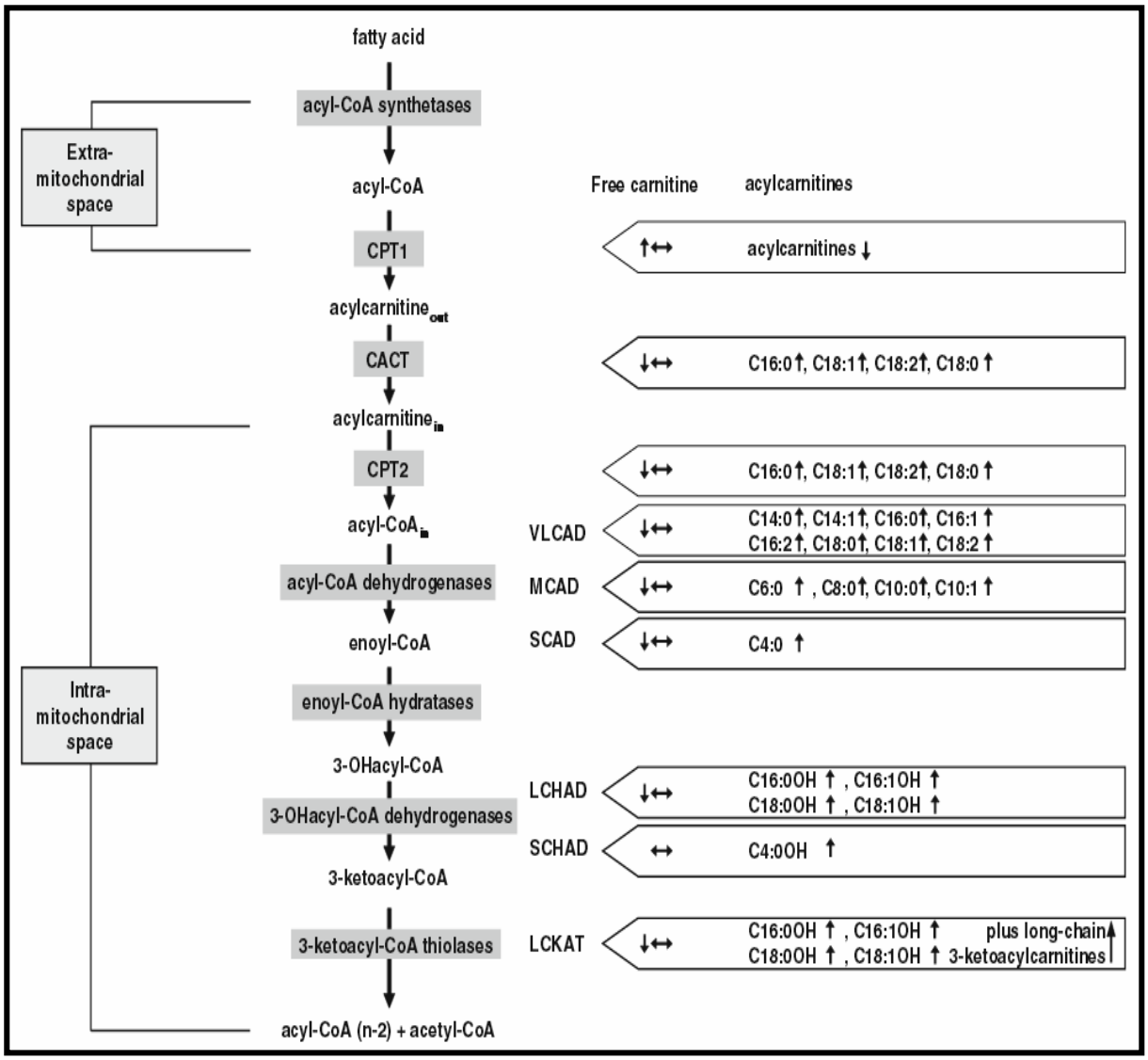


Figure 15: Schéma récapitulatif des anomalies de l'oxydation des AG avec le statut de la carnitine et des acylcarnitines plasmatiques, d'après (106)

4.4 Les aciduries organiques ou acidémies organiques AO (107)

4.4.1 Généralités

Ce sont des erreurs innées affectant le métabolisme du squelette carboné des acides aminés. La transmission est autosomique récessive et on les classe en deux catégories : les aciduries organiques classiques et les aciduries organiques cérébrales.

Les acides aminés sont dégradés sous forme d'ammoniac et d'acides organiques. En cas d'anomalie, des acides organiques vont s'accumuler (**figure 16**). On retrouve aussi des taux effondrés de carnitine libre car elle se comporte comme un épurateur des composés toxiques accumulés. Ces toxiques sont éliminés dans les urines sous forme d'acylcarnitines.

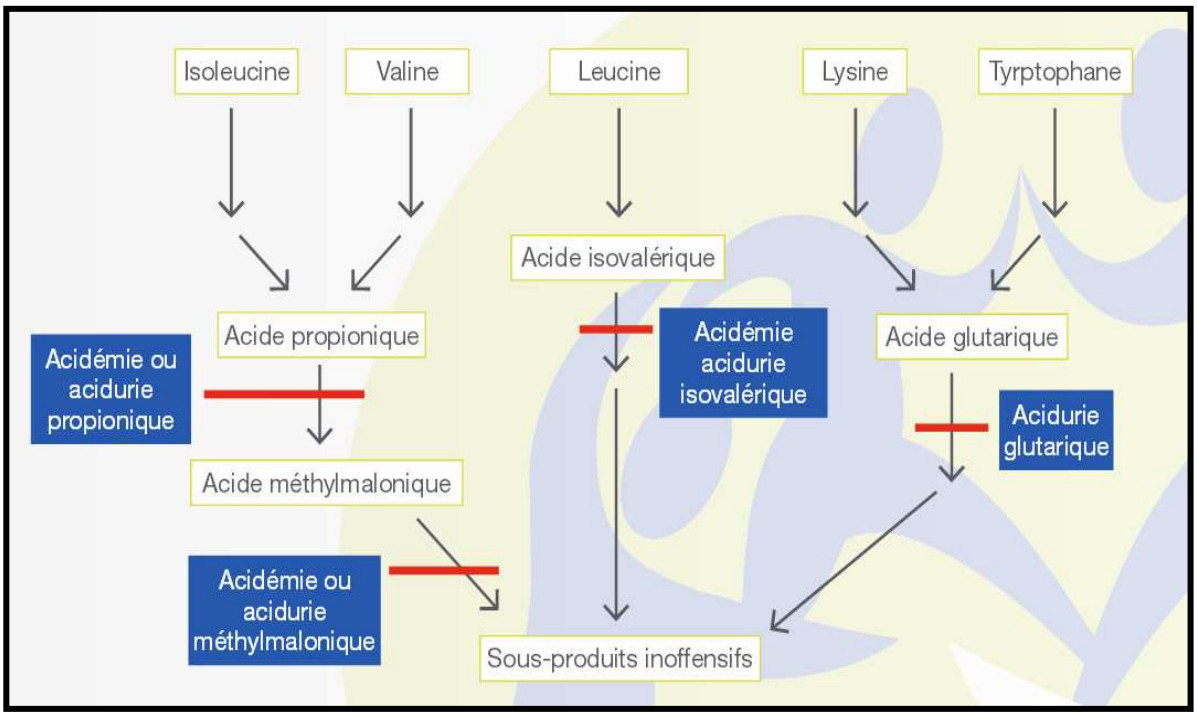


Figure 16: Schéma de l'origine de quatre aciduries organiques, d'après (108)

4.4.2 Les aciduries organiques classiques

Les trois plus importantes AO sont : l'acidurie propionique, méthylmalonique et isovalérique. Ces pathologies impliquent le métabolisme des acides aminés ramifiés: leucine, isoleucine, valine. Il existe d'autres déficits enzymatiques : déficit en 3-cétothiolase et en 3-hydroxy-3méthylglutaryl-CoA-lyase (HMG-CoA-lyase).

Clinique : trois formes

*forme néonatale : intervalle libre, encéphalopathie métabolique, léthargie, difficultés alimentaires, déshydratation, hypotonie axiale avec hypertonie segmentaire, myoclonies, troubles neurovégétatifs voire œdème cérébral, coma, défaillance multiviscérale.

*forme intermittente : elle peut apparaître jusqu'à l'âge adulte avec comas acido-cétosiques récurrents, léthargie, ataxie, signes neurologiques focaux, obnubilation voire coma.

*forme chronique progressive : retard de croissance, vomissements chroniques, anorexie, ostéoporose, hypotonie, retard psychomoteur, infections à répétition.

Biologie : acidocétose, élévation des lactates, hyperammoniémie (par un défaut de synthèse de l'urée), l'analyse des acylcarnitines urinaires et plasmatiques retrouvent une augmentation :

- du C5 (isovalérylcarnitine) pour l'acidurie isovaléique
- du C3 (propionylcarnitine) pour l'acidurie propionique
- du C3 (propionylcarnitine) et du C4-DC pour l'acidurie méthylmalonique
- du C5 :1 (tiglylcarnitine) et C5-OH (2-méthyl-3-hydroxybutyrylcarnitine) pour le déficit en 3-cétothiolase
- du C5-OH (3-hydroxyisovalerylcarnitine) et du C6-DC (méthylglutarylcarnitine) pour le déficit en HMG-CoA-lyase.

4.4.3 Les aciduries organiques cérébrales (109)

Ces pathologies ont la particularité d'entraîner des signes évocateurs d'encéphalopathie sans anomalie du bilan biologique de base.

L'acidurie glutarique de type 1 fait partie de ces pathologies. Le déficit enzymatique concerne la glutaryl-CoA déshydrogénase, impliquée dans le métabolisme du tryptophane, de la lysine et de l'hydroxy-lysine.

Clinique : développement d'une atteinte neurologique entre 3 mois et 3 ans avec épisode d'encéphalopathie souvent provoquée par une infection, séquelles : dystonie et dyskynésies sévères par atteinte du striatum (atteinte de la voie extra-pyramidale).

Biologie: accumulation d'acides organiques (acide glutarique et acide 3-hydroxyglutarique) dans les urines ; présence de glutarylcarnitine (C5-DC) dans le plasma.

4.5 Principes de traitement et de suivi des anomalies de la ßOAG et des aciduries organiques

4.5.1 Traitement et suivi des anomalies de la ßOAG (77)

Le premier axe de traitement, après le traitement d'urgence d'une crise, est l'éviction stricte des situations de catabolisme dues au jeûne ou à d'autres situations telles que les infections.

Rapport-Gratuit.com

En cas d'anomalie touchant les acides gras à longues chaînes, il est possible d'optimiser les apports alimentaires grâce à un régime approprié: restriction en graisses, supplémentation en triglycérides à chaînes moyennes, en acides gras essentiels, apport important en hydrates de carbone, supplémentation en L-carnitine ou riboflavine dans certains cas.
Si la supplémentation en L-carnitine est universelle, celle des acides gras à longues chaînes est controversée en raison des cas rapportés d'effets indésirables (arythmies …).
Le suivi des patients traités repose sur une évaluation clinique régulière, une analyse des acylcarnitines et un dosage des acides gras libres, y compris les acides gras essentiels.

4.5.2 Traitement et suivi des aciduries organiques (107)

Une décompensation aigüe est traitée par l'apport d'une quantité importante de glucose afin de stopper le catabolisme des acides aminés. Avec le traitement de l'acidose, une épuration extra-rénale peut être nécessaire, l'apport protéique est arrêté provisoirement et de la carnitine est administrée pour favoriser le métabolisme mitochondrial et améliorer l'épuration des molécules toxiques.
Après l'éviction totale et la plus précoce possible du toxique, il faut se contraindre à un schéma alimentaire strict, le risque de séquelles neurologiques étant présent à chaque crise. Le traitement dépend de la maladie causale et le pronostic dépend aussi de la pathologie, et de la sévérité des crises. Les acides aminés « pathogènes » doivent être évités alors qu'il faut supplémenter les patients en acides aminés dont le métabolisme est normal. Par exemple, en cas d'acidémie isovalérique, le but du traitement d'entretien est une absence d'acide isovalérique dans les urines, grâce à un régime très hypoprotéiné qui est ensuite adapté à la croissance de l'enfant. Les enfants atteints sont supplémentés en L-carnitine ou en L-glycine. Le développement intellectuel dépend de la précocité du diagnostic et de la compliance au traitement à long terme. Parmi les acidémies organiques, l'acidémie isovalérique a le meilleur pronostic.

Chapitre 5 Stratégie diagnostique des anomalies de la ß oxydation des acides gras et de certaines anomalies du métabolisme des acides organiques

5.1 Orientation générale devant une suspicion de maladie métabolique

Devant un coma, une hypotonie, une cardiopathie (…) et après avoir éliminer les causes les plus fréquentes de ces symptômes, une recherche générale de pathologie métabolique est envisagée : anomalie du métabolisme des acides aminés, des acides organiques, de l'oxydation des acides gras…

Le **Tableau VIII** permet d'orienter la réflexion clinico-biologique vers un type d'anomalie du métabolisme en fonction de la présence ou de l'absence d'un intervalle libre avant les symptômes et des résultats du bilan biochimique de base : pH artériel, cétose, ammoniémie…

	Interv. libre	pH Acidose	Cétose	NH3	Lactate	Glycemie
Cycle de l'urée	oui	↗ ou N	⊘	↗↗↗	N	N
Acidurie organique	oui	↘↘	++++	↗↗	N ou ↗	↗ ou N ou ↘
Leucinose	oui	N	++	N ou ↗	N ou ↗	N
Krebs, mito, PDH, PC	Non	N ou ↘	⊘ à ++	N	↗ à ↗↗↗	N ↘
OAG	Non	N	⊘	N ou ↗	N	↘↘↘

Tableau VIII : Orientation étiologiques vers les différentes voies métaboliques devant un patient suspect de pathologie métabolique en phase aigue d'après (110)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5.2 Orientation devant une suspicion d'anomalie de la ß oxydation des acides gras ou de certaines aciduries organiques

5.2.1 Généralités

Devant une suspicion d'anomalie de la ß oxydation des acides gras ou d'anomalie du métabolisme des acides organiques, il doit être réalisé :

1) les analyses biochimiques suivantes : corps cétoniques (acétylacétate, ß-D-hydoxybutyrate, acétone) et lactate
2) une chromatographie des acides organiques urinaires et une analyse des acylcarnitines.

5.2.2 Explorations spécialisées

5.2.2.1 Matrices utilisées

Comme nous l'avons vu, le plasma, le sérum et le sang total sont des matrices utilisées pour l'analyse des acylcarnitines. Les urines permettent de détecter certaines acidémies organiques: acidémie glutarique de type I, déficit en biotinidase et déficit en isobutyryl-CoA déshydrogénase. De nombreux autres tissus peuvent être utilisés : fibroblastes en cultures, lymphocytes, amniocytes, muscle et foie (81). L'étude post-mortem peut être réalisée sur papier buvard (111) ou prélèvement de bile (112). Le liquide amniotique peut être utilisé dans certains cas dans le cadre d'un diagnostic prénatal (113).

5.2.2.2 Analyse des acylcarnitines et de la carnitine totale et libre sur plasma ou sang total

Leur analyse en MS, sur papier buvard ou plasma, est un outil diagnostic puissant pour les anomalies de la ß oxydation. En effet, la plupart de ces anomalies sont caractérisées par une augmentation d'un ou plusieurs acylcarnitines définis.

La carnitine libre doit être dosée pour deux raisons :

1- C'est le seul marqueur du déficit en transporteur de la carnitine CPT IA. Dans ce cas, la carnitine libre est effondrée, sans augmentation des acylcarnitines (77).
2- La carnitine a un rôle d'épurateur des acyl-CoA en excès. Une anomalie métabolique peut être masquée par le rôle de la carnitine qui exporte ce métabolite en excès : le système est compensé. Cette hypocarnitinémie doit alors faire suggérer une anomalie.

Dans la situation « compensée », la carnitine est effondrée avec augmentation d'un ou plusieurs acylcarnitines, signant l'anomalie.

5.2.2.3 Analyse des acides organiques urinaires

Elle permet le diagnostic de certaines aciduries organiques (acidurie méthylmalonique, propionique et isovalérique) grâce à des profils typiques (107). Dans les anomalies de la ßOAG, on peut retrouver des acides dicarboxyliques et les acylglycines dans certaines pathologies (77).

Il est important de réaliser ces différentes explorations qui sont des approches complémentaires. De plus, le dossier clinique du patient doit être bien connu et les explorations répétées (per et intercritiques). Ces explorations sont utiles pour le suivi des patients sous traitement. En cas de suspicion forte d'anomalie ou si les explorations n'ont pas permis de faire un diagnostic poutant très fortement suspecté cliniquement, des investigations de confirmation sont nécessaires.

5.2.3 Explorations complémentaires

5.2.3.1 Exploration de la bêta-oxydation in vitro (77)

Le principe est de rechercher un maximum de pathologies (ßOAG et certaines aciduries organiques) grâce à un profil quantitaif des acylcarnitines in vitro. On utilise des mitochondries isolées, des fibroblastes ou des cellules sanguines périphériques. Les cellules sont incubées avec des précurseurs, des AG à longues chaînes et de la carnitine en excès. De nombreuses techniques existent (radio-HPLC, MS/MS, GC/MS). Elles mettent en évidence l'accumulation d'acylcarnitines en relation avec le bloc métabolique en cause. Dans tous les cas, il sera est nécessaire de confirmer l'anomalie par une analyse enzymatique ou mutationnelle.

5.2.3.2 Etudes enzymatiques spécifiques (77)

La mesure de l'activité enzymatique est très complexe à cause d'un chevauchement des substrats en rapport avec les longueurs des chaînes, pour les différentes enzymes. Elle est

réalisée sur des fibroblastes, des biopsies tissulaires ou des lymphocytes. C'est une analyse qui requiert une très grande expertise.

5.2.3.3 Biologie moléculaire (77)

De nombreux gènes de la ßOAG ont étés déterminés, ce qui rend l'analyse mutationnelle possible si les autres investigations n'ont pas été concluantes. Cependant, en raison des nombreuses mutations privées, des polymorphismes, du haut degré d'hétérogénéité allélique, cette analyse reste imparfaite. Elle a en revanche une place importante pour les études familiales ou les diagnostics prénataux lorsque la mutation familiale est connue. Il y a tout de même des mutations prévalentes connues pour les déficits en MCAD (1p31.1,*Physical location :* 76.190.042 - 76.229.353), LCHAD (2p23.3 *Physical location :* 26.413.504 - 26.467.594) et CPT II (1p32.3 *Physical location :* 53.662.100 - 53.679.867).

5.2.4 Exemple de stratégie diagnostique australienne devant un patient suspect d'anomalie de la ßOAG (77)

Après des examens « de routine » ainsi que les examens métaboliques cités précédemment, un diagnostic est souvent envisagé. Dans ce cas, des examens de confirmation sont réalisés (confirmatory tests). En cas de doute, des examens de seconde intention peuvent être réalisés (second level investigations). La **Figure 17** montre un exemple de prise en charge séquentielle en Australie.

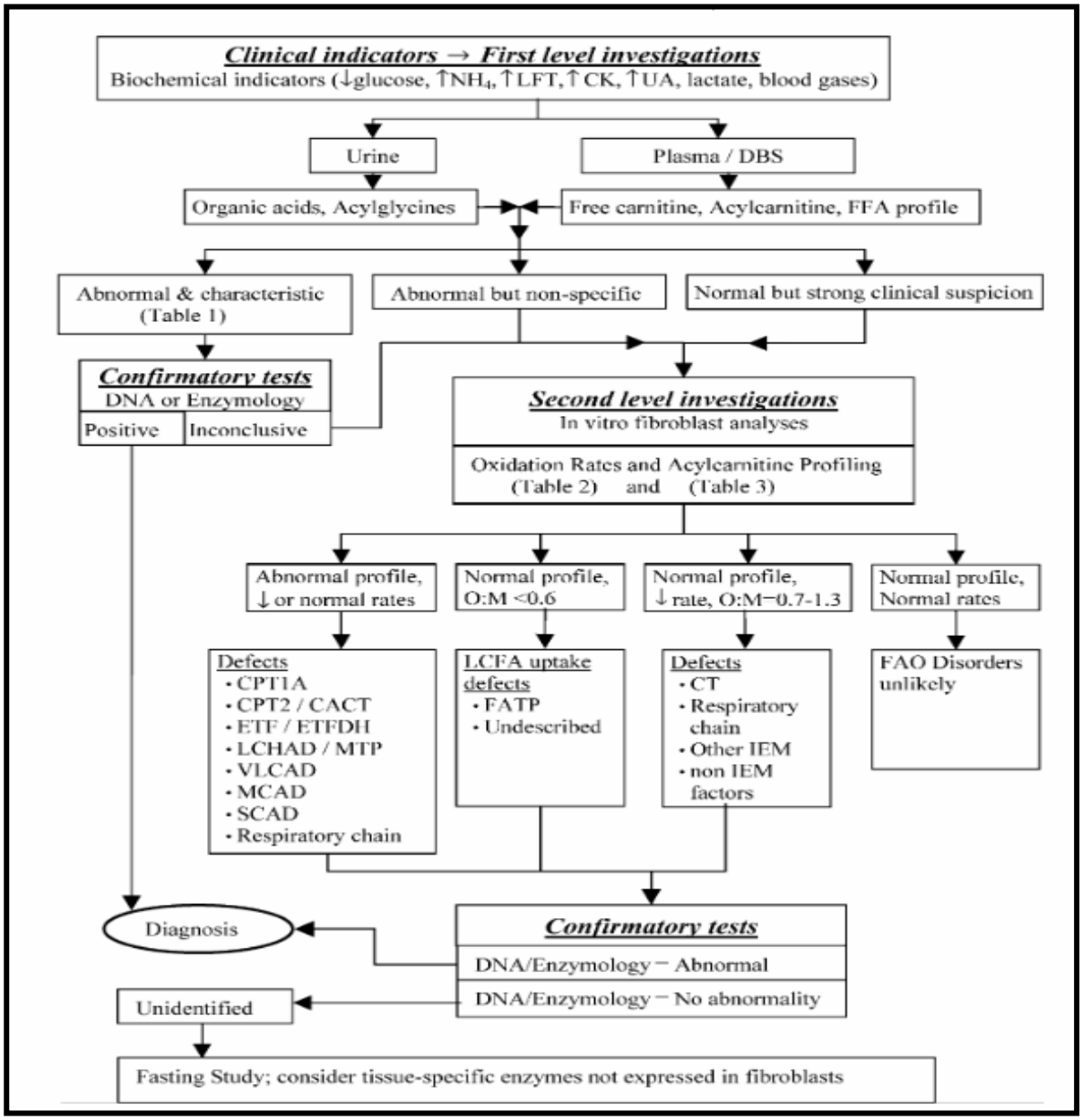


Figure 17: Diagramme des investigations réalisées en Australie devant un patient suspect de présenter un trouble de la ßOAG, d'après (77). Nous ne détaillerons pas les analyses sur fibroblastes (« O: oxydation rates table 2 » et « acylcarniting profiling table 3 ») ainsi que les rapports O :M, qui sont au-delà de notre sujet.

Chapitre 6 Principes de la spectrométrie de masse (114) (115) (11)

6.1 Introduction

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (MS) possède de nombreuses qualités dont sa spécificité, sa grande sensibilité et la grande variabilité de ses applications.

La spectrométrie de masse permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation (ou une cellule de collision). Les méthodes d'ionisation peuvent être « douces » (adduit ou soustraction d'un ion H+ par exemple), moins douces ou en chambre de collision. Nous nous focaliserons sur ces méthodes d'ionisation moins douces où les ions se fragmentent pour donner des ions fils en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser. On obtient alors un spectre de masse, graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z. La MS peut être couplée à des méthodes séparatives : chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC). La MS agit alors comme un détecteur classique en donnant une réponse : l'aire du pic chromatographique proportionnelle à la quantité de produit injecté.

Le comportement chromatographique des molécules (via le temps de rétention TR) apporte une dimension supplémentaire pour l'identification de la molécule d'intérêt. Ces couplages permettent aussi la purification et la concentration de molécules avant leur arrivée dans la source d'ions. Cela facilite leur détection et leur quantification.

Pour une étude quantitative, il faut utiliser dans la mesure du possible un étalon interne (EI) qui est l'analogue "lourd" du produit à analyser. Cet EI est marqué soit au carbone 13 (C13) soit au deutérium (D2). Il présente le même temps de rétention (TR) que le produit à analyser et subit le même type d'ionisation que ce produit. Etant introduit en quantité connue, il permet donc de corriger une éventuelle « perte » de signal au moment de l'ionisation, celle-ci pouvant être partielle suivant les molécules, les matrices, les sources d'ionisation. La molécule d'intérêt garde une relation de proportionnalité avec son EI, qui « réagit » comme elle.

Etant donné que ce travail a été réalisé avec un spectromètre de masse API 5500 Qtrap d'ABSciex ayant comme source d'ionisation l'ESI, nous ne verrons en détail que cette source

d'ionisation. De même nous ne détaillerons que les analyseurs un quadripolaires et les pièges à ions.

6.2 Notions élémentaires et définitions

Le spectromètre de masse est un instrument qui comprend différentes parties placées en série (**Figure18**). Après introduction de l'échantillon, ces parties permettent successivement l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon dans la source, l'accélération des ions formés, leur séparation en fonction de leur masse (dalton) et de leur charge grâce à l'analyseur, puis leur détection.

L'ion parent ou précurseur est un ion qui engendre un ion fils ou fragment. Ce terme s'applique à tout ion susceptible de se fragmenter.

L'ion fils ou fragment est l'ion produit par la perte d'un ou plusieurs fragments d'un ion précurseur.

La résolution est la capacité que présente un spectromètre de masse à distinguer des ions présentant des rapports m/z voisins mais différents. La « résolution unitaire » désigne la capacité d'un analyseur à distinguer l'ion de rapport m/z de l'ion de rapport m/z+1. Elle se rencontre lors de l'utilisation des analyseurs de type quadripôle ou piège à ions.

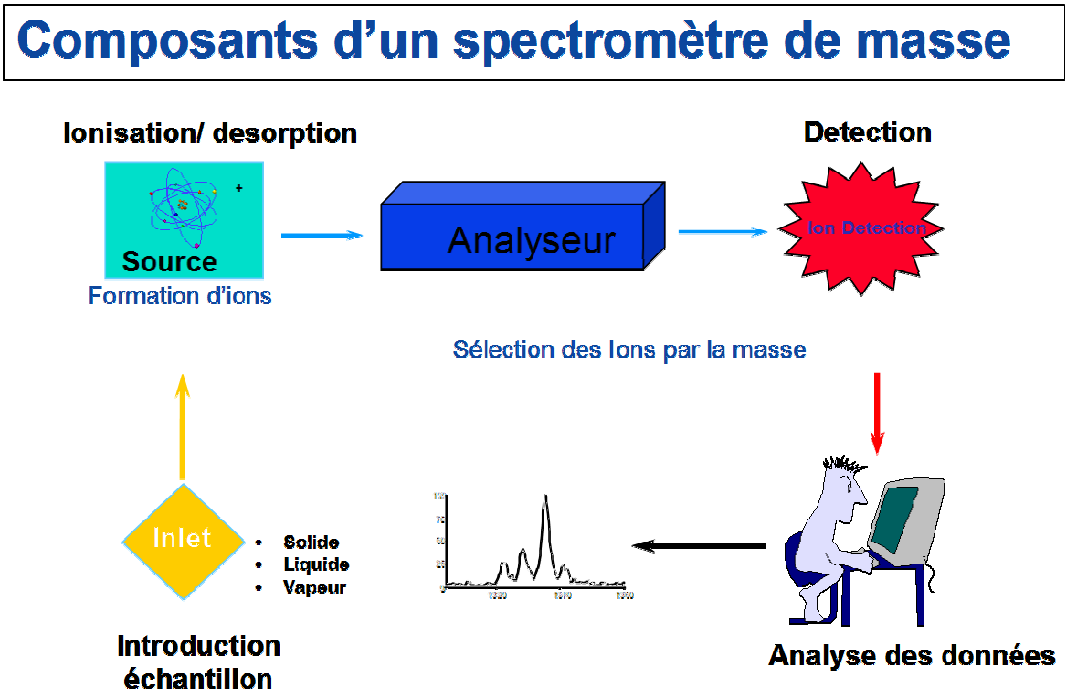


Figure 18: Composants d'un spectromètre de masse, d'après (116)

6.3 Les sources d'ionisation

6.3.1 Définition

La source permet l'évaporation et l'ionisation des analytes de l'échantillon. Le choix de la méthode d'ionisation dépend en partie des caractéristiques physico-chimiques des molécules.
Nous ne détaillerons pas les méthodes d'ionisations « douces » (ionisation par impact électronique, ionisation chimique à pression réduite). Elles sont anciennes, réservées aux composés facilement volatilisables de faible poids moléculaires, couplées à la chromatographie en phase gazeuse. D'autres méthodes d'ionisation douces ont été développées ces vingt dernières années. Ces méthodes ne fragmentent pas ou peu les molécules.

6.3.2 La source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

La source MALDI couplée à un spectromètre de masse à temps de vol TOF (Time Of Flight) permet l'analyse des molécules de poids moléculaire élevé (>500Da). Elle est par exemple utilisée pour l'analyse des agents infectieux. Nous ne détaillerons pas cette technique.
Pour analyser les molécules de faible poids moléculaire, deux techniques sont utilisées à pression atmosphérique : l'ESI (Electrospray Ionization) ou électro-nébulisation et l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Elles sont idéalement couplées avec la chromatographie en phase liquide. Nous nous intéresserons particulièrement à l'ESI.

6.3.3 L'ionisation par électro-nébulisation ou ESI

Elle peut être utilisée en aval d'une chromatographie en phase liquide. Elle consiste à pulvériser/infuser une solution (phase mobile), à ioniser les molécules qui sont présentes et à en assurer l'évaporation en appliquant un champ électrique, à pression atmosphérique, sur le liquide traversant un capillaire (nébuliseur). Une différence de potentiel de quelques milliers de volts est appliquée entre le nébuliseur et une contre-électrode. L'intensité du champ électrique entraîne une rupture du film liquide en fines gouttelettes qui vont se charger et devenir de plus en plus fines avec l'augmentation de ce champ électrique. L'échantillon est ainsi pulvérisé sous forme de gouttelettes à la sortie du nébuliseur. Le solvant contenu dans ces gouttelettes est alors progressivement évaporé à l'aide d'un gaz neutre (azote) et grâce à l'élévation de température de la source. Les gouttelettes deviennent de plus en petites et de

plus en plus chargées (spray) jusqu'à ce que chaque ion se retrouve « éjecté » des gouttelettes (désorption des ions) du fait des répulsions électrostatiques entre les charges. Cette explosion des gouttelettes s'appelle la limite de Rayleigh ou l'explosion de Coulomb (**Figure 19**). Ce phénomène n'est pas totalement élucidé.

Une série de lentilles électromagnétiques dirigent alors les ions dans l'analyseur.

En fonction du mode d'ionisation, les ions chargés produits sont soit positifs (ionisation en mode positif, quand l'embout du nébuliseur joue le rôle de l'anode) soit négatifs (ionisation en mode négatif). Le mode d'ionisation doit être choisi selon les ions que peuvent produire les molécules à analyser.

Plusieurs propriétés physicochimiques du solvant influent sur la qualité du nébulisat : la température d'ébullition, la tension superficielle, la conductivité des solvants et électrolytes. La nébulisation sera meilleure avec des solvants à base de méthanol, d'acétonitrile ou d'isopropanol, qui présentent une faible tension superficielle. La conductivité ne doit pas être trop élevée (eau) ni trop basse (hexane, cyclohexane).

Le pH du solvant ou la présence ou non de contre ions en solution conjointement aux molécules interviennent sur le degré d'ionisation.

Ce mode d'ionisation est donc peu reproductible d'un spectromètre de masse à l'autre, ce qui oblige à confectionner sa propre bibliothèque de données.

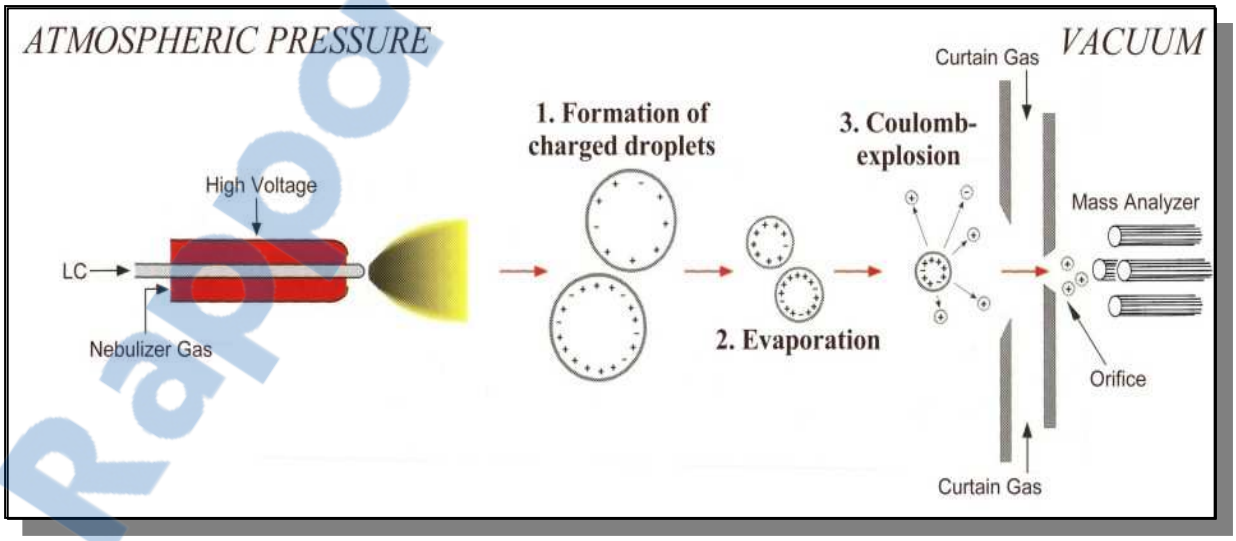


Figure 19: ESI, processus d'ionisation à pression atmosphérique, d'après (116)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

6.4 Les analyseurs de masse

6.4.1 Généralités

L'analyseur sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z. Il ne permet pas leur détection, qui est assurée par un dispositif de multiplication d'électrons.
Il existe différents analyseurs : le filtre quadripolaire, le piège à ions, les analyseurs à temps de vol TOF ou encore électromagnétiques (analyseur à résonance cyclotronique), de très haute résolution. Quadripôles et analyseurs TOF peuvent être utilisés en série, donnant naissance à des instruments hybrides. Par exemple, il existe des couplages « source ESI-analyseurs quadripolaires et TOF » ou des couplages « source ESI-quadrupôle et ion trap ». Schématiquement, les technologies TOF sont destinées à de l'analyse en haute précision en masse (recherche protéomique). Les technologies "trappe d'ions" s'appliquent plus particulièrement à l'analyse qualitative alors que les techniques en triples quadrupôles sont plutôt destinées à l'analyse quantitative. Comme citées si dessus, les dernières avancées technologiques permettent de coupler ces deux dernières technologies afin de proposer des champs d'application qualitatifs et quantitatifs (117).
Nous ne détaillerons que l'analyseur-filtre quadripolaire et le piège à ions, qui font partie des analyseurs utilisant un champ électrique oscillant.

6.4.2 Analyseurs utilisant un champ électrique oscillant

Leur fonctionnement est fondé sur le mouvement d'ions dans un champ électrique oscillant. Grâce aux modifications d'amplitude et de fréquence du champ électrique, l'ion reste confiné entre les deux électrodes. La géométrie et la disposition des électrodes diffèrent d'un analyseur à l'autre. Un quadripôle est constitué de quatre électrodes de section hyperbolique où est appliqué un champ électrique constant et un champ électrique alternatif. Dans ce quadruôle, la stabilité de la trajectoire d'un ion soumis à ces champs électriques va être dépendante de sa masse et de sa charge. Il est ainsi possible de séparer différents ions en fonction de leur ratio m/z. Les ions maintiennent une trajectoire dite stable jusqu'au détecteur. Dans un piège à ions, ces champs électriques permettent leur confinement dans l'analyseur, leur détection s'effectuant après leur éjection sélective.

6.4.2.1 Analyseur filtre quadripolaire

Il est constitué successivement d'une série de lentilles électroniques permettant la convergence et l'accélération des ions sortant de la source puis d'un quadrupôle formé par quatre barres entre lesquelles sont établies des différences de potentiel. L'ensemble débouche sur un détecteur. L'ion entrant dans le quadripôle est accéléré, puis il pénètre entre les barres du quadrupôle et conserve sa vitesse. Si les tensions et la fréquence imposées sont telles que l'ion entre en contact avec une barre, il sera déchargé et ne pourra pas sortir du quadrupôle, donc il sera « filtré », non détecté car il aura présenté une trajectoire instable. Seuls sont détectés les ions ayant présenté une trajectoire stable (**Figures 20 et 21**).

6.4.2.1.1 Les différents modes de scan

L'analyseur quadripolaire peut être utilisé selon deux modes : 1) le mode balayage ou scan qui permet la détection de tous les ions, 2) le mode statique ou SIM Single ion Monitoring, ou tension U et amplitude V du courant sont fixés pour ne détecter spécifiquement qu'un ou plusieurs ions.

Plusieurs quadrupôles peuvent être couplés en série (MS en tandem) : le premier quadrupôle Q1 isole l'ion parent, Q2 le fragmente, et Q3 analyse les ions fils apparus. Q2 est une « chambre de collision » (valeur U nulle) qui a pour rôle de focaliser les ions au centre des barres. Un gaz de collision y est introduit, l'ion précurseur se fragmente et les ions fils sont analysés par Q3 (**Figure 22**).

La combinaison des modes scan et SIM permet de réaliser quatre types de procédures :

1- MRM Multiple Reaction Monitoring : ce mode permet de trier une ou plusieurs molécules ayant un ion précurseur et un ion fragment spécifique. Q1 est réglé pour la sélection exclusive de l'ion parent, Q3 pour la détection du (des) ion(s) fils. Une « transition » correspond au couple ion précurseur/ions fragments et permet de réduire le bruit de fond, facilitant les études de quantification. Le MS triple quadrupôle est généralement couplé à une méthode de séparation par chromatographie. L'identification et la quantification d'une molécule sont assurées par son temps de rétention et au moins deux transitions ions précurseur/ions fragments. La première permet la détection de l'ion et la seconde confirme l'identification de la molécule, diminuant les faux positifs. Ce mode permet de quantifier simultanément de très nombreux composés ayant des structures chimiques différentes (**Figures 23**).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

2- Spectre de masse des ions fils ou balayage des ions fragments ou *product ion scan* : ce mode consiste à injecter un échantillon, à sélectionner un ion précurseur correspondant à la molécule d'intérêt dans Q1, à le fragmenter dans Q2 et à déterminer tous les ions produits en Q3. Ce mode est utilisé pour identifier une substance inconnue dans un mélange complexe ou pour les petites molécules organiques (**Figure 24**).

3- Spectre de masse des ions précurseurs ou balayage des ions parents *ou precursor ion scan* : Un ion fragment est sélectionné en Q3 et tous les ions parents donnant cet ion fils sont balayés en Q1. Ce mode est utilisé pour l'identification structurelle des métabolites d'une molécule, ayant un ion fragment en commun ou pour identifier une famille de molécules ayant une partie de leur structure similaire, par exemple, le profil des acylcarnitines (**Figure 25**).

4- Perte de fragment neutre ou balayage en perte neutre ou *neutral loss scan* : un fragment neutre est choisi et toutes les fragmentations provoquant la perte de ce fragment neutre sont détectées. Ce mode a les mêmes applications que le mode *preucursor ion scan*, pour l'étude des molécules apparentées.

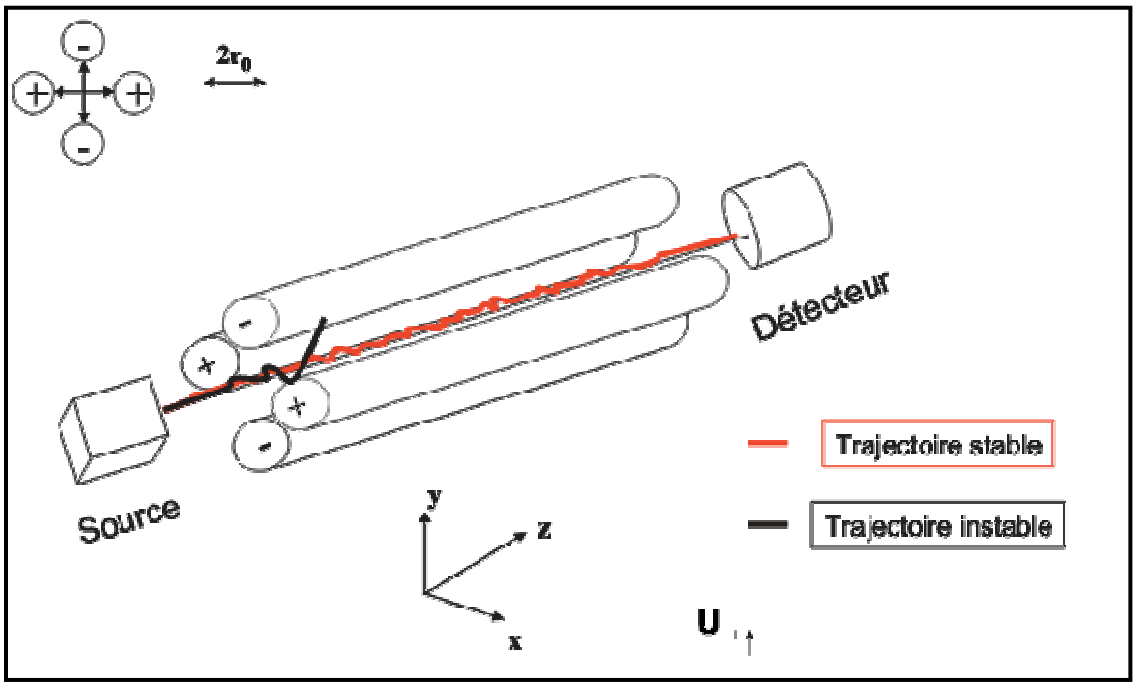


Figure 20 – Schéma du principe d'un triple quadrupôle d'après (118)

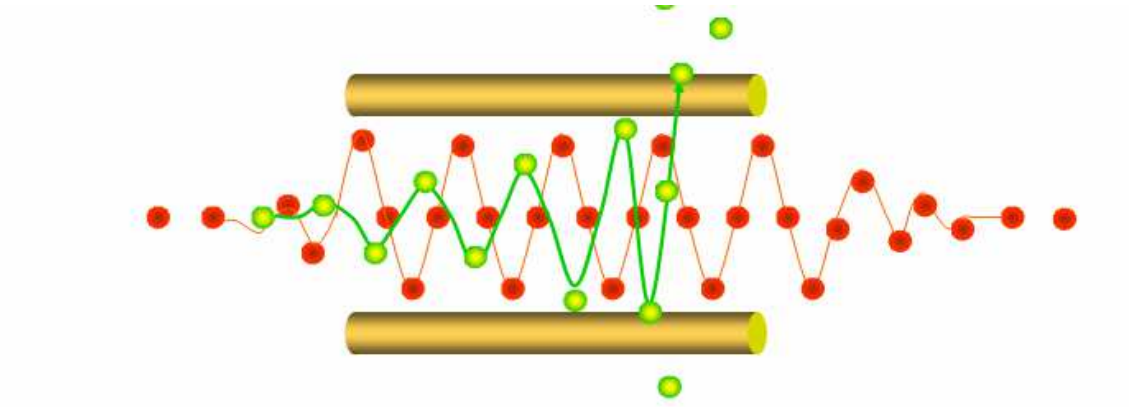


Figure 21 : Notions fondamentales sur le quadrupôle: à chaque potentiel radiofréquence/tension, seuls les ions d'un ratio masse/charge particulier ont une trajectoire stable, d'après ABSciex (116)

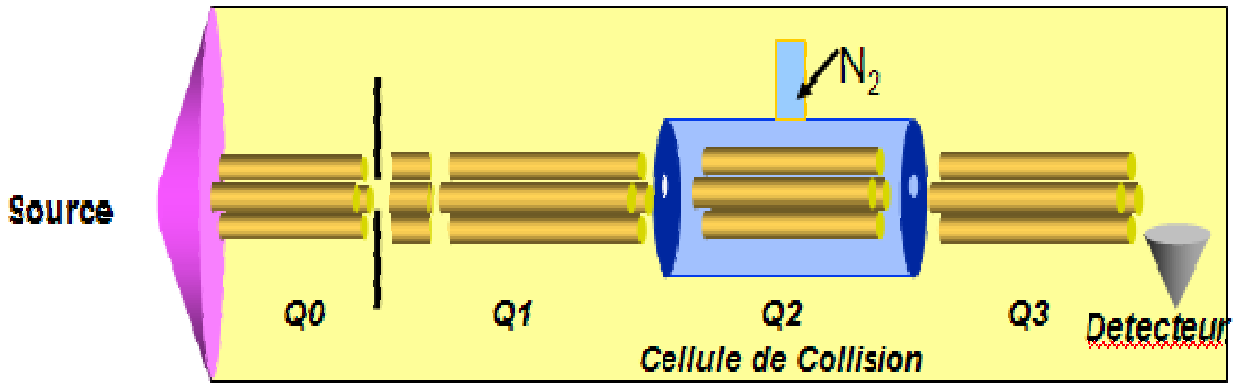


Figure 22: Triple quadrupôle MS, Q0 : guide d'ion, conduit les ions, Q1 isole l'ion parent, Q2 le fragmente, et Q3 analyse les ions fils apparus, d'après ABSciex (116)

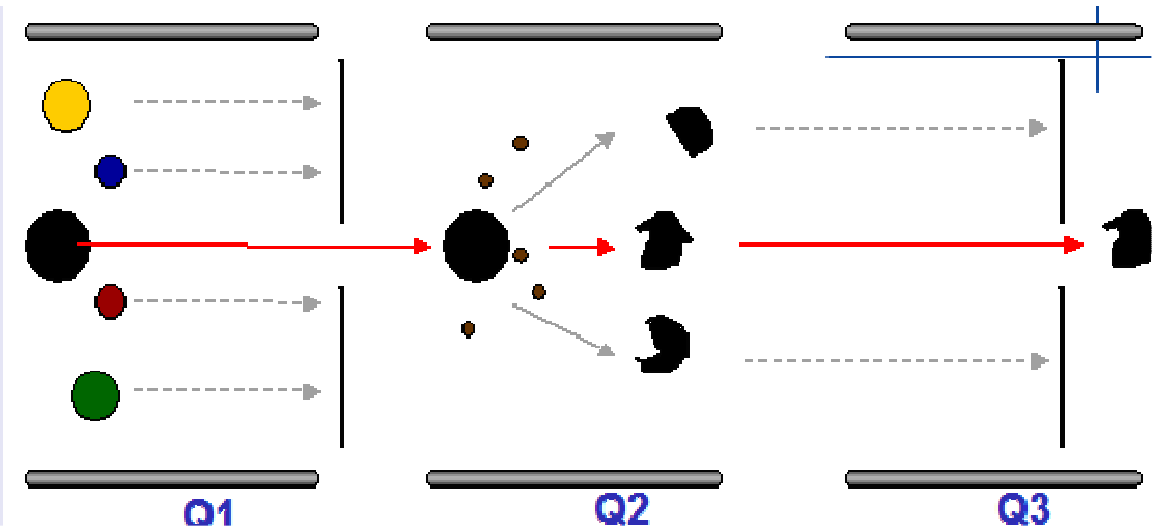


Figure 23: Schématisation du mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) .Q1 est réglé pour la sélection exclusive de l'ion parent, Q3 pour la détection du (des) ion(s) fils. Une « transition » correspond au couple ion précurseur/ions fragments, d'après ABSciex (116)

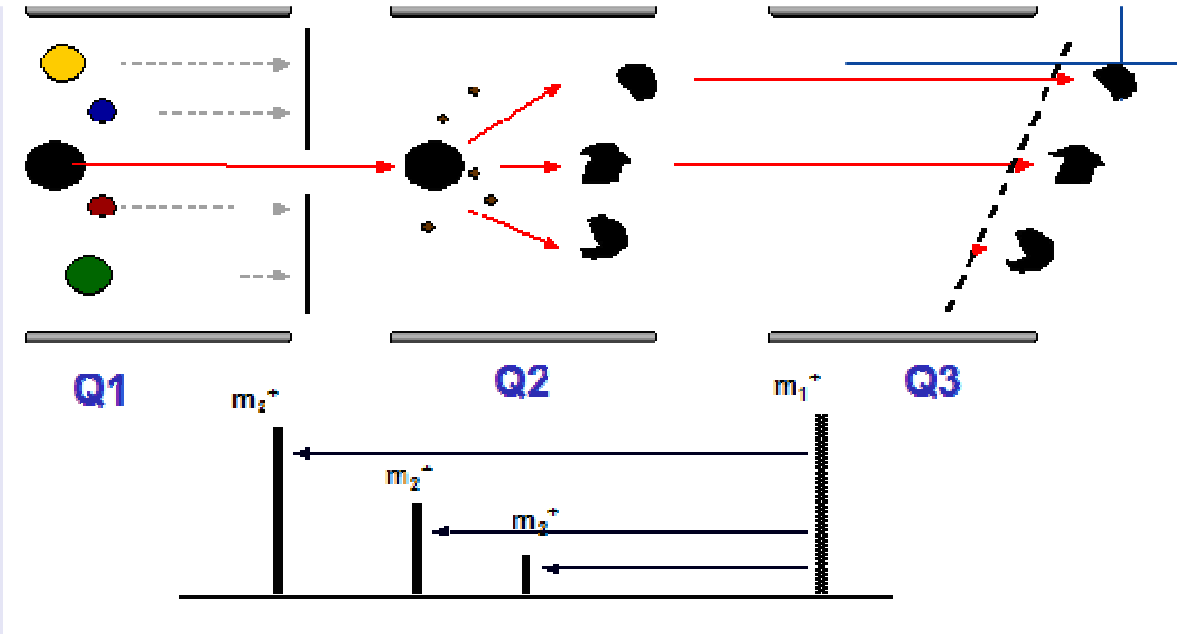


Figure 24 : Spectre de masse des ions fils : sélection de l'ion dans Q1, fragmentation dans Q2, identification des ions produits en Q3, d'après ABSciex (116)

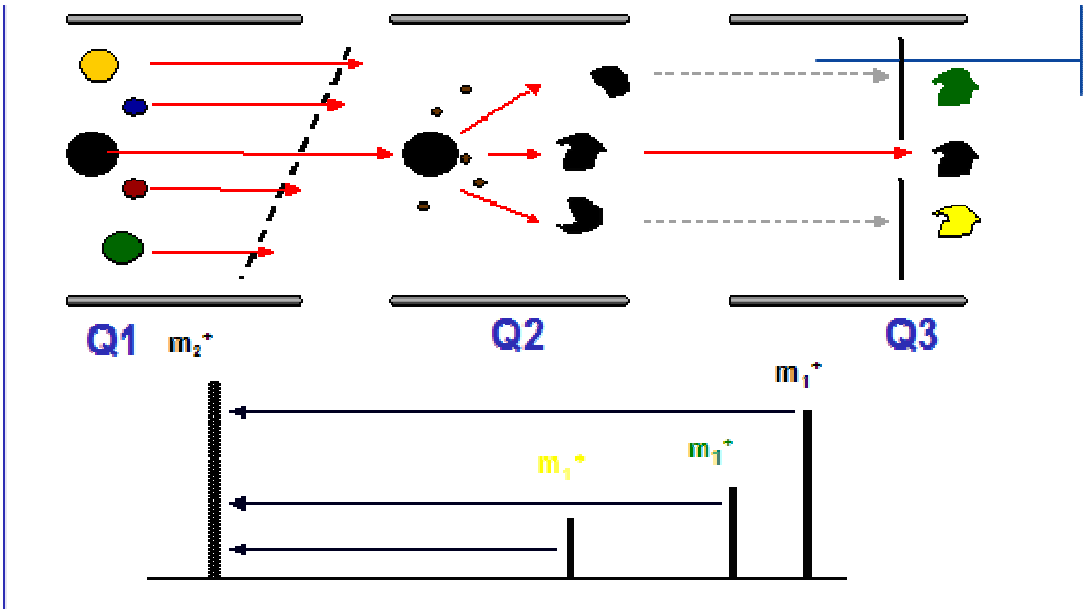


Figure 25: Spectre de masse des ions précurseurs. Un ion fragment est sélectionné en Q3 et tous les ions parents donnant cet ion fils sont balayés en Q1, d'après ABSciex (116)

6.4.2.2 Analyseur-piège à ions ou ion trap

Il est constitué de trois électrodes : une électrode annulaire et deux électrodes en « chapeau » ou «calotte » (**Figure 26**). Au centre de l'électrode en chapeau supérieure, une ouverture permet l'introduction des ions issus de la source. L'électrode chapeau inférieure possède une série de trous permettant l'éjection des ions vers le détecteur. Les ions qui entrent dans la trappe sont piégés sur une trajectoire oscillante, de fréquence spécifique pour chaque ion, sorte de huit en trois dimensions. Alors que dans les quadripôles les potentiels sont réglés de manière à sélectionner les ions d'un rapport m/z déterminé, dans le piège, les ions de différents rapports m/z sont présents simultanément. Le spectre est obtenu en les expulsant en fonction de leur rapport m/z en déstabilisant leur trajectoire via la tension appliquée. Un gaz neutre est systématiquement injecté pour focaliser les ions au centre de la trappe.

La trappe linéaire est une variante de la trappe d'ions. Ici, les ions sont piégés entre les barreaux d'un quadrupôle à radiofréquence (U non nulle) et expulsés en fonction de leur rapport m/z. Les ions peuvent être stockés en plus grand nombre car l'espace de confinement

est plus vaste. Ainsi, la limite de détection est plus basse que dans un piège à ion classique. Le principe de ce MS est d'accumuler des ions d'intérêt dans le piège. Ceux faiblement présents mais ainsi cumulés seront détectables. Ce type de MS est principalement dédié aux études structurelles mais aussi aux études quantitatives.

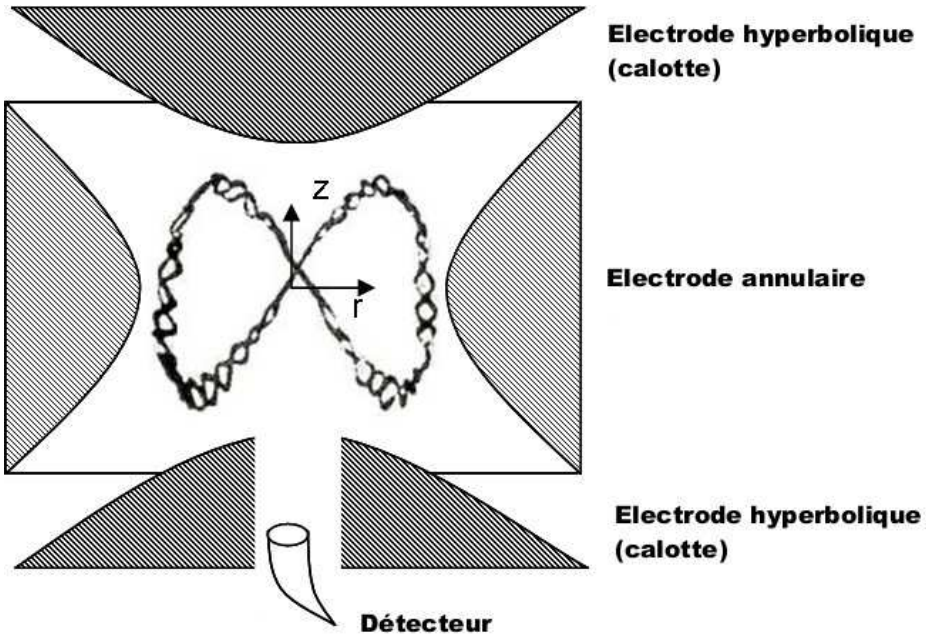


Figure 26 : Schéma d'une trappe à ions, avec la trajectoire en huit des ions, d'après (119)

6.4.2.3 Couplage quadrupôle / piège à ions

Le piège apporte une meilleure sensibilité et une vitesse d'analyse plus rapide. En outre, par rapport à un piège simple, cette combinaison autorise tous les modes d'acquisition MS/MS du triple quadripôle (perte de neutre et mode ascendant). Le spectromètre de masse Api 5500 Qtrap d'ABSciex est doté de cette technologie, c'est l'appareil que nous avons utilisé pour notre étude (**Figure 27**).

Figure 27: Spectromètre de masse Api 5500 Qtrap (ABSciex), utilisé au laboratoire de biochimie métabolique du CHU d'Angers

6.4.3 Couplage des méthodes séparatives avec la spectrométrie de masse (1) (120)

Afin d'éviter de perturber l'ionisation des solutés d'intérêt dans la source, il est souvent ajouté une étape de séparation des molécules avant leur introduction dans le spectromètre de masse. L'échantillon est alors plus pur et exempt de composés qui pourraient interférer dans la source lors de l'ionisation. Nous ne développerons que la chromatographie en phase liquide pour notre sujet.

6.4.3.1 Principe de la chromatographie

La chromatographie est une technique permettant de séparer les différents constituants d'un mélange.
Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide ou gaz), c'est la phase mobile.
Ces molécules interagissent ou non avec un support (matrice) fixe (un solide ou un liquide fixé). C'est la phase stationnaire. Elle est constituée par un gel de résine qui se présente souvent sous forme de billes, par exemple de silice pour la chromatographie en phase inverse. Les molécules se distribuent alors entre ces deux types de phases.

Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue sur le support fixe qui va les séparer.

Différents paramètres physico-chimiques sont utilisés pour séparer les molécules : charge électrique pour la chromatographie échangeuse d'ions, masse molaire pour la chromatographie d'exclusion ou en gel de filtration, établissement de liaisons spécifiques pour la chromatographie d'affinité, polarité, hydrophobicité pour la chromatographie de partage en phase inverse ou normale … Chaque technique de séparation est basée sur l'un de ces principes. Nous ne développerons que la chromatographie liquide en phase inverse dont voici les caractéristiques:

-phase stationnaire : liquide fixé sur un support inerte (papier, silice…)

-principe de séparation : partage

-principe de la fixation et de l'élution : distribution du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage

La **Figure 28** montre les différents domaines d'application de la chromatographie liquide.

6.4.3.2 Principe de la chromatographie liquide en phase inverse

La matrice est constituée de billes de silice sur lesquelles on trouve les groupes OH (silanols) et O (siloxanes), leur conférant un caractère polaire et acide permettant d'établir des liaisons hydrogènes. A ce stade, il s'agit d'une phase dite normale et il faudrait un éluant apolaire pour éluer les molécules. L'inconvénient est que la silice est très rapidement dégradée, entraînant un manque de reproductibilité.

Dans la phase inverse, des chaînes alkylées (par exemple en C18, octadécyl) sont greffées sur les groupes OH et confèrent à la silice un caractère très apolaire, hydrophobe. Avec une phase mobile très polaire, certaines molécules hydrophobes vont établir avec la phase stationnaire des interactions hydrophobes. Elles seront adsorbées (**Figure 29**).

En augmentant la concentration en solvant organique (apolaire, hydrophobe), son hydrophobicité devient plus importante que celle de la phase stationnaire. Les molécules hydrophobes sont alors désorbées et éluées. La phase mobile est donc constituée d'un mélange eau/solvant organique dans des proportions variables au cours de la chromatographie. Les solvants organiques utilisés sont souvent l'acétonitrile ou le méthanol. Les solvants possèdent différents pouvoirs d'élution (**Figure 30**). Ils ne doivent pas comporter d'impuretés. Ce type de chromatographie s'applique à un très grand nombre de molécules. Elle est extrêmement efficace et permet de séparer des mélanges complexes.

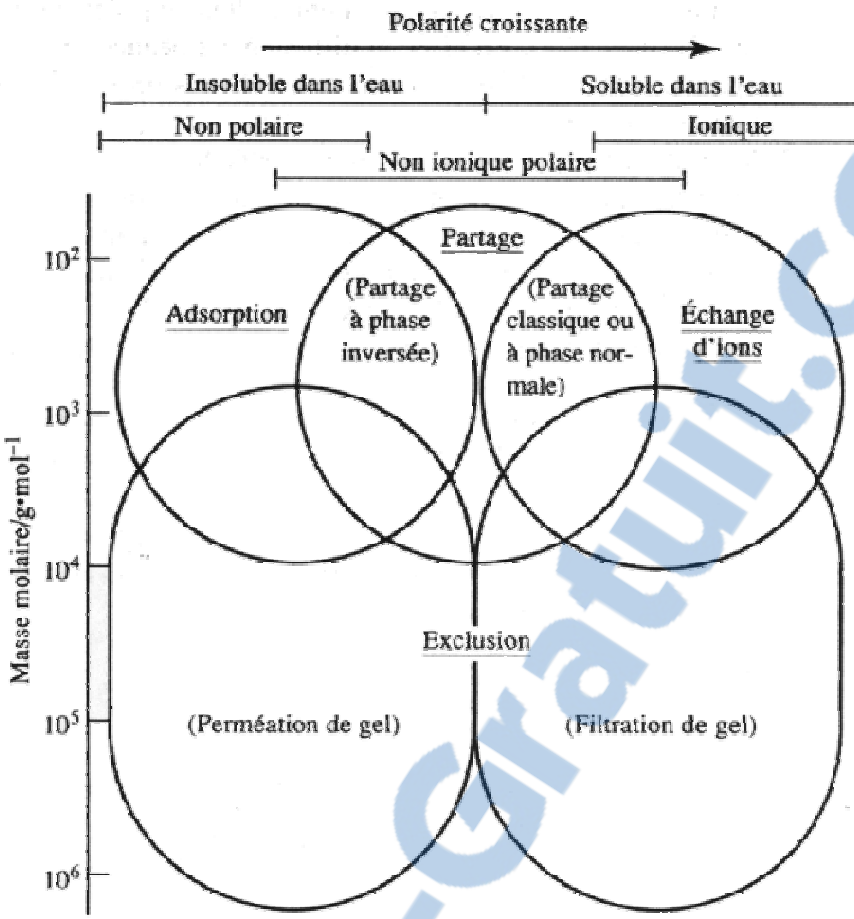


Figure 28: Domaines d'application de la chromatographie liquide, d'après (121)

Rapport-Gratuit.com

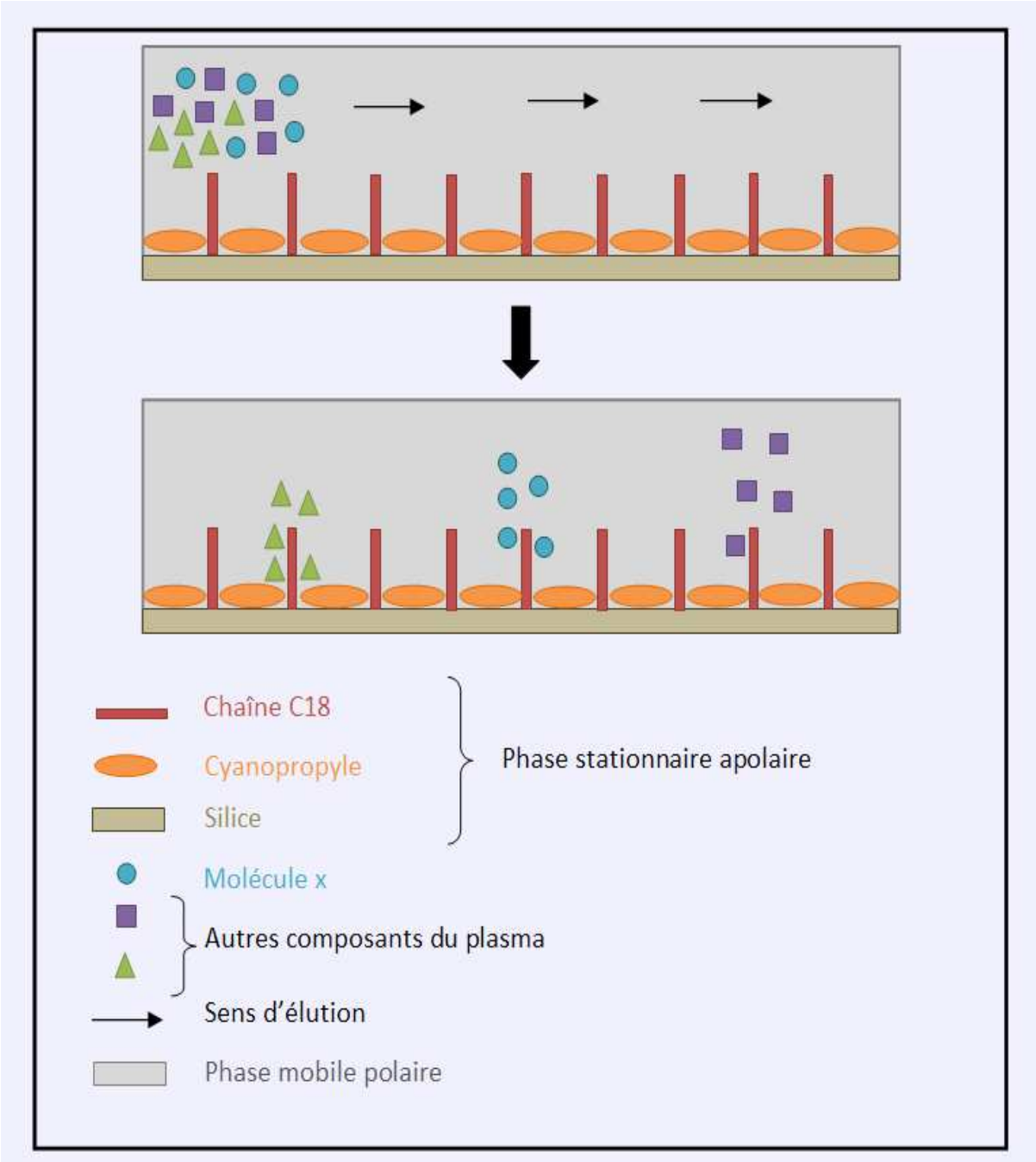


Figure 29 : Principe de la chromatographie liquide, d'après (122)

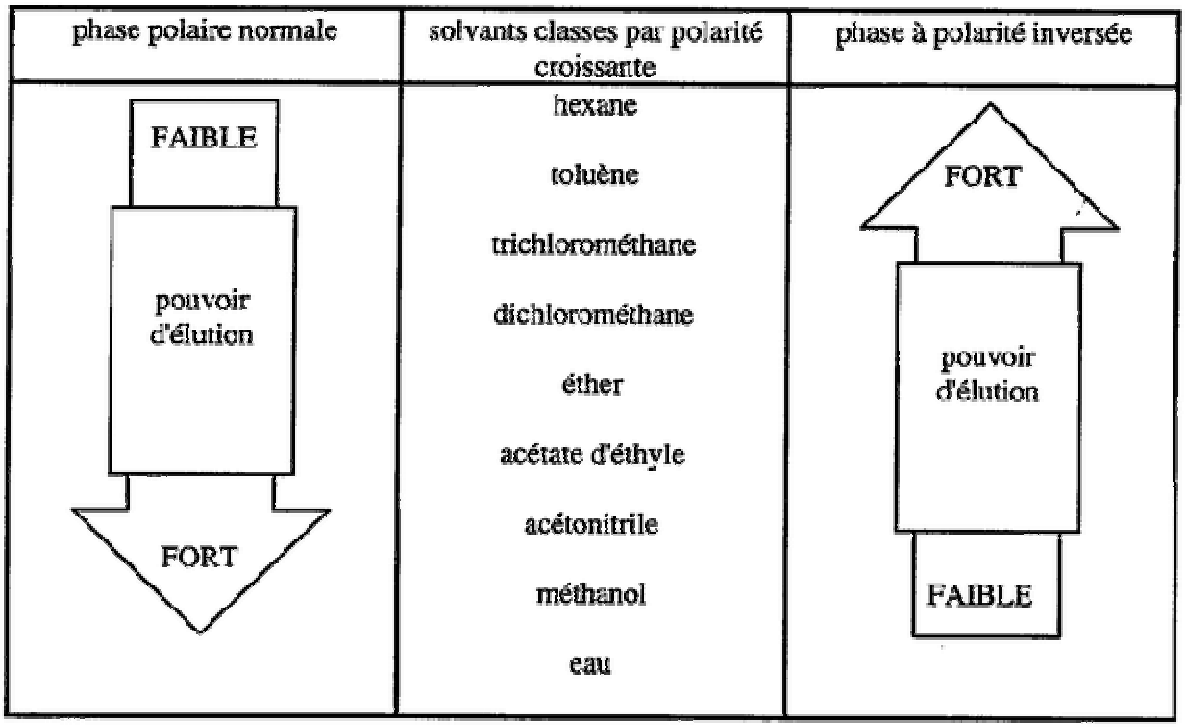


Figure 30: Pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC d'après (123)

6.4.3.3 La chromatographie Liquide à Haute Performance ou HPLC High Performance Liquide Chromatography

C'est une chromatographie liquide dont les performances sont augmentées grâce à une rapidité d'analyse et une résolution élevée.

Le débit d'écoulement élevé de la phase mobile diminue le temps nécessaire pour séparer les composants du mélange et la fine granulométrie de la phase stationnaire entraîne une meilleure séparation de ces molécules.

Eléments d'un appareil d'HPLC (123) :

1) un réservoir de solvant (éluants) contenant la phase mobile, avec plusieurs solvants de polarité différentes afin pour pouvoir réaliser des gradients d'élution grâce aux pompes doseuses
2) la pompe, programmable, ayant un débit variable, permet de travailler soit en mode isocratique (100% d'un même éluant tout au long de l'analyse) soit en mode gradient (variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants).
3) une vanne d'injection permettant d'avoir un volume d'injection constant, nécessaire pour la quantification

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

4) une colonne souvent en inox, de section constante, ayant un diamètre entre 4 et 20 mm et des longueurs généralement entre 15 et 30 cm
5) la phase stationnaire
6) la phase mobile
7) le détecteur : détecteur UV sensible, réfractomètre, spectromètre de masse…

6.4.4 Notion de quantification en spectrométrie de masse (1)

6.4.4.1 Le type de spectromètre de masse

Afin d'effectuer des études quantitatives fiables, il faut que le rapport signal/bruit soit le plus élevé possible. Il s'agit d'augmenter le signal et/ou de diminuer le facteur bruit. La technologie quadrupolaire en mode MRM permet une double sélection : en Q1 pour l'ion parent, en Q3 pour l'ion fils. Il est obtenu un signal hautement spécifique, le rapport "signal sur bruit" se trouve optimisé.
Les pièges à ions ont des performances moindres pour les limites de détection et de quantification car ils doivent d'abord se « remplir » d'ions de rapports m/z différents avant d'éjecter l'ion d'intérêt.

6.4.4.2 Les étalons internes

La qualité de l'étalonnage est primordiale lors des études quantitatives. L'étalon interne pallie le manque de reproductibilité de la méthode d'analyse d'un échantillon à l'autre (traitement de l'échantillon). Il permet d'identifier aussi les défauts d'ionisation dans la source. La détection de la molécule d'intérêt dépend de la qualité de son ionisation dans la source et le milieu dans lequel elle se trouve conditionne cette ionisation. Une suppression ionique peut être provoquée par une molécule interférente et fortement concentrée qui capte préférentiellement les protons disponibles à la place des molécules d'intérêt.
L'étalon interne de choix est la molécule à doser présentant un isotope lourd (par exemple un deutérium à la place de l'hydrogène). Ce composé présente généralement le même temps de

rétention en chromatographie que son homologue léger. Molécules lourdes et légères arrivent donc en même temps dans la source et toute interférence avec la molécule légère entraînera la même interférence avec son homologue lourd. La variation du taux d'ionisation sera identique.

6.4.4.3 Application à l'étude des acylcarnitines

Les acylcarnitines possèdent un groupement ammonium quaternaire leur permettant de former des ions positifs polaires et non volatils. Leur analyse directe a donc été envisagée grâce aux progrès des techniques de chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse. Cependant, les essais en LC/MS utilisant une source FAB n'ont montré qu'une faible sélectivité de la technique. Plusieurs méthodes ont alors été développées : méthodes radio-enzymatiques, HPLC et électrophorèse capillaire couplées à une détection UV ou à une détection fluorimétrique (124). Dans les années 1990, des techniques de MS/MS ont permis la détection et l'identification des acylcarnitines sans séparation préalable (125). Des techniques de FAB/MSMS puis d'ESI/MSMS ont permis de détecter les acylcarnitines dérivatisés (méthyl- ou butyl-esters) ou non dérivatisés (126).
Depuis les années 1990, l'analyse semi-quantitative des acylcarnitines (profil) en MS avec injecteur automatique en flux continu est réalisée par de nombreux pays dans le cadre des programmes de dépistages systématiques nationaux ou régionaux. La matrice utilisée est du sang total, séché, recueilli sur papier buvard. Ces programmes incluent le dépistage de 2 à 25 maladies héréditaires du métabolisme par l'analyse semi-quantitative des acylcarnitines et acides aminés. La plupart des pays européens utilisent cette technique pour dépister au minimum la phénylcétonurie et le déficit en MCAD. En France, la phénylcétonurie est dépistée par technique colorimétrique et enzymatique. La HAS a émis des recommandations en 2011 pour introduire la MS/MS dans le dépistage du déficit en MCAD (115)(13).

Actuellement, les spectromètres de masse en tandem utilisés dans les laboratoires de biochimie métabolique sont de type triple quadrupôle. La source d'ionisation est le plus souvent l'ESI. Pour établir le profil des acylcarnitines, le mode d'acquisition est le mode precursor ion scan. Le temps d'analyse pour acquérir un profil, sans séparation préalable, est de moins d'une minute et le nombre d'échantillons n'est pas limité. Au cours de l'acquisition,

Q1 balaye une gamme de masses comprises entre m/z 100 et m/z 600, ce qui permet l'analyse de la carnitine et de toutes les formes d'acylcarnitines. Grâce à leur groupement carnitine, tous les acylcarnitines butylés ou non butylés génèrent dans la cellule de collision un fragment commun m/z 85. Cet ion est produit après fragmentation et perte de différents groupes. Q3 focalise cet ion et pour chaque ion m/z 85 détecté, le système identifie l'ion parent en Q1. Le profil est construit en reliant l'intensité de chaque ion parent avec sa masse. Plus de trente acylcarnitines sont ainsi identifiés (**Figure 31**). Une analyse quantitative relative est possible grâce à l'utilisation d'étalons internes marqués d'acylcarnitines. Ces profils permettent d'orienter fortement les diagnostics mais ne permettent pas de séparer des isobares (même nombre de nucléons A mais nombre de protons Z ou numéro atomique différent) tels que la méthylmalonylcarnitine de la succinylcarnitine ou encore la valérylcarnitine de l'isovalérylcarnitine. L'analyse des acylcarnitines sans extraction spécifique ni séparation analytique à partir de matrices biologiques complexes expose à des risques d'effets matrice potentiellement délétères pour un dosage précis (115). De plus, la butylation, qui a pour avantage d'augmenter la sensibilité de la technique, hydrolyse partiellement les acylcarnitines, ce qui augmente artéfactuellement la carnitine (79). Afin de pallier à ces limites, des adaptations en LC-MS/MS se développent mais ne sont pas encore utilisées en routine (124).

C'est dans cette approche de quantification précise des acylcarnitines que nous avons travaillé au CHU d'Angers, notre objectif étant de raisonner non plus sur un profil avec une estimation peu précise des valeurs faibles mais de s'appuyer sur un étalonnage externe permettant une meilleure discrimination des valeurs de décision médicales.

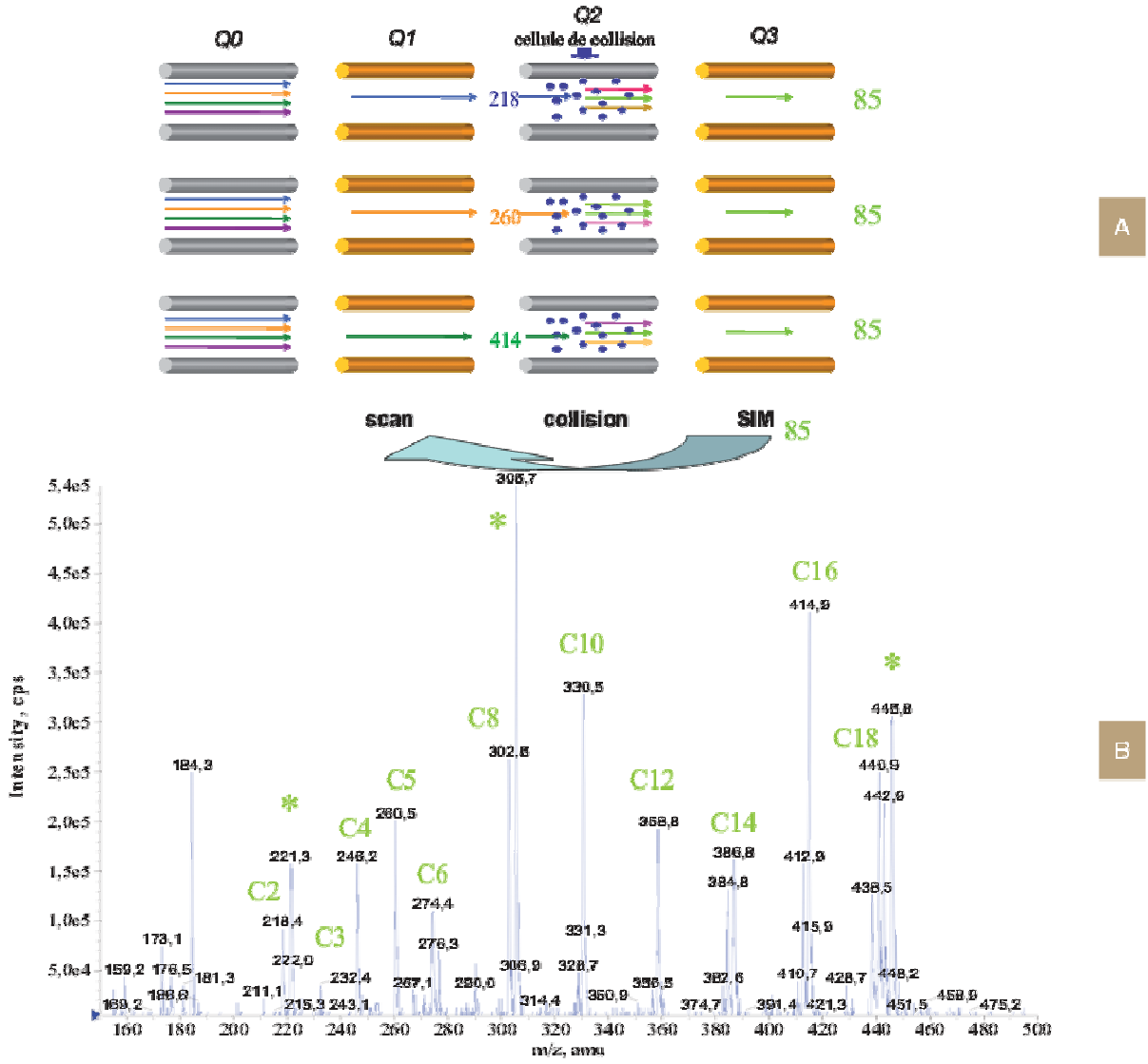


Figure 31: Profil des acylcarnitines par spectrométrie de masse en tandem, d'après (115)

A : illustration du mode precursor ion scan

B : exemple de profil des acylcarnitines (déficit d'oxydation pour les acides gras à chaînes moyennes)

6.4.4.4 Le dosage quantitatif vrai des acylcarnitines sans butylation

En pratique quotidienne, au CHU d'Angers, l'analyse des AC est effectuée sous forme d'un profil (analyse qualitative) avec quantification possible des acylcarnitines d'intérêts (ratio avec l'étalon interne), sur plasma hépariné ou buvard. Le mode utilisé est le mode Precursor Ion Scan. Les échantillons sont butylés et il n'y a pas d'étalonnage externe. Le **Tableau IX**

illustre les différentes techniques d'analyses actuellement utilisées dans les grands centres français.

Afin d'obtenir un dosage quantitatif des acylcarnitines satisfaisant, nous avons décidé d'utiliser une technique séparative d'HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem Q-trap (API 5500). Cette mise au point a été précédée d'essais sur un spectromètre de masse en tandem (triple quadrupôle) en FIA. Pour des raisons de disponibilité et de sensibilité d'appareil, nous avons choisi d'effectuer le couplage HPLC/MS-MS sur l'API 5500.

Tableau IX: Comparaison des techniques d'analyse des AC dans les centres de référence en France, d'après la SFEIM (Société Française des Erreurs Innées du Métabolisme) (82)

	Équipement	Nature échantillon	Mode d'analyse	Dérivation	Etalonnage externe	Standards internes
Lille	Acquity/Quatro I XE Waters	Sang total buvard (plasma hépariné)	Precursor Ion (MRM pour C0)	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	Kit Chromsystems
Lyon	Agilent/Api 3200 ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion + MRM	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	NSK-B Cambridge isotope
Nancy	Acquity/4000 Qtrap ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	Kit Chromsystems
Paris Necker	Api3000 ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion + MRM	non	oui	NSK-B Cambridge isotope
Paris RDB	Api3000 ABSciex	Sang total buvard & plasma hépariné	Precursor Ion	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	NSK-B Cambridge isotope

Partie 2 Données expérimentales

Chapitre 1 Objectifs de l'étude et mise au point de la méthode

1.1 Objectifs et justification de l'étude

Le profil des acylcarnitines est largement réalisé à travers le monde sur sang total (buvards) notamment dans le cadre de programmes de dépistages néonataux. L'analyse sur matrice plasmatique se développe mais nous ne disposons que de peu de recul concernant cette approche (valeurs de références, valeurs pathologiques, méthodes de dosage..). Le laboratoire de biochimie métabolique propose depuis 2006 une analyse plasmatique des acylcarnitines sous forme d'un profil, associée à un dosage de la concentration de chaque acylcarnitne en se basant sur l'abondance de l'étalon interne correspondant. Cette technique nécessite une dérivatisation préalable des acylcarnitines.

Ne disposant pas de technique de référence pour ce dosage, notre objectif initial a été de transposer une méthode utilisée en pratique courante à Paris Necker, seul centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme qui propose une étude quantitative des acylcarnitines, sans dérivatisation préalable, avec étalonnage externe. Il s'agit d'une méthode de FIA-MS/MS avec acquisition en mode MRM (quantification) et en mode precursor ion scan (profil complet des acylcarnitines).

Cependant, nous n'avons pas obtenu les résultats préalables attendus : mauvaise séparation des analytes, phénomène de suppression d'ionisation d'où un rapport signal/bruit faible et des intégrations de pics aléatoires et imprécises. Après avoir effectué des recherches bibliographiques (79)(8)(124)(80)(126), nous avons décidé de coupler une méthode séparative à une analyse spectrométrique sur une nouvelle génération de spectromètres de masse, l'API 5500. C'est cette méthode que nous avons évaluée et validée.

Nos objectifs secondaires sont la réalisation d'une étude sur la stabilité des acylcarnitines à température ambiante et la réalisation de valeurs de référence biologiques internes au laboratoire pour différentes tranches d'âge (approximation).

1.2 Mise au point de la méthode: considérations générales

La principale difficulté de mise au point de cette méthode réside dans le fait que les acylcarnitines sont des molécules ayant des degrés d'hydrophilie très variables. Afin de pouvoir les analyser toutes et de manière interprétable sur une même chromatographie, il faut choisir la colonne la plus adéquate et effectuer de nombreux essais afin de définir les meilleurs paramètres. Les résultats de cette mise au point seront précisés dans le chapitre suivant.

Nous nous sommes appuyés sur le travail du laboratoire du centre de référence des MHM (Paris Necker) ainsi que sur des données de la littérature (8)(79)(124). Il nous est apparu indispensble d'utiliser une séparation préalable des éléments par HPLC même si cela augmente le temps de l'analyse car, sans colonne, le bruit de fond était trop important et les pics n'étaient pas assez fins et symétriques pour une exploitation convenable (cf 1.1 Objectifs et justification de l'étude). Trois colonnes ont été testées : une colonne en phase normale HILIC, un colonne en phase inverse C18 en version courte et longue. . Les figures ci-dessous montrent les profils obtenus avec la colonne HILIC (**Figure 32**), la colonne C18 courte (**Figure 33**) et la colonne C18 longue (**Figures 34a et 34b**). Seule cette dernière nous a donné des résultats satisfaisants. Ensuite, nous avons affiné la paramétrage afin d'obtenir les résultats les plus exploitables: présence de tous les acylcarnitines sur la chromatographie, pics gaussiens, temps de la chromatographie compatible avec l'activité (environ 15 minutes).

ekspert 100 Pump

Aqueous (pumpA):	Eau Ac Form 0.1 % (Pump A2)
Organic (pumpB):	ACN Ac Form 0.1 % (Pump B2)
Pump Maximum pressure:	1240 Bar
Pump Minimum pressure:	0 Bar
Equilibration Time:	00:02

Pump time table

Pump time	Pump flow (ml/min)	Pump Fraction A %	Pump Fraction B %
00:00:01	0.40	100	0
00:01:00	0.40	100	0
00:08:00	0.40	20	80
00:08:01	0.40	100	0
00:15:00	0.40	100	0

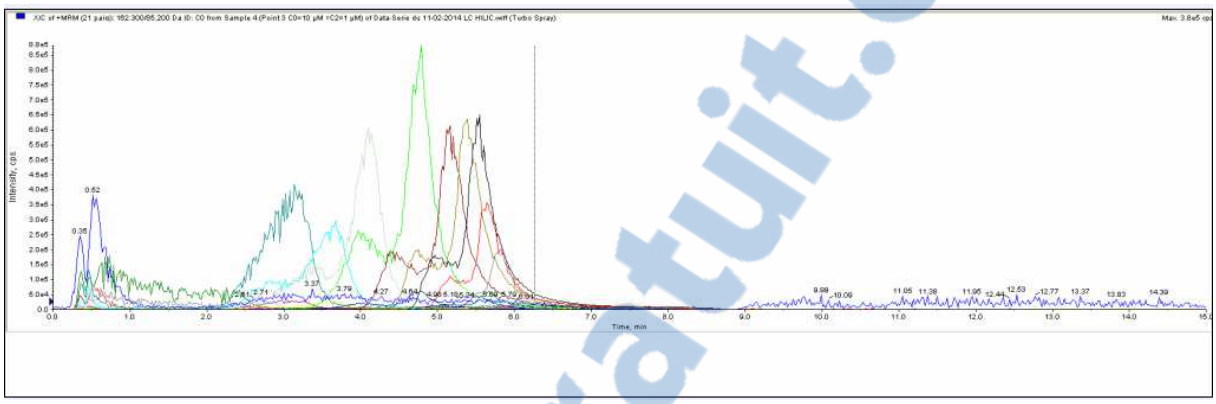


Figure 32: Essai de chromatographie avec une colonne HILIC: pics non gaussiens.

ekspert 100 Pump

Aqueous (pumpA):	Eau Ac Form 0.1 % (Pump A2)
Organic (pumpB):	ACN Ac Form 0.1 % (Pump B2)
Pump Maximum pressure:	1240 Bar
Pump Minimum pressure:	0 Bar
Equilibration Time:	00:02

Pump time table

Pump time	Pump flow (ml/min)	Pump Fraction A %	Pump Fraction B %
00:00:01	0.40	100	0
00:02:00	0.40	100	0
00:12:00	0.40	20	80
00:12:01	0.40	100	0
00:15:00	0.40	100	0

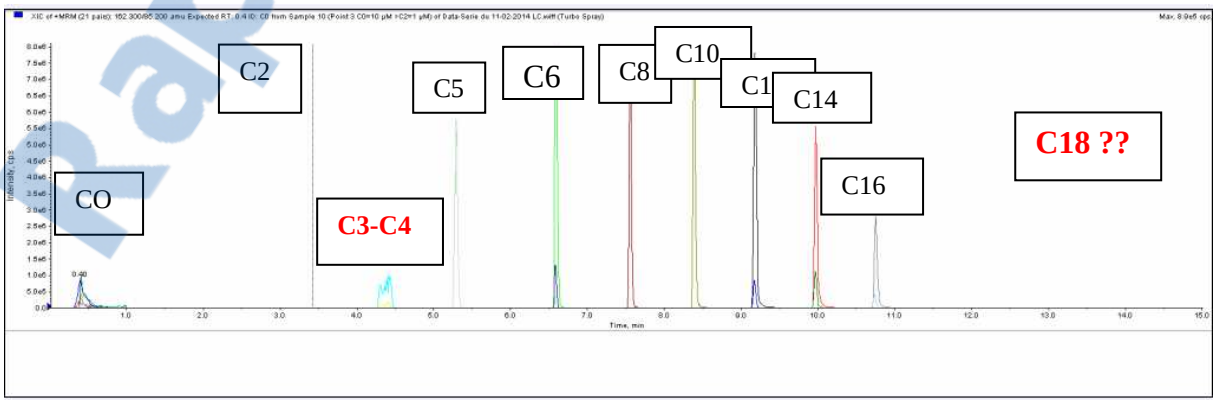


Figure 33: Essai de chromatographie avec une colonne en phase inverse, courte, C18: le C3 et le C4 ne sont pas gaussiens, le C18 n'est pas "retenu" par la colonne.

Rapport-Gratuit.com

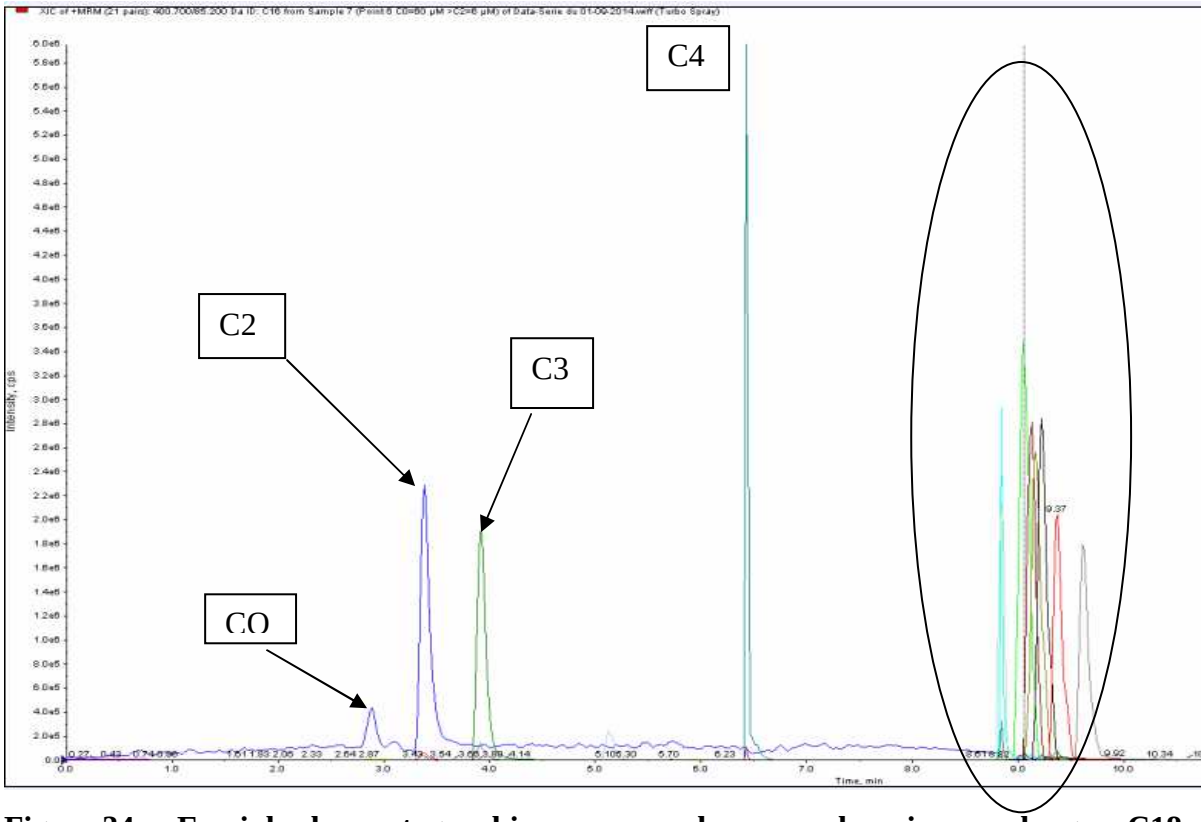
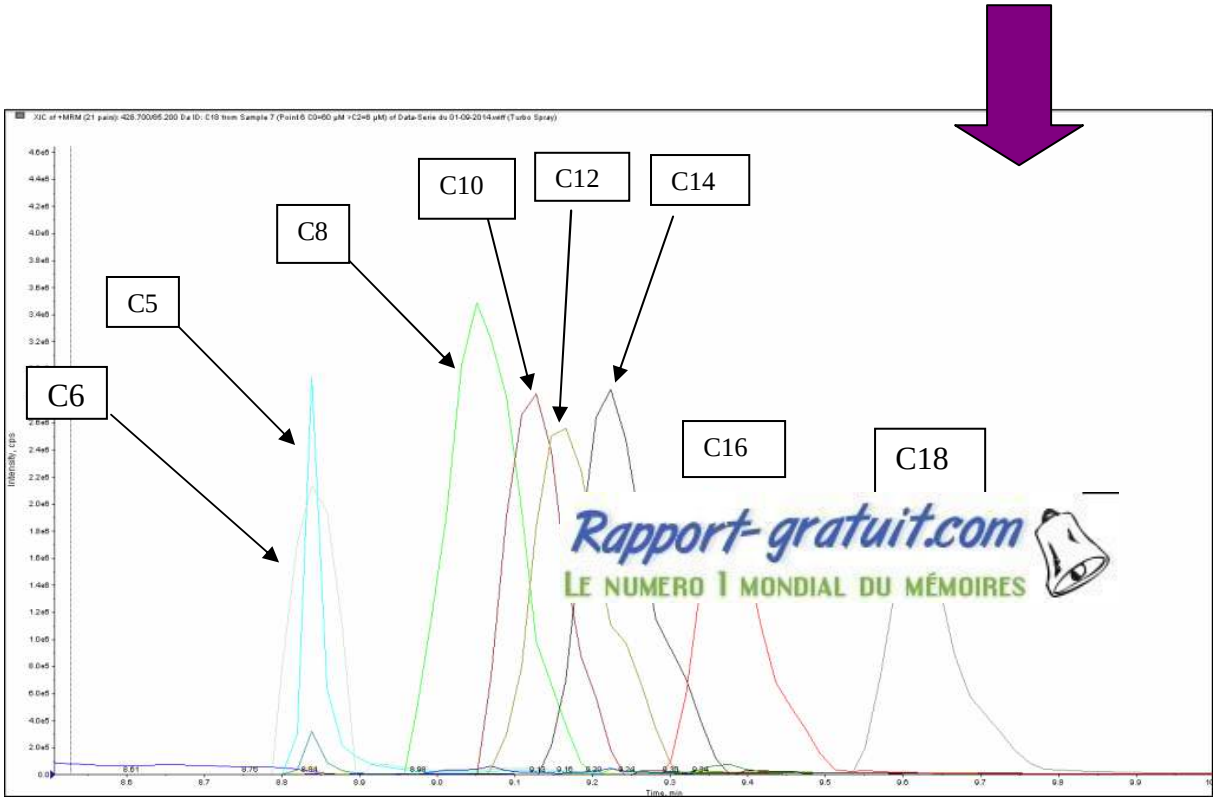


Figure 34a : Essai de chromatographie avec une colonne en phase inverse, longue, C18



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure 35b: Essai de chromatographie avec une colonne en phase inverse, longue, C18: zoom sur les AC de C5 à C18.

La gamme d'étalonnage est effectuée en milieu aqueux. Nous avons gardé le mode opératoire de Paris. Cependant, en raison d'une importante saturation du signal, nous avons testé différentes dilutions et nous avons finalement opté pour une dilution générale de tous les analytes au 1/10ème après extraction.

Les droites de régressions obtenues sont linéaires avec un coefficient r² proche de 1 (**Figures 36 et 37**). La **Figure 38** montre l'intégration des pics, réalisée de manière automatique.

	Sample Name	Sample ID	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration	IS Peak Area (counts)	Use Record	Calculated Concentration	Accuracy (%)
1	Point 1 C0=0 µM >C2=0 µM	1/10	Standard	0.00e+000	0.00	9.41e+004	☑	No Peak	N/A
2	Point 2 C0=5 µM >C2=0.5 µM	1/10	Standard	4.64e+005	5.00	1.22e+005	☑	5.14	103.
3	Point 3 C0=10 µM >C2=1 µM	1/10	Standard	7.96e+005	10.0	1.03e+005	☑	11.0	110.
4	Point 4 C0=20 µM >C2=2 µM	1/10	Standard	1.49e+006	20.0	1.10e+005	☑	19.4	97.1
5	Point 5 C0=40 µM >C2=4 µM	1/10	Standard	3.67e+006	40.0	1.33e+005	☑	40.1	100.
6	Point 6 C0=60 µM >C2=6 µM	1/10	Standard	6.14e+006	60.0	1.50e+005	☑	59.9	99.9
7	Point 7 C0=80 µM >C2=8 µM	1/10	Standard	7.65e+006	80.0	1.41e+005	☑	79.6	99.5
8	Point 8 C0=100 µM >C2=10 µM	1/10	Standard	6.42e+006	100.	9.38e+004	☑	100.	100.

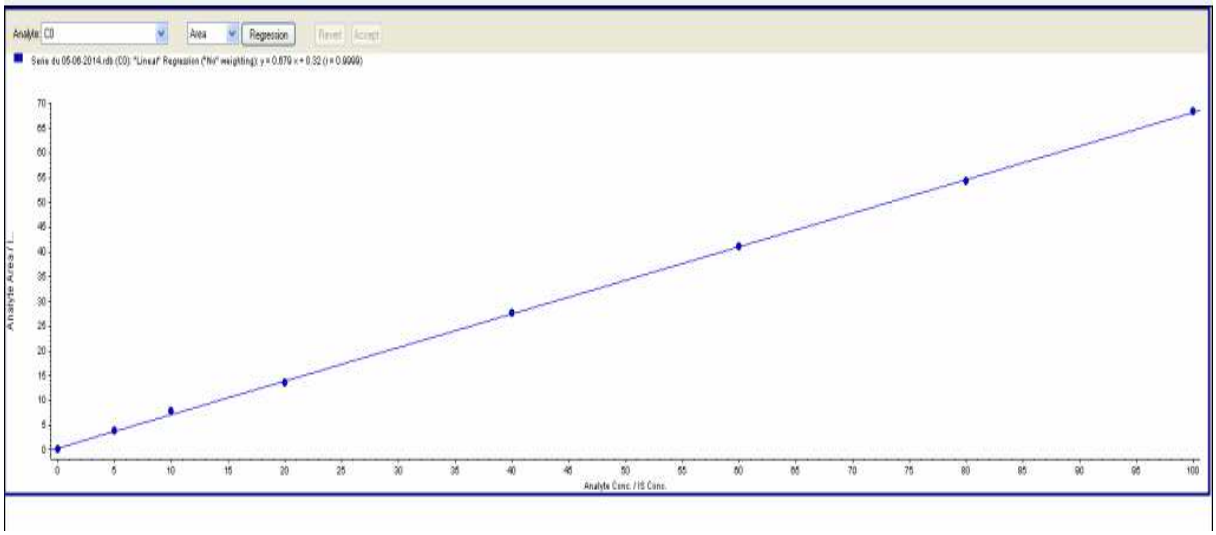


Figure 36: Gamme d'étalonnage: valeurs et courbe pour le C0.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Formula:

Analyte Layout: C12
Query: None
Idle
Sort : Unsorted

	Sample Name	Sample ID	Sample Type	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration	IS Peak Area (counts)	Use Record	Calculated Concentration	Accuracy (%)
1	Point 1 C0=0 µM >C2=0 µM		Standard	2.66e+004	0.00	2.14e+005	☑	0.0518	N/A
2	Point 2 C0=5 µM >C2=0.5 µM		Standard	1.40e+006	0.500	2.44e+005	☑	0.509	102.
3	Point 3 C0=10 µM >C2=1 µM		Standard	2.69e+006	1.00	2.31e+005	☑	0.995	99.5
4	Point 4 C0=20 µM >C2=2 µM		Standard	5.07e+006	2.00	2.37e+005	☑	1.79	89.5
5	Point 5 C0=40 µM >C2=4 µM		Standard	1.09e+007	4.00	2.27e+005	☑	3.98	99.4
6	Point 6 C0=60 µM >C2=6 µM		Standard	1.74e+007	6.00	2.26e+005	☑	6.31	105.
7	Point 7 C0=80 µM >C2=8 µM		Standard	2.17e+007	8.00	2.23e+005	☑	8.01	100.
8	Point 8 C0=100 µM >C2=10 µM		Standard	2.65e+007	10.0	2.21e+005	☑	9.85	98.5

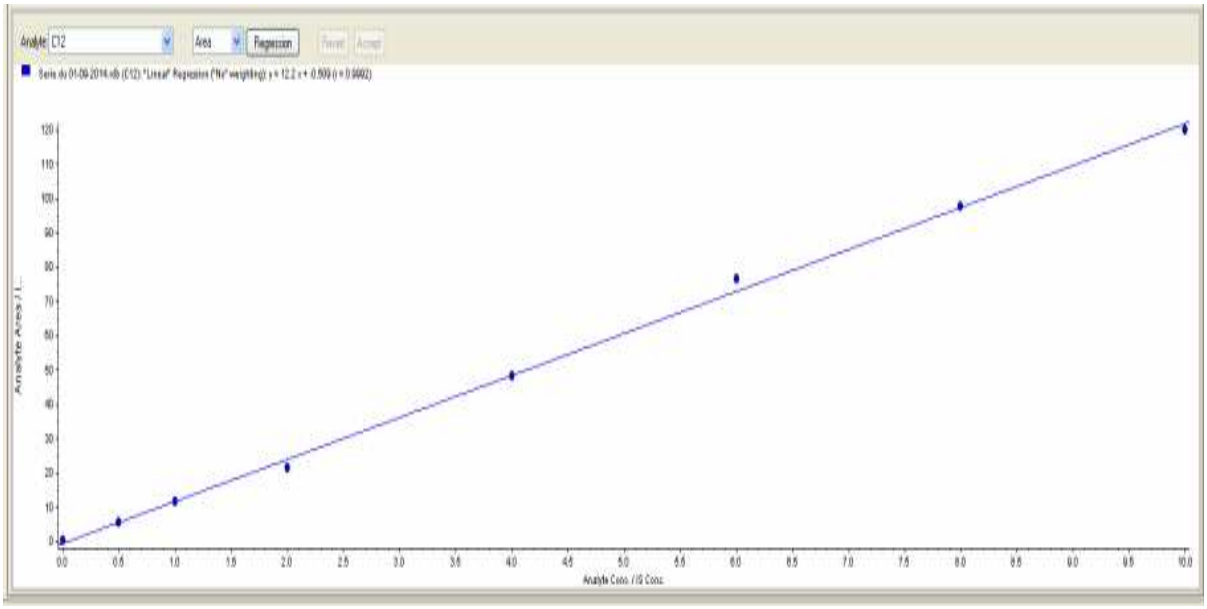


Figure 37: Gamme d'étalonnage: valeurs et courbe pour le C12.

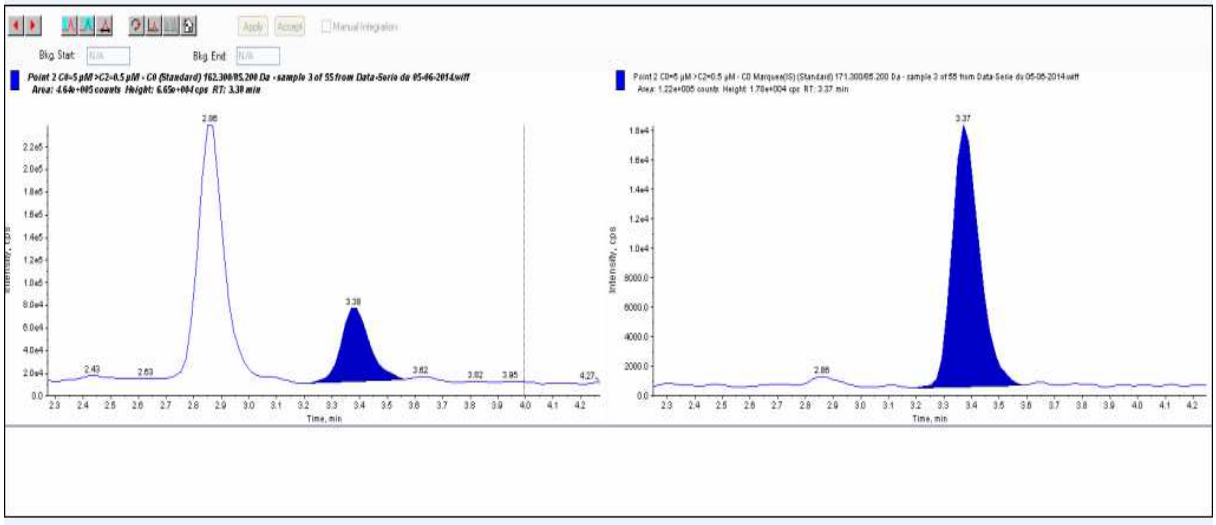


Figure 38: Exemple d'intégration automatique d'un pic et de son étalon interne deutéré.

Chapitre 2 Matériel et méthode

2.1 Principe

Les acylcarnitines plasmatiques à doser subissent une double extraction par retour (éthanol et hexane) en présence d'une solution contenant des acylcarnitines de différentes longueurs de chaînes, deutérés et servant d'étalons ou standards internes. Après centrifugation, le surnageant est évaporé à sec, repris dans de la phase mobile et injecté dans le spectromètre de masse via une colonne d'HPLC. Une gamme d'étalonnage comprenant huit points est préparée parallèlement sur matrice aqueuse et injectée. Après traitement des données, on obtient un dosage quantitatif pour chaque acylcarnitine pris en compte dans la méthode d'acquisition spectrométrique.

Nous avons choisi de n'étudier que les acylcarnitines quantifiables sur un mode MRM : nous n'obtenons donc pas de spectre de la totalité des acylcarnitines mais un dosage quantitatif des acylcarnitines saturés, ayant chacun un étalons interne deutéré correspondant et une transition MRM propre. Ces acylcarnitines saturés sont : C0 C2 C3 C4 C6 C8 C10 C12 C14 et C18. Ce panel représente 90% des acylcarnitines totaux mais reste incomplet pour la recherche exhaustive d'anomalies de la ßOAG. Il devra être complété par un profil classique en mode precursor avec semi-quantification.

2.2 Etapes préanalytiques

L'étude des acylcarnitines peut se réaliser sur différents milieux (plasma, sang total, urine, liquide amniotique, tissus…). L'étude urinaire est incomplète car les acylcarnitines de plus de 12 carbones ne sont pas éliminés dans les urines (127). Le plasma est le milieux de choix car il n'y a pas d'inferférence avec les hématies, contrairement au sang total sur papier buvard.

Le dosage des acylcarnitines est réalisé chez un patient à jeun, ou pendant la crise afin d'être le plus informatif possible.

L’échantillon sanguin est prélevé sur héparinate de lithium, acheminé et centrifugé rapidement au laboratoire puis congelé à -20°C.
En l’absence de contrôles qualité internes disponibles sur le marché, un plasma non pathologique a été utilisé pour une partie de la validation de méthode. L’autre partie concernant la carnitine libre C0 a été réalisée avec des contrôles de qualité externes.
Des plasmas témoins ont été recueillis pendant environ 3 mois afin de déterminer une approximation des valeurs de référence biologique interne au CHU d’Angers.

2.3 Matériel

2.3.1 Réactifs

Méthanol for liquid chromatography, LiChrosov, Merck
Ethanol absolute, Anavlar Normopur, VWR
Eau purifiée milliQ
n-Hexane, Suprasolv, Merck
Acétonitrile (ACN), HiperSolv Chromanorm, VWR
Acide formique Emsure 98-100%, Merck

2.3.2 Etalons internes deutérés

Labeled carnitine set B (NSK-B), Cambridge Isotope Laboratories, Inc (Andover Massachusetts USA)
Composition:

L-carnitine (N-triméthyl-D9), C0, M=171g/mol (masse molaire)
L-acétylcarnitine (N-méthyl-D3), C2, M=207g/mol
L-propionylcarnitine (N-méthyl-D3), C3, M=221g/mol
L-butyrylcarnitine (N-méthyl-D3), C4, M=235g/mol
L-isovalérylcarnitine (N-triméthyl-D9), C5, M=255g/mol
L-octanoylcarnitine (N-méthyl-D3), C8, M=291g/mol
L-myristoylcarnitine (N-triméthyl-D9), C14, M=381g/mol
L-palmitoylcarnitine (N-méthyl-D3), C16, M=403g/mol

Les échantillons doivent être conservés entre -5°C et 5°C, à l'abri de la lumière, avant utilisation. Ils doivent être repris dans du méthanol et conservés à -20°C.

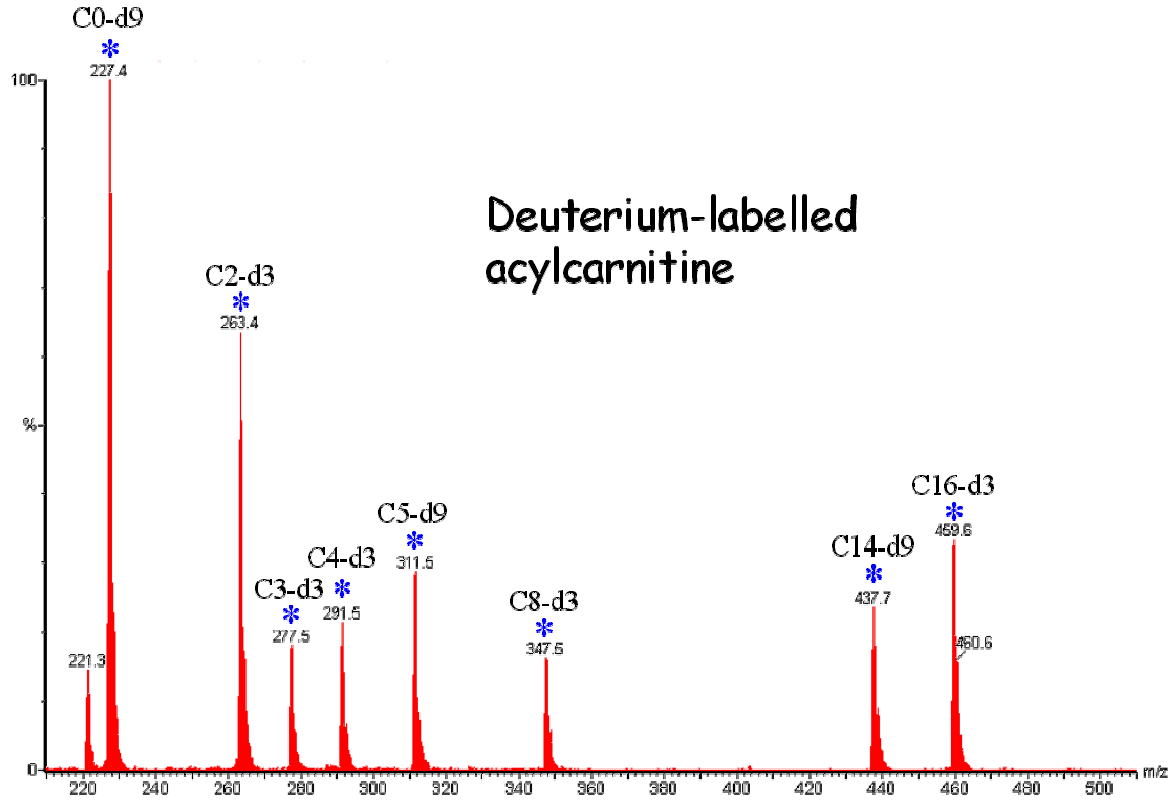


Figure 39: Représentation des étalons internes deutérés sur un profil, d'après (128)

2.3.3 Standards non deutérés pour la préparation de la gamme

Vu Medish Centrum (anciennement Herman Brink)
Poudres unitaires par pots de 50mg, conservés à -20°C avant préparation

2.3.4 Contrôles de qualité

Les contrôles de qualité ne sont disponibles que pour la carnitine libre, dans le cadre d'un programme de contrôle de qualité externe (CQE). Ce sont des contrôles de qualité de différents niveaux fournis par l'ERNDIM : External Quality Assurance Scheme for Specials Assays in Serum (129) appelés SAS (Special Assays Serum). Alors que sur buvard des

contrôles sont disponibles, il n'y en a pas pour les acylcarnitines plasmatiques. Nous utilisons ces contrôles « carnitine » en tant que contrôles de qualité interne après avoir effectué le programme de CQE. C'est la seule façon d'obtenir des contrôles. Nous ne disposons donc pas de valeurs absolues mais de moyennes des laboratoires ayant participé au programme de CQE. Il s'agit de la moyenne « all labs », en général n=100 participants à travers le monde (36 pays).
Ils sont reçus sous forme lyophylisée, sont reconstitués avec du sérum physiologique, aliquotés et congelés à -20°C.

2.3.5 Matériel et consommable

Cryotubes pour aliquotage
Tubes Eppendorf Safe Lock (couleur bleutée)
Tube à hémolyse, en verre
Pipettes de 10-100µl, 200µl et 1000µl
Cônes de 100µl, 200µl et 1000µl
Multi Tube Vortex, VWR
Vortex Genie 2, Scientific Industries
Centrifugeuse à tubes GR 422, Jouan
Trompe à vide Integra Vacusafe
Centrifugeuse pour tubes Eppendorf, Eppendorf Centrifuge 5415 D ou R
Evaporateur à sec sous azote
Flacons 2 ml sans insert (Interchrom, Montluçon France)
Flacons 300µl à vis ambré avec insert (Chromacol LTD, Welwyn Garden City UK)

2.3.6 LC/MSMS

2.3.6.1 Spectromètre de masse : API 5500 Qtrap

Société AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA

2.3.6.2 HPLC

injecteur et pompe HPLC : ekspert ultraLC 100, eksigent, part of AB Sciex
colonne Varian, Polaris Amide_C18 5µ, 250 x 4.6mm

2.4 Méthode

2.4.1 Préparation des étalons internes

Les étalons internes sont reçus sous forme d'un mélange d'extraits secs (des huit étalons internes), contenus dans des vials. Ils sont repris dans 1ml de méthanol (« set B standards concentrations »). Ils sont ensuite dilués au ½ (« concentration working stock »). Puis, ils sont dilués au 1/100ème dans du méthanol pour obtenir les concentrations cible désirées (« daily working standards concentrations ») (tableau). Ils sont ensuite aliquotés par 1ml et conservés à -80°C.

Tableau X: Concentrations cibles de travail des étalons internes marqués, en micromolaire (µM)

	concentration après reprise par 1ml (µM) « set B standards concentrations »	concentration après dilution au ½ et au 1/100ème « daily working standards concentrations »
L-carnitine (N-triméthyl-D9), C0	152	0.76
L-acétylcarnitine (N-méthyl-D3), C2	38	0.19
L-propionylcarnitine (N-méthyl-D3), C3	7.6	0.04
L-butyrylcarnitine (N-méthyl-D3), C4	7.6	0.04
L-isovalérylcarnitine (N-triméthyl-D9), C5	7.6	0.04
L-octanoylcarnitine (N-méthyl-D3), C8	7.6	0.04
L-myristoylcarnitine (N-triméthyl-D9), C14	7.6	0.04
L-palmitoylcarnitine (N-méthyl-D3), C16	15.2	0.08

2.4.2 Préparation des standards de carnitine et acylcarnitines non deutérés pour la gamme d'étalonnage externe

2.4.2.1 Préparation des solutions mères à 10 mmol/l

Chaque standard (carnitine et 11 acylcarnitines) est pesé pour obtenir une concentration de 10 mmol/l chacun. Ils sont ensuite aliquotés séparément en cryotubes et stockés à -80°C.

Tableau XI: préparation des solutions mère de standards non deutérés

		peser / méthanol	Masse Atomique (Da)
C0	L-carnitine	19.8 mg / 10ml	162.3
C2	Acétyl-DL-carnitine	11.98 mg / 5ml	204.4
C3	Pronionyl-carnitine	12.68 mg / 5ml	218.7
C4	butyryl-carnitine	13.37 mg / 5ml	232.4
C5	isovaleryl-carnitine	15.15 mg / 5ml	246.6
C6	DL-hexanoyl-carnitine	14.79 mg / 5ml	260.5
C8	octanoyl-carnitine	16.20 mg / 5ml	288.4
C10	decanoyl-carnitine	17.60 mg / 5ml	316.6
C12	dodecanoyl-carnitine	19.00 mg / 5ml	344.6
C14	myristoyl-carnitine	20.40 mg / 5ml	372.6
C16	palmitoyl-carnitine	21.80 mg / 5ml	400.7
C18	stearoyl-carnitine	23.20 mg / 5ml	428.7

2.4.2.2 Préparation de la solution fille

La solution fille contient toutes les carnitines acylées et la carnitine libre.
La concentration finale de cette solution fille est : C0= 1000µM et C2à C18= 100µM chacun.
Ces concentrations sont obtenues de la façon suivante : dans une fiole de 5 ml, prélever 500µl de la solution mère de C0 et 50 µl de chacune des solutions mère de C2 à C18. Ajouter 5000 µl de méthanol.
La solution fille est aliquotée par 800 µl dans des cryotubes et stockée à -80°C.

2.4.3 Préparation de la gamme d'étalonnage externe

La gamme doit être préparée pour chaque série.

- la solution fille de standards est diluée au 1/10ème en méthanol : 400µl de solution fille + 3600µl de méthanol

- en tubes à hémolyse, sont réalisées les dilutions suivantes :

Tableau XII : préparation de la gamme

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration finale C0 (µM)	0	5	10	20	40	60	80	100
Concentration finale C2 à C18 (µM)	0	0.5	1	2	4	6	8	10
Solution fille de standards au 1/10ème (µM)	0	50	100	200	400	600	800	1000
Méthanol (µl)	1000	950	900	800	600	400	200	0

- dans chacun des tubes avec insert (ou « microvial ») numérotés de 1 à 8, sont mélangés :

20µl d'étalons internes marqués

+ 20µl de chaque tube à hémolyse correspondant de 1à 8

+ 160µl d'un mélange: acétonitrile 50% / eau milliQ 50% / acide formique 0.1%

- chaque microvial est dilué au 1/10ème, soit 20µl dans 180µl du même mélange. La gamme est prête à être injectée en LC-MS/MS.

2.4.4 Préparation des échantillons et des contrôles

- vortexer puis centrifuger les prélèvements 4 min à 3500 tours/minutes

- dans un tube Eppendorf safe lock :

50µl d'eau milliQ du jour

+ 20µl de plasma ou de contrôle

Rapport-Gratuit.com

+ 20µl d'étalons internes marqués

- agiter 2 minutes au multivortex
- ajouter 400µl d'éthanol (précipitation des protéines ?)
- ajouter 400µl d'hexane (retient les lipides ?)
- agiter 2 minutes au multivortex
- laisser reposer au moins 5 minutes (séparation des phases)
- retirer la phase hexanique (phase supérieure) avec la pompe à vide
- ajouter 400µl d'hexane
- agiter 2 minutes au multivortex
- laisser reposer au moins 5 minutes
- retirer la phase hexanique (phase supérieure) avec la pompe à vide
- centrifuger à 12000g pendant 5 min
- transférer la phase éthanolique restante dans un tube sans insert (« vial »)
- évaporer sous azote jusqu'à l'obtention d'un culot sec
- reprendre par 200µl de phase mobile : acétonitrile 50% / eau milliQ 50% / acide formique 0.1%
- agiter au moins 5 minutes au multivortex
- transférer dans des tubes avec insert (« microvial »)

2.4.5 Préparation des tampons

Les tampons utilisés sont préparés à chaque série :

- voie **WP1** (Wash Port 1): tampon de lavage : Eau milliQ / Acide formique 0.1%
- voie **WP2** : tampon de lavage « Flush Port »: ACN 25% / Méthanol 25% / ISO 25% / eau 25%
- voie **A2** : Eau qualité I / Acide formique 0.1% (solvant aqueux)
- voie **B2** : ACN / Acide formique 0.1% (solvant organique)

Les voies ainsi que le Flush Port sont purgés si le tampon précédent est différent.

Tableau XIII : Consommation du tampon

	Temps (min)	Run (min)	Flow (ml/min)	Consommation du tampon
Equilibration	0-60	60	0.6	20 ml voie **A2** 20 ml voie **B2**
Dosage	0-15	15	0.6	5 ml voie **A2** 5 ml voie **B2**
Lavage	0-45	45	0.6	27 ml voie **B2**

2.4.6 L'HPLC, paramètres issus de la mise au point de la méthode

L'établissement de ces paramètres d'HPLC est le fruit d'une mise au point de méthode qui sera discutée dans le dernier chapitre.

Après avoir été préparés, les échantillons sont injectés dans le spectromètre de masse par l'intermédiaire de la colonne d'HPLC qui sépare préalablement les molécules.

Paramètres HPLC (injecteur automatique, pompes et colonne)

- Séquence d'élution chromatographique :

Tableau XIV : Pump time table

Temps (min)	Flow (ml/min)	Solvant pompe A %	Solvant pompe B %
00 :00 :01	0.6	100	0
00 :02 :00	0.6	100	0
00 :07 :00	0.6	0	100
00 :10 :00	0.6	0	100
00 :10 :01	0.6	100	0
00 :15 :00	0.6	100	0

- volume d'échantillon injecté : 10µl
- débit LC : 0.6 ml/min
- débit d'injection automatique des échantillons :

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- durée du run : 15 minutes
- température de l'injecteur : 30°C
- temps de lavage de l'aiguille
- volume de lavage : 27 ml
- pression maximale de la pompe : 1240 Bar
- pression minimale de la pompe : 0 Bar
- temps d'équilibration : 60 minutes

2.4.7 Paramètres du spectromètre de masse

- durée d'acquisition : 15 min 1 sec
- number of scan / scan sin period: 780 (balayage des masses ?)
- mode d'acquisition des données : MRM (scan type), masse des ions sélectionnés en Q1 et Q3
- mode d'ionisation : positive
- Ion Source : turbo Spray
- CUR (Curtain Gaz) gaz rideau : 30 psi (unité anglosaxone, 1 psi = 1 pound/square inch= 0.07 atm et 14 psi= 1 atm= 1.013 bar)
- CAD (Collison Avtivated Dissociation) activation par collision : medium
- IS (Ion Spray voltage) : 5500 V
- TEM température de la source : 500°C
- GS1 gaz de nébulisation : 40 psi, entraîne la formation d'un spray de gouttelettes
- GS2 gaz chauffant : 40 psi, évapore les gouttelettes
- DP Declustering Potential, potentiel de désolvatation (orifice plate) : 25V
- EP Entrance Potential : 10V
- CE Collision Energy : 25eV
- CXP potentiel de sortie de la cellule de collision : 6V
- Probe vertical micrometer setting (réglage du micromètre vertical de la sonde) :
- Probe horizontal micrometer setting (réglage du micromètre horizontal de la sonde) :
- dwell time per transition : 50msec
- software utilisé : Analyst 1.6.2

La gamme et les échantillons sont injectés. Le temps d'analyse par échantillon est d'environ 15 min et les concentrations (C) sont calculées de la manière suivante : C = (Surface de l'analyte / Surface de l'étalon interne) x K

K= pente de la droite d'étalonnage ; les surfaces sont exprimées en counts

2.5 Validation de méthode

2.5.1 Particularités des analytes étudiés

Comme nous l'avons vu, aucun contrôle qualité n'est disponible sur matrice plasmatique à l'exception de la carnitine libre (contrôles de qualité externes utilisés en tant qu'ersatz de contrôles internes). Par conséquent, nous n'avons pas pu mener de validation de méthode entièrement conforme aux exigences de la norme ISO 15189. La validation de méthode pour la carnitine a pu être plus complète que celle des acylcarnitines. Dans la plupart des publications (79)(8)(124)(80)(126), les auteurs ont fabriqué leurs propres contrôles internes en effectuant des ajouts dosés sur plasma. Nous expliquerons dans la discussion pourquoi nous n'avons pas opté pour cette méthode.

De plus, nous justifierons dans la discussion l'impossibilité de nous conformer au nombre de passages des échantillons préconisé pour chaque paramètre de la validation de méthode (15). En effet, le coût des réactifs, le temps d'analyse, la disponibilité des instruments et la contrainte de temps nous ont amené à réaliser une validation de méthode compatible avec les contraintes budgétaires, techniques et humaines.

Dans le cadre de la pratique quotidienne, nous avons privilégié une validation de méthode portant sur le domaine des valeurs physiologiques des acylcarnitines. Une étude portant sur les valeurs hautes, adaptées aux domaines de valeurs pouvant être rencontrées en pathologie devra être effectué par la suite. Cette estimation des valeurs rencontrées en pathologie est difficile du fait du manque de données de la littérature pour les acylcarnitines plasmatiques. Cependant, nous pouvons nous appuyer sur des données concernant les papiers buvard (130).

2.5.2 Paramètres étudiés (15)

2.5.2.1 Evaluation de la limite de détection (LOD)

Elle est définie comme étant le plus petit signal qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc réalisé dans les mêmes conditions. En chromatographie, la LOD peut être déterminée comme étant égale au triple de l'écart-type obtenu à partir d'un signal correspondant à la ligne de base mesurée 10 fois.
Pour l'estimer, nous avons effectué 30 mesures répétées des blancs (en utilisant un diluant : la phase mobile) dans une même série. Nous avons calculé la moyenne obtenue (mb) et l'écart-type (Sb), exprimé en concentration de ces 30 mesures.
LOD= 3 x Sb

2.5.2.2 Evaluation de la limite de quantification (LOQ)

Elle correspond à la plus petite valeur mesurée rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue.
LOQ= 10 x Sb

2.5.2.3 Evaluation de la limite supérieure de linéarité (LSL)

Après dilution d'un échantillon de concentration très élevée, les résultats obtenus permettent de vérifier la linéarité entre les dilutions effectuées et les concentrations calculées. LSL et LOQ permettent de définir le domaine de mesure de la méthode.
Pour le C0, nous avons utilisé le contrôle qualité le plus haut dont nous disposions, soit 140µM.
Pour les acylcarnitines, nous ne pouvons pas effectuer de LSL.

2.5.2.4 Evaluation de la contamination inter échantillons pour la carnitine totale

Après rinçage de l'appareil, un échantillon à valeur élevée est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH) suivi d'un échantillon à valeur base également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) sont répétées 5 fois afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne de B3 (mB3). Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante :
Contamination en % = ((mB1- mB3)/(mH- mB3))x 100
Nous avons utilisé le point 2 de la gamme en tant que valeur basse et le point 8 de la gamme en tant que valeur haute. Nous avons répété la séquence 5 fois.

2.5.2.5 Evaluation de la répétabilité

Cette évaluation consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même étalonnage, même instrument dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans les conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système "instrument/réactif" pour le paramètre concerné.
Le coefficient de variation (CV) pour un niveau de concentration donné est calculé ainsi :
CV en %= (s/m) x 100, avec m la moyenne et s l'écart type de la série.

Pour le C0, nous avons choisi 3 contrôles qualité (3 niveaux de concentration : 140µM dilué au 1/10éme soit 14µM, 37µM, 70.2µM). Pour les acylcarnitines, nous avons choisi un plasma présentant des valeurs physiologiques en acylcarnitines.
Les contrôles C0 ont été préparés chacun 5 fois chacun (recommandations du COFRAC pour une analyse statistique optimale= 30 fois), dans une même série, le même jour, par le même opérateur, soit 15 plasma contrôles techniqués.
Le plasma témoin en acylcarnitines a été techniqué 5 fois au cours de cette même série.

2.5.2.6 Evaluation de la fidélité intermédiaire FI

Cette évaluation consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes (opérateur, temps, étalonnages…). L'essai est réalisé au cours de séries successives, en général d'échantillons de CIQ quotidiens. La FI est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et 2 niveaux minimum. Toute adaptation du protocole doit être justifiée sur le plan statistique. Les modalités de calcul sont identiques à celle de la répétabilité : moyenne, écart type, coefficient de variation.
Pour le C0, nous avons effectué 5 passages de 3 niveaux de contrôles à 5 dates différents, sur une période de 2 semaines ½. Trois opérateurs différents ont effectué le dosage, dont 2 l'effectueront régulièrement par la suite.
Pour les dérivés acylés, la même procédure a été mise en place avec 7 passages du plasma témoin sain dans différentes séries.
Comme pour la répétabilité, nous justifions le nombre de passage réduit par des contraintes de quantité de contrôle disponibles, du coût des réactifs, de la disponibilité de la machine et des contraintes de temps.

2.5.2.7 Evaluation de la justesse

En biologie, il est difficile de parler stricto sensu de justesse, les matériaux de référence certifiés avec des valeurs vraies étant rares. Une étude de la justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. En l'absence d'externalisation des CIQ, le laboratoire établit l'inexactitude de sa méthode en comparant les valeurs obtenues sur des échantillons d'EEQ aux valeurs cibles. L'inexactitude permet une approche de l'écart par rapport à la valeur cible.
Inexactitude en % = ((x-v)/100) x 100
x : valeur trouvée pour l'EEQ
v : valeur cible (moyenne de l'ensemble des participants ou moyenne des résultats obtenus avec la même méthode, groupe de pairs)
Nous avons calculé une inexactitude pour chaque niveau de contrôles CO. Nous avons comparé les résultats à la moyenne de l'ensemble des participants du programme CQE ERNDIM, soit environ 100 laboratoires.

N’ayant pas de contrôles pour les acylcarnitines, nous n’avons pas pu effectuer d’évaluation de la justesse pour ces paramètres.

2.5.2.8 Approche de l’estimation de l’incertitude de mesure

Les données de validation de méthode (FI et justesse) permettent une approche l’estimation de l’incertitude associée au résultat de l’examen. En effet, ces données regroupent les principaux facteurs de variation de la méthode. Le COFRAC propose un exemple simplifié de détermination de l’incertitude :

- Si $\mu 1$ est la composante d’incertitude due à la FI (écart type de la FI) : $\mu 1 = SFI$

La composante d’incertitude due à la justesse $\mu 2$ est donnée par la relation suivante (Loi du rectangle) : $\mu 2$ = biais ou inexactitude / $\sqrt{3}$

- La somme quadratique des 2 composants permet une estimation de l’incertitude combinée μc.

$\mu c = \sqrt{\mu 1^2 + \mu 2^2}$

- Enfin, l’incertitude élargie Uc est conventionnellement calculée

$U = 2.uc$ (pour indiquer que l’intervalle compris entre +/-U contiendra conventionnellement la valeur « vraie » à 95%, dans le cas d’une distribution gaussienne)

- Le résultat de la mesure analytique R s’exprime comme suit :

R = valeur mesurée +/-U

Nous avons appliqué la définition du COFRAC afin de calculer U grâce aux données de répétabilité et de FI pour C0. La valeur de U peut être différente selon le niveau de concentration étudié.

2.6 Tests de stabilité de la carnitine et des acylcarnitines

Il est généralement recommandé de congeler immédiatement les échantillons après leur centrifugation (82). Ne disposant pas de données de la littérature sur la conservation pré-analytique des échantillons, les plasmas de deux témoins (TA1 et TA2) ont été aliquotés et congelés à différents temps : immédiatement après centrifugation (J0), après 3 jours de stockage à +4°C (J3) et après 7 jours à +4°C (J7).

Ils ont étés étudiés au cours d'une même série. Nous avons comparé les coefficients de variation retrouvés à ceux de la méthode pour estimer une possible altération ou non des acylcarnitines fonction du temps passé à +4°C avant leur congélation.

2.7 Approximation des valeurs de référence biologique

Le COFRAC recommande une vérification des valeurs de référence biologique par la bibliographie et/ou par le calcul statistique.

Avec une distribution gaussienne de la population, le calcul peut se faire de la manière suivante :

- après une période d'utilisation permettant d'obtenir un nombre de valeurs significatif (n >100)
- à partir de patients si possible exempts de pathologies
- en écartant les valeurs aberrantes
- en écartant toutes les valeurs > m + 2s et < m – 2s
- en recalculant la moyenne (tronquée) mt et l'écart-type st à partir des valeurs ainsi retenues.

Les valeurs de référence sont données par l'intervalle (mt – 2 st ; mt + 2 st).

Dans notre cas, la population étudieé était trop faible pour effectuer ces calculs.

Chapitre 3 Résultats

3.1 Validation de méthode

Particularités des résultats concernant les acylcarnitines par rapport à la carnitine libre:
Nous avons pu déterminer les LOD et LOQ de la carnitine et des acylcarnitines mais nous n'avons pu établir de limite supérieure de linéarité que pour le C0.
En ce qui concerne les valeurs physiologiques, nous estimons que ces valeurs, faibles, n'exposent pas à un risque de dépassement de cette limite de linéarité.

3.1.1 Répétabilité

3.1.1.1 Répétabilité du CO, utilisation des contrôles qualité :

Les résultats montrent des coefficients de variation variables selon les niveaux de concentration :

*niveau bas, concentration théorique à 14µM : 25%
*niveau intermédiaire, concentration théorique 37µM : 11%
*niveau élevé, concentration théorique 70.2µM : 14%

Pour le niveau élevé, la moyenne des valeurs (50,26 µM) présentée dans le **Tableau XV** semble aberrante. Il sera nécessaire de vérifier ces résultats avant d'en tirer toute conclusion.

Rapport-Gratuit.com

Tableau XV: Essais de répétabilité pour le CO à trois niveaux de concentration différents

Niveau de concentration	Passage	valeur (µmol/L)	moyenne (µmol/L)	Ecart-Type (µmol/L)	CV (%)
1= 14µM	1	12	12,242	3,04	25
	2	17,2			
	3	12,1			
	4	9,01			
	5	10,9			
2= 37µM	1	34,5	33,6	3,55	11
	2	29,1			
	3	33,5			
	4	32,1			
	5	38,8			
3= 70,2µM	*1*	*51,2*	***50,26***	*7,062*	*14*
	2	*47,5*			
	3	*61,1*			
	4	*49,8*			
	5	*41,7*			

3.1.1.2 Répétabilité des acylcarnitines

Le plasma d'un témoin adulte a été techniqué et injecté 5 fois au cours de la même série.

Les résultats montrent des coefficients de variation entre 3 et 17.5%.

Tableau XVI: Répétabilité des acylcarnitines

AC	moyenne	écart type	CV (%)
CT	35.6	2.45	7
C0	29.5	2.77	9.5
C2	4	0.55	13.5
C3	0.6	0.06	10
C4	0.22	0.026	11.5
C5	0.1	0.017	17.5
C6	0.12	0.004	3
C8	0.21	0.014	7
C10	0.44	0.047	11
C12	0.12	0.018	15
C14	0.03	0.0025	8.5
C16	0.12	0.007	6
C18	0.08	0.004	5.5

3.1.2 Fidélité intermédiaire

3.1.2.1 Fidélité intermédiaire du CO

Elle été réalisée sur 3 niveaux de concentration, dans 6 séries différentes. Les CV varient de 10 à 23% selon le niveau de concentration.

Tableau XVII: Fidélité intermédiaire du CO

niveau de concentration	moyenne	écart-type	CV (%)
Bas 14µM	13.3	3.1	23
Moyen 37µM	37.7	4.2	11
Haut 70.2µM	61.9	6.4	10

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.1.2.2 Fidélité intermédiaire des acylcarnitines

Elle a été réalisée à l'aide du même échantillon que la répétabilité mais au cours de 7 séries différentes. Les valeurs aberrantes n'ont pas été inclues dans les calculs (2 sur 98). La moyenne des CV est de 22.4 %.

Tableau XIII: Fidélité intermédiaire des acylacrnitines

AC	moyenne	écart-type	CV (%)
CT	38.6	5.4	13
C0	32.5	4.25	12
C2	4	0.9	22
C3	0.65	0.107	18
C4	0.32	0.13	48
C5	0.15	0.043	27
C6	0.14	0.025	24
C8	0.23	0.039	17
C10	0.42	0.055	14
C12	0.15	0.033	21
C14	0.07	0.027	38
C16	0.14	0.24	16
C18	0.09	0.16	21

3.1.3 Evaluation de la justesse du CO

Les résultats montrent une inexactitude relative de +1.84% pour le niveau 2, de -5% pour le niveau 1 et de -11.85% pour le niveau 3.

Tableau XIX: Evaluation de la justesse du CO à trois concentrations différentes

Niveau de concentration	**Concentrations théoriques (µmol/L)**	**Moyenne des résultats (µmol/L)**	**Inexactitude absolue (µmol/L)**	**Inexactitude relative(%)**	**Taux de recouvrement (%)**
1	14	13,3	-0,7	-5,00	95,00
2	37	37,68	0,68	1,84	101,84
3	70,2	61,88	-8,32	-11,85	88,15

3.1.4 Estimation de l'incertitude de mesure

Les estimations de l'incertitude de mesure ont été calculées en valeurs absolues et en pourcentages. Nous avons utilisé les valeurs absolues pour calculer les domaines d'incertitude, présentés dans le Tableau ci-dessous :

Tableau XX: Domaines d'incertitudes de mesure pour le C0 (valeur +/-U) à trois niveaux de concentration différents

Niveau 1 : 14 µmol/L

u□ = σ repro	**u□ = biais/√3**	**uc = √u□²+u□²**	**U = 2*uc**	
23,36	2,89	23,54	47,07%	soit 6,6µM
3,11	0,405	3,136	6,27	en µM

Domaine d'incertitude : 7,73 à 20,27µmol/L

Niveau 2 : 37 µmol/L

u□ = σ repro	**u□ = biais/√3**	**uc = √u□²+u□²**	**U = 2*uc**	
11,123	1,06	11,17	22,35%	soit 8,3µM
4,19	0,39	4,21	8,42	en µM

Domaine d'incertitude: 28,58 à 45,42 µmol/L

Niveau 3 : 70,2 µmol/L

u□ = σ repro	**u□ = biais/√3**	**uc = √u□²+u□²**	**U = 2*uc**	
10,3387	6,85	12,40	24,80%	soit 17,4µM
6,4	4,81	8,01	16,01	en µM

Domaine d'incertitude : 54,19 à 86,21µmol/L

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.1.5 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) en µM

Les résultats montrent des limites de détection entre 0.003 µM pour le C12 et le C16 et 0.5µM pour le C0. Les limites de quantification varient de 0.01µM pour le C12, le C16 et le C18 à 1.63µM pour la carnitine libre et 1.78 pour la carnitine totale (**tableau XXII**). Les détails sont disponibles en Annexe.

Tableau XXI: LOD et LOQ des acylcarnitines, calculés à partir de 30 blancs (1er point de gamme), CT : carnitine totale

	moyenne	Ecart type	LOD	LOQ
CT	1.15	0.178	0.5	1.78
C0	0.48	0.163	0.5	1.63
C2	0.037	0.006	0.02	0.06
C3	0.14	0.011	0.03	0.11
C4	0.019	0.002	0.006	0.02
C5	0.09	0.004	0.01	0.04
C6	0.06	0.006	0.02	0.06
C8	0.05	0.007	0.02	0.07
C10	0.05	0.005	0.01	0.05
C12	0.07	0.001	0.003	0.01
C14	0.04	0.002	0.007	0.02
C16	0.05	0.001	0.003	0.01
C18	0.04	0.001	0.004	0.01

3.1.6 Limites supérieures de linéarité (LSL)

Les résultats montrent une LSL pour le C0 de 60 µM.

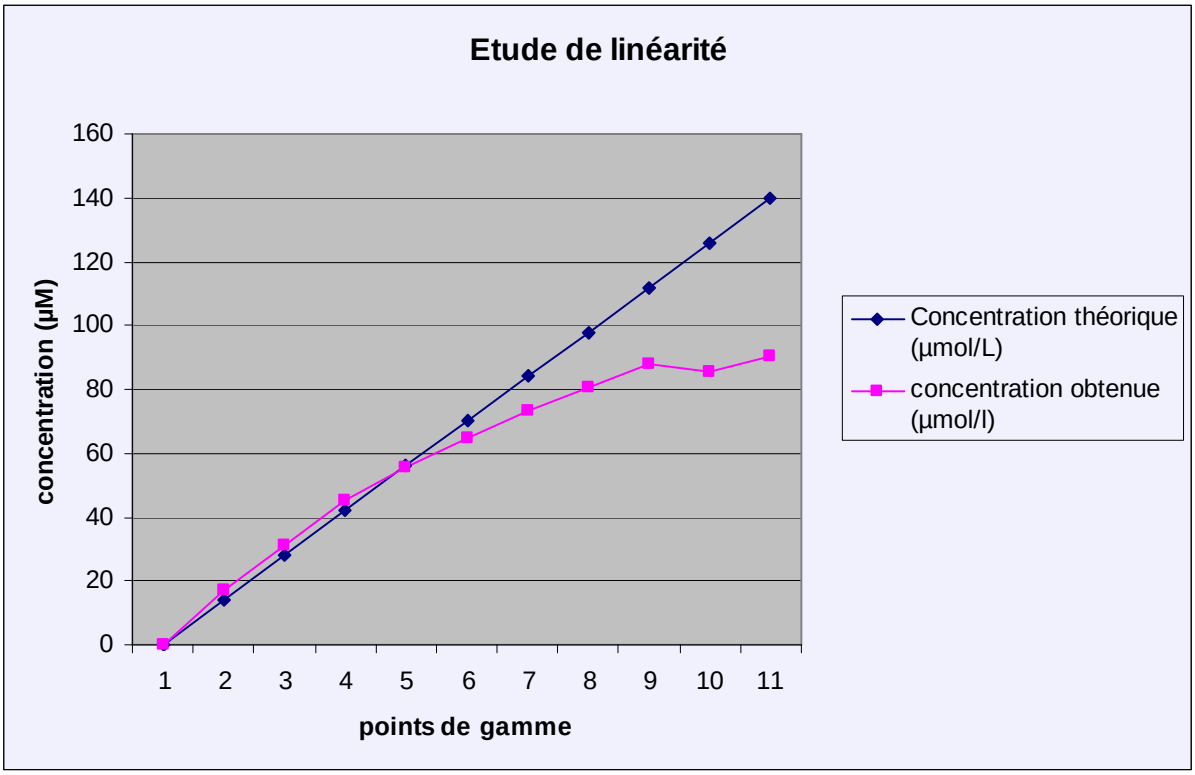


Figure 40: Etude de la LSL du C0. La LSL est estimée au croisement des 2 courbes (tableau des résultats en Annexe). Les points de gamme sont dilués au 1/10éme.
Le domaine de mesure du C0 est : 1.63 - 60µM. Toute valeur supérieure à 60µM doit donc être diluée.

3.1.7 Stabilité des acylcarnitines

Les résultats montrent des CV inférieurs aux CV de la méthode à l'exception du C2 dont le CV est autour de 30% (vs 22% pour la méthode) et dans le sens global d'une augmentation. Ces résultats nécessitent une confirmation sur un nombre supérieur de plasmas. L'explication physiologique ne semble pas évidente.

Tableau XXII: Stabilité des acylcarnitines

	TA1 J0	TA1 J3	TA1 J7	moyenne	Ecart-type	CV
CT	22,9	22,1	25,5	23,50	1,778	7,6
C0	19	18,1	20	19,03	0,950	5,0
C2	2,36	2,4	4,04	2,93	0,959	32,7
C3	0,236	0,26	0,239	0,25	0,013	5,3
C4	0,458	0,486	0,412	0,45	0,037	8,3
C5	0,0897	0,0744	0,0928	0,09	0,010	11,5
C6	0,0927	0,09	0,0918	0,09	0,001	1,5
C8	0,101	0,101	0,0932	0,10	0,005	4,6
C10	0,182	0,142	0,147	0,16	0,022	13,9
C12	0,126	0,126	0,122	0,12	0,002	1,9
C14	0,0807	0,0821	0,0805	0,08	0,001	1,1
C16	0,122	0,117	0,12	0,12	0,003	2,1
C18	0,0704	0,0768	0,0733	0,07	0,003	4,4

	TA2 J0	TA2 J3	TA2 J7	moyenne	Ecart-type	CV
CT	42,4	40,6	38,5	40,500	1,952	4,8
C0	35,4	30,2	29,5	31,700	3,223	10,2
C2	3,92	7,46	6,1	5,827	1,786	30,6
C3	0,444	0,431	0,395	0,423	0,025	6,0
C4	0,423	0,473	0,385	0,427	0,044	10,3
C5	0,214	0,182	0,223	0,206	0,022	10,4
C6	0,173	0,175	0,174	0,174	0,001	0,6
C8	0,36	0,334	0,314	0,336	0,023	6,9
C10	0,729	0,65	0,669	0,683	0,041	6,0
C12	0,259	0,236	0,247	0,247	0,012	4,7
C14	0,119	0,109	0,114	0,114	0,005	4,4
C16	0,231	0,206	0,208	0,215	0,014	6,5
C18	0,145	0,139	0,135	0,140	0,005	3,6

Les valeurs surlignées correspondent aux valeurs qui dépassent le CV de la méthode.

3.1.8 Etude de la contamination

Les résultats montrent une contamination générale (paramètre carnitine totale utilisé) de 0.22%.

Tableau XXIII: Etude de la contamination

	Echantillon de concentration haute			Echantillon de concentration basse		
	H1 (µmol/l)	**H2 (µmol/L)**	**H3 (µmol/L)**	**B1(µmol/L)**	**B2 (µmol/L)**	**B3 (µmol/L)**
Répétition 1	137	144	125	9,45	9,38	10,9
Répétition 2	126	136	144	13	12,7	10,2
Répétition 3	135	133	135	9,89	9,7	9,4
Répétition 4	123	142	148	11	10,5	11,6
Répétition 5	135	135	130	9,19	12,6	9,05
Moyenne (µmol/L)	135,2			10,506	10,976	10,23

% de contamination	**0,22**

3.2 Valeurs de référence biologique

Nous avons synthétisé dans deux tableaux (**Tableau IV** et **Tableau V**) les valeurs de référence que nous avons retrouvées dans la littérature ou celles qui sont utilisées par certains centres de diagnostic des maladies métaboliques.

Nous avons recueilli des échantillons plasmatiques d'adultes sains et d'enfants hospitalisés afin d'obtenir une plasmathèque permettant d'établir une approximation de ces valeurs de référence. Nous avons déterminé 8 tranches d'âge et exploité de 3 à 14 échantillons par tranche d'âge, soit 69 au total.

Les témoins adultes sont des volontaires sains de plus de 18 ans, anonymisés, prélevés à jeun sur héparinate de lithium. Ils ne présentent pas de critères d'exclusions : diabète, chirurgie bariatrique, antibiothérapie, prise d'anticonvulsivants, de zidovudine, chimiothérapie récente, grossesse, insuffisance rénale (131), dialyse chronique, cirrhose hépatique.

Les témoins pédiatriques ont été prélevés sur héparinate de lithium dans le cadre du soin, ils ne sont pas à jeun et leur contexte pathologique est connu. Ils sont anonymisés et leur plasma est congelé dans les 12 heures suivant la centrifugation au laboratoire. Les critères d'exclusion sont les mêmes que pour les adultes.

Les tranches d'âges sont déterminées selon les données de la littérature (132): prématurés, 0-1 mois, 1-2mois, 2-18 mois, 18 mois-5 ans, 5-10 ans, 10-18 ans et >18 ans.

Tableau XXIV : Recueil des témoins et moyenne d'âge

Tranche d'âge	Nombre de témoins
prématurés	9
0-7 jours	3
7 jours -2 mois	7
2-18 mois	11
18 mois-5 ans	7
5-10 ans	8
10-18ans	10
>18 ans	14 (moyenne 27 ans)
total	69

Particularités des résultats concernant les acylcarnitines par rapport à la carnitine libre:

Nous avons pu déterminer les LOD et LOQ de la carnitine et des acylcarnitines mais nous n'avons pu établir de limite supérieure de linéarité que pour le C0.
En ce qui concerne les valeurs physiologiques, nous estimons que ces valeurs, faibles, n'exposent pas à un risque de dépassement de cette limite de linéarité.

3.2.1 Adultes

Les plasmas de 14 adultes, indemnes de toute pathologie ont été analysés du C0 au C12. Seulement 11 plasmas ont étés exploités du C14 au C18 en raison de valeurs aberrantes suite à un incident technique.

Tableau XXV: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez l'adulte, 9 femmes et 5 hommes, âgés de 23 à 42 ans.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percent.	95è percent.
AC	6.04	5.9	1.9	3.9	11.2	4.23	8.8
AC/CO	0.25	0.22	0.08	0.15	0.4	0.18	0.39
CT	30.5	28.3	6.3	22	42.4	22.59	40.1
C0	24.4	22.5	5.5	17.5	35.5	18.15	32.4
C2	3.83	3.6	1.3	2.36	6.89	2.52	6.16
C3	0.40	0.38	0.15	0.235	0.65	0.24	0.63
C4	0.44	0.42	0.2	0.134	0.87	0.18	0.75
C5	0.15	0.11	0.1	0.043	0.34	0.06	0.31
C6	0.12	0.11	0.04	0.083	0.22	0.08	0.19
C8	0.19	0.12	0.13	0.066	0.45	0.08	0.43
C10	0.33	0.21	0.26	0.133	0.95	0.13	0.81
C12	0.14	0.12	0.07	0.027	0.26	0.05	0.27
C14	0.08	0.08	0.045	0.02	0.12	0.02	0.11
C16	0.14	0.13	0.046	0.095	0.23	0.1	0.20
C18	0.09	0.08	0.034	0.06	0.145	0.06	0.14

Les femmes ont une carnitine libre moyenne à 22µM et les hommes ont une carnitine libre moyenne à 28,7µM.

Les analytes colorés sont ceux dont les valeurs diffèrent assez fortement des valeurs de référence publiées (en vert lorsqu'elles sont inférieures, en rouge lorsqu'elles sont supérieures). Ce sont des tendances.

Rapport-Gratuit.com

3.2.2 Témoins prématurés

Les plasmas de 9 prématurés pesant de 750g à 2310g ont été analysés (moyenne de poids=1717g).

Tableau XXVI: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez 9 prématurés.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percent.	95è percent.
AC	4.11	4.4	1.3	1.88	6.1	2.16	5.7
AC/C0	0.3	0.23	0.2	0.11	0.78	0.12	0.62
CT	22.9	21.1	12.35	10.2	39.4	10.28	39.2
C0	18.79	17.5	11.8	6.08	35.5	6.78	35
C2	2.47	0.85	0.97	0.63	3.46	0.82	3.39
C3	0.9	0.65	0.52	0.43	1.92	0.45	1.78
C4	0.14	0.13	0.09	0.01	0.28	0.03	0.27
C5	0.14	0.11	0.07	0.04	0.28	0.057	0.25
C6	0.03	0.02	0.018	0	0.05	0.005	0.05
C8	0.09	0.08	0.032	0.05	0.15	0.06	0.14
C10	0.1	0.08	0.053	0.05	0.13	0.06	0.18
C12	0.08	0.08	0.034	0.03	0.14	0.031	0.12
C14	0.03	0.03	0.023	0	0.06	0.002	0.06
C16	0.08	0.07	0.057	0.04	0.22	0.039	0.17
C18	0.07	0.09	0.045	0.02	0.13	0.018	0.12

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

3.2.3 Témoins âgés de 1 à 7 jours

Tableau XXVII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 3 nourrissons âgés de 1 à 7 jours

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	4.47	4.7	1.17	3.2	5.5	3.35	5.42
AC/C0	0.23	0.18	0.14	0.12	0.38	0.13	0.36
CT	29.6	20.9	18.55	17	20.9	17.39	47.9
C0	25.13	17.7	17.8	12.3	45.4	12.84	45.6
C2	3	3.06	0.99	1.98	3.95	2	3.8
C3	0.28	0.156	0.23	0.126	0.54	0.13	0.5
C4	0.13	0.1	0.1	0.05	0.25	0.05	0.23
C5	0.14	0.13	0.02	0.118	0.17	0.12	0.16
C6	0.074	0.052	0.03	0.053	0.1	0.05	0.1
C8	0.1	0.064	0.08	0.058	0.19	0.06	0.18
C10	0.15	0.055	0.14	0.064	0.31	0.06	0.38
C12	0.15	0.14	0.05	0.112	0.2	0.11	0.2
C14	0.13	0.13	0.02	0.11	0.13	0.11	0.14
C16	0.17	0.2	0.06	0.096	0.21	0.11	0.2
C18	0.13	0.127	0.03	0.1	0.15	0.1	0.15

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2.4 Témoins âgés de 7 jours à 2 mois

Tableau XXVIII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 7 nourrissons âgés de 7 jours à 2 mois. Le C14 d'un témoin n'a pas exploité à cause du même incident technique au sein d'une série.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	4.06	3.8	1.23	2.7	6.5	2.82	5.9
AC/CO	0.18	0.19	0.07	0.1	0.27	0.1	0.26
CT	29.86	32.1	12.65	14.1	48	14.25	45.45
C0	25.8	28.4	12	11.4	43.5	11.43	41.16
C2	2.7	2.219	1.15	1.88	5.1	1.93	4.55
C3	0.33	0.35	0.2	0.08	0.64	0.07	0.6
C4	0.13	0.11	0.09	0.02	0.27	0.02	0.24
C5	0.13	0.16	0.04	0.09	0.18	0.09	0.17
C6	0.11	0.09	0.06	0.04	0.18	0.05	0.17
C8	0.09	0.07	0.04	0.04	0.14	0.05	0.13
C10	0.12	0.13	0.07	0.03	0.23	0.04	0.21
C12	0.13	0.11	0.03	0.1	0.18	0.1	0.17
C14	0.11	0.11	0.02	0.07	0.13	0.08	0.13
C16	0.14	0.15	0.04	0.08	0.19	0.09	0.18
C18	0.09	0.1	0.03	0.04	0.13	0.05	0.13

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

3.2.5 Témoins âgés de 2 à 18 mois

Tableau XXIX: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 11 nourrissons âgés de 2 à 18 mois.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	6.33	9.4	2.4	3.6	10.3	3.75	9.9
AC/CO	0.2	0.27	0.12	0.11	0.51	0.11	0.40
CT	40.5	44.1	10.58	22.6	58.5	24.3	53.8
C0	34	34.7	10.4	18.7	52.4	19.4	47.6
C2	4.5	7.7	2.23	1.96	8	2.12	7.9
C3	0.7	0.51	0.28	0.37	1.25	0.37	1.175
C4	0.18	0.21	0.07	0.04	0.33	0.07	0.28
C5	0.12	0.11	0.048	0.064	0.25	0.075	0.19
C6	0.073	0.12	0.032	0.04	0.16	0.04	0.12
C8	0.083	0.083	0.05	0.016	0.16	0.02	0.14
C10	0.153	0.19	0.045	0.08	0.254	0.09	0.213
C12	0.147	0.142	0.046	0.07	0.26	0.072	0.2
C14	0.059	0.083	0.018	0.03	0.083	0.037	0.085
C16	0.133	0.186	0.05	0.08	0.215	0.083	0.214
C18	0.17	0.132	0.08	0.063	0.34	0.075	0.312

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

3.2.6 Témoins âgés de 18 à 59 mois

Tableau XXX: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 7 enfants âgés de 18 à 59 mois.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	7.43	8.1	2.08	5.1	9.8	5.16	9.77
AC/CO	0.19	0.18	0.045	0.147	0.28	0.154	0.26
CT	46.9	41.4	14.5	30.8	66.5	31.9	65.3
C0	39.5	36.1	12.7	25.3	56.8	26.3	55.5
C2	5.4	4.34	1.9	3.47	8.2	3.6	7.9
C3	0.91	0.39	1.4	0.27	4.05	0.27	3
C4	0.28	0.31	0.1	0.08	0.4	0.13	0.38
C5	0.12	0.11	0.04	0.07	0.17	0.069	0.16
C6	0.04	0.04	0.016	0.02	0.06	0.02	0.06
C8	0.1	0.09	0.028	0.05	0.13	0.06	0.13
C10	0.14	0.14	0.05	0.06	0.21	0.072	0.202
C12	0.09	0.09	0.015	0.07	0.1	0.07	0.104
C14	0.07	0.07	0.011	0.05	0.08	0.052	0.08
C16	0.13	0.12	0.028	0.1	0.18	0.105	0.173
C18	0.15	0.16	0.032	0.11	0.19	0.115	0.188

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

3.2.7 Témoins âgés de 5 à 10 ans

Tableau XXXI: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 8 enfants âgés de 5 à 10 ans.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	6.36	5.2	2.03	3.9	6.3	4.14	8.95
AC/CO	0.23	0.159	0.083	0.17	0.376	0.15	0.36
CT	34.47	37.45	4.9	30.4	43.5	30.5	41.75
C0	28.11	32.25	4.3	22.1	37	23.5	34.5
C2	4.29	3.27	1.78	2.25	6.91	2.36	6.84
C3	0.58	0.6	0.07	0.465	0.672	0.48	0.66
C4	0.266	0.27	0.055	0.18	0.36	0.194	0.34
C5	0.095	0.097	0.023	0.066	0.14	0.067	0.128
C6	0.099	0.079	0.027	0.078	0.11	0.079	0.141
C8	0.134	0.043	0.146	0.035	0.475	0.041	0.372
C10	0.175	0.036	0.21	0.031	0.654	0.034	0.52
C12	0.062	0.021	0.042	0.013	0.127	0.018	0.124
C14	0.025	0.017	0.008	0.014	0.038	0.016	0.037
C16	0.093	0.088	0.016	0.074	0.121	0.074	0.115
C18	0.55	0.697	0.17	0.332	0.883	0.34	0.78

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

3.2.8 Témoins âgés de 10 à 17 ans

Tableau XXXII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 10 témoins âgés de 10 à 17 ans.

	Moyenne	Médiane	Ecart type	Minimale	Maximale	5è percentile	95è percentile
AC	7.02	5.8	3.21	3.9	13.9	4.1	12.4
AC/CO	0.26	0.24	0.113	0.14	0.5	0.14	0.43
CT	34.5	34.4	6.36	25.5	42	26.3	41.8
C0	27.5	26.6	5.05	21	36.7	21.5	34.4
C2	4.96	3.7	3	2.27	11.5	2.35	10
C3	0.58	0.55	0.11	0.45	0.72	0.46	0.73
C4	0.28	0.25	0.09	0.19	0.49	0.2	0.44
C5	0.118	0.123	0.038	0.063	0.167	0.066	0.16
C6	0.092	0.091	0.016	0.074	0.123	0.074	0.115
C8	0.088	0.081	0.025	0.062	0.145	0.063	0.128
C10	0.09	0.088	0.034	0.044	0.152	0.05	0.138
C12	0.046	0.043	0.02	0.021	0.076	0.023	0.073
C14	0.022	0.024	0.007	0.011	0.033	0.012	0.032
C16	0.083	0.081	0.017	0.051	0.102	0.058	0.102
C18	0.64	0.64	0.2	0.38	1.13	0.43	0.93

Nb:Absence de normes pédiatriques pour > CO

Par rapport aux valeurs de référence disponibles, les principales tendances sont:

-tendance haute du C18 (parfois très haute)

-tendance basse de la carnitine totale et AC totaux et à courtes chaînes

-tendance haute du C3 pour les prématurés et enfants de 2 mois à 5 ans.

3.2.9 Evolution des analytes en fonction de l'âge

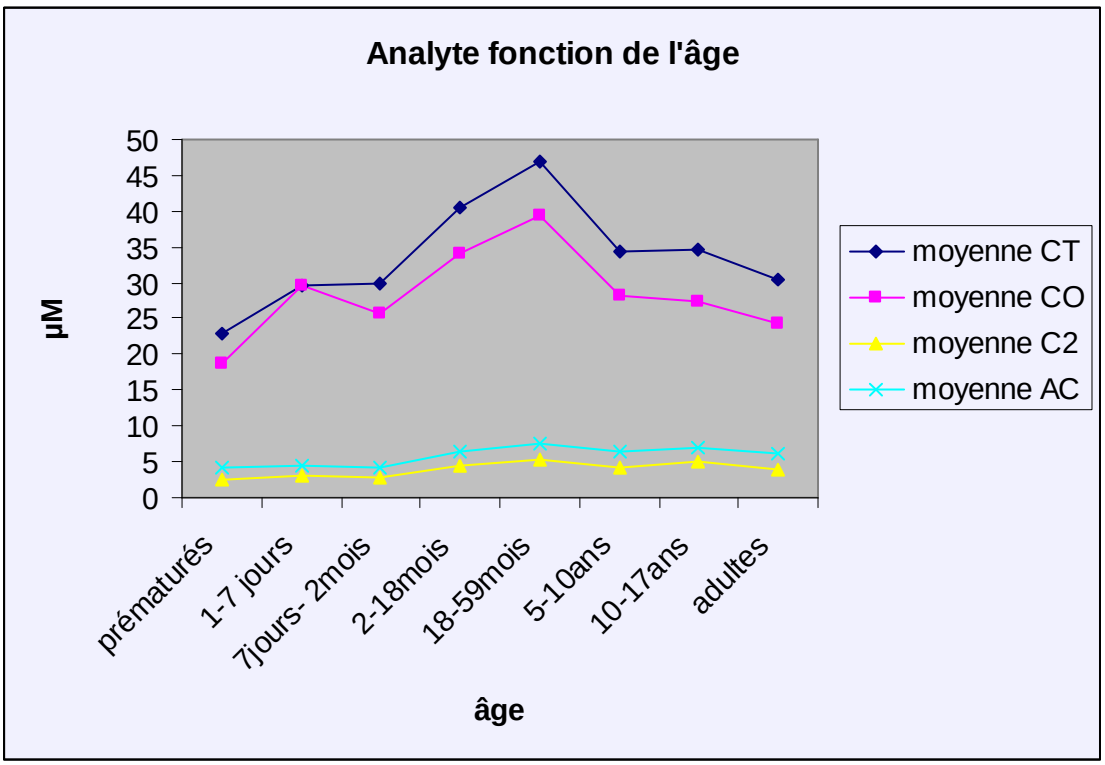


Figure 41: Evolution des concentrations en CT, CO, C2 et AC fonction de l'âge.

Les concentrations en CT et CO semblent augmenter entre 2-18mois et 18-59 mois. Elles semblent stables pour les AC totaux et le C2.

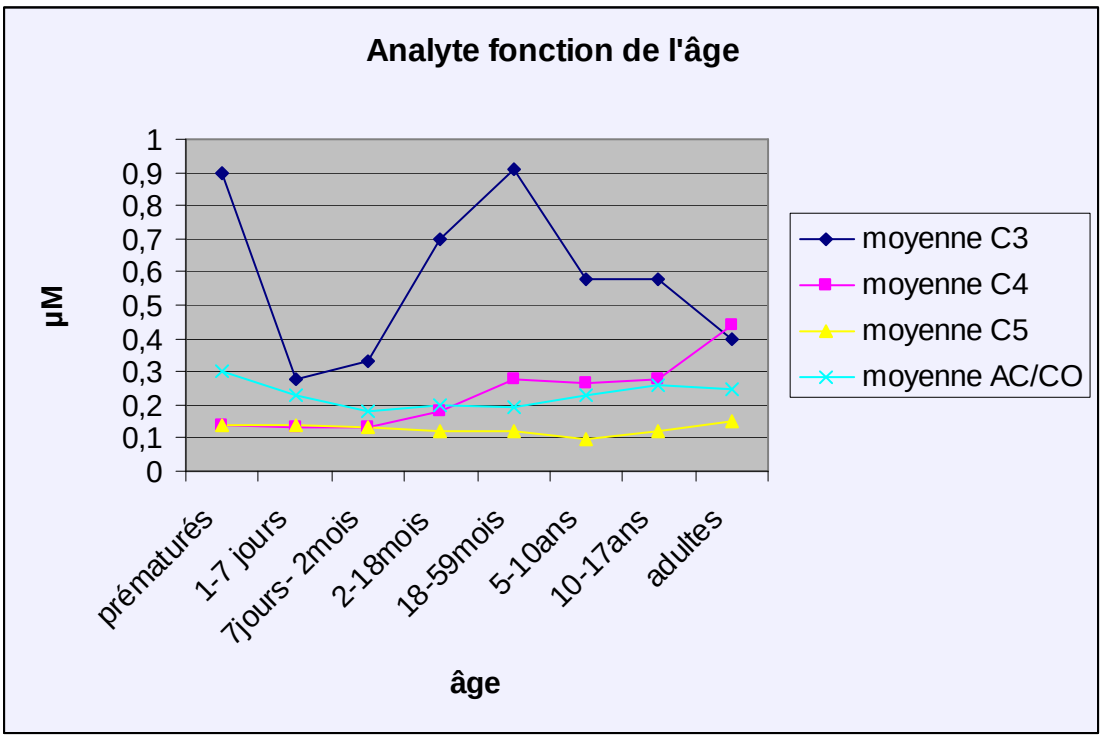


Figure 42: Evolution des concentrations en C3, C4, C5 en fonction de l'âge

Le C3 semble assez variable avec un taux relativement élevé chez les prématurés et 2-59mois. Les C3, C4, C5 et le ratio AC/CO semblent comparables.

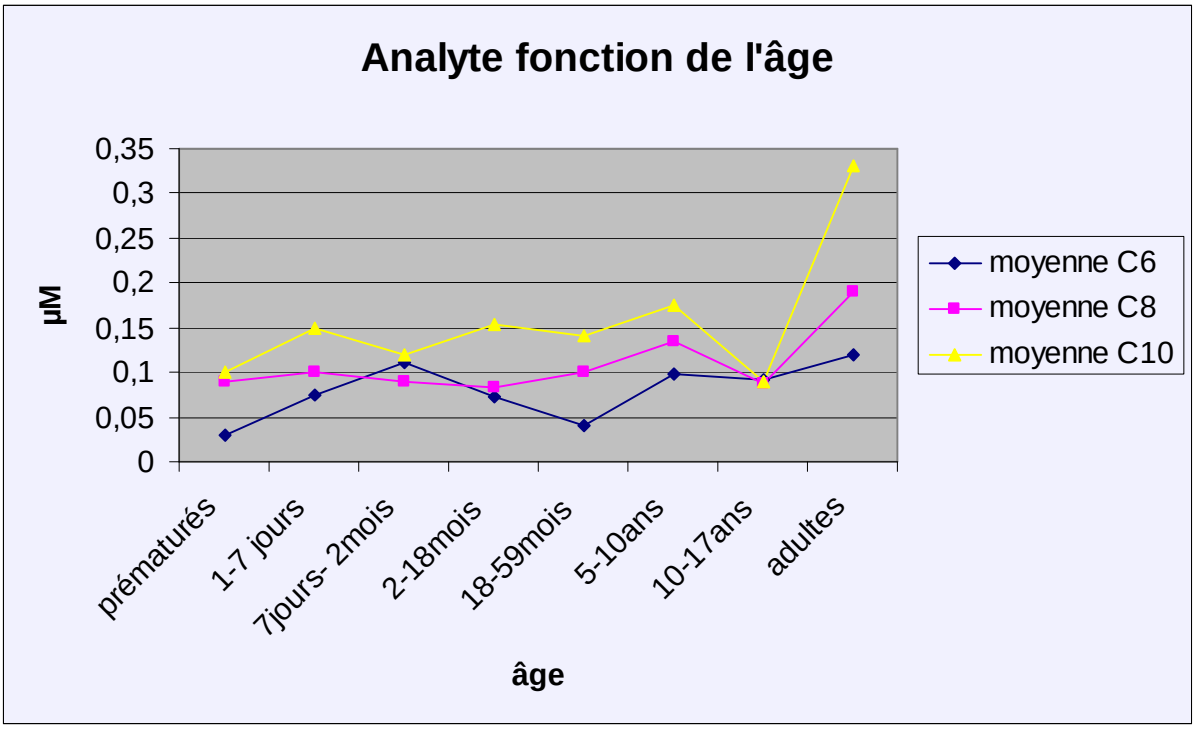


Figure 43: Evolution des concentrations en C6, C8 et C10 en fonction de l'âge.

Les AC à chaînes moyennes semblent assez comparables selon les tranches d'âge avec un point élévé pour le C10 adulte.

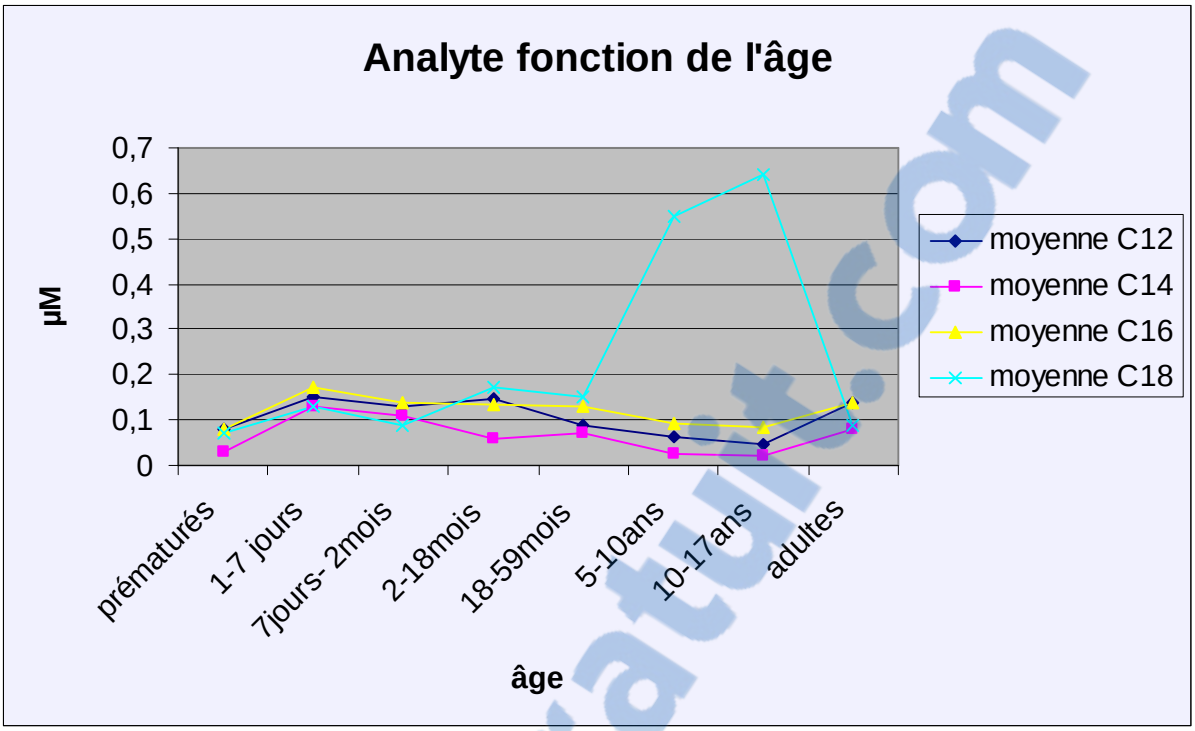


Figure 44: Evolution des concentrations en C12, C14, C16 et C18 en fonction de l'âge.

Les AC à longues chaînes semblent assez stables avec une courbe inhomogène pour le C18.

Rapport-Gratuit.com

Chapitre 4 Discussion

4.1 Particularités et principales difficultés des analytes à doser

4.1.1 Molécules très hétérogènes

Les acylcarnitines sont des molécules très hétérogènes sur le plan de leur polarité. C'est la longueur de leur chaîne carbonée qui détermine cette polarité. De ce fait, plusieurs étapes dans leur dosage sont délicates :

*la manipulation des mélanges d'acylcarnitines en solution nécessite une agitation très fréquente lors de sa constitution et de son utilisation (préparation des solutions fille à partir de poudres et de la gamme)

*l'extraction des acylcarnitines dans les prélèvements plasmatiques doit convenir à toutes ces molécules

*la séparation chromatographique est difficile, les paramètres choisis doivent permettre l'élution de tous ces composés hétérogènes

Les acylcarnitines ne résument pas aux acylcarnitines saturés et les autres espèces ne sont pas disponibles en poudres.

4.1.2 Absence de gold standard

Il n'y a pas de technique de référence pour le dosage des acylcarnitines. En pratique, les AC sont le plus souvent analysés en FIA MS/MS, en mode precursor ion scan.

4.1.3 Absence de contrôles qualité

On ne dispose pas de contrôles de qualité internes (CQI) ni pour la carnitine ni pour les acylcarnitines. Un organisme de contrôle de la qualité externe existe (CQE ERNDIM) pour la carnitine plasmatique mais pas pour les acylcarnitines plasmatiques. Après avoir participé au programme de CQE, le laboratoire garde ces échantillons afin de les utiliser en tant que CQI. Les valeurs cibles sont les moyennes obtenues par les laboratoires participants.

4.1.4 Etalons internes choisis

Nous avons utilisé les étalons internes Herman Brinks. Cependant, nous ne disposions pas d'un étalon interne par composé analysé, ce que recommande la SFEIM (82) : le C6 est analysé sur le signal de l'étalon interne C5*, le C10 et le C12 sur l'étalon interne C8* et le C18 sur l'étalon interne C16*. Un autre fournisseur dispose d'étalons internes complémentaires (C6, C10, C12 et C18). Nous avons procédé à quelques essais de rajout de ces étalons internes mais nous avons finalement décidé de mettre d'abord au point la méthode sans les rajouter (prix élevé des poudres, lourdeur des pesées de poudre et de la préparation, rajout de transitions MRM dans la méthode…).

4.1.5 Axes d'amélioration

Le centre de référence des maladies métaboliques de Paris Necker utilise des CQI « maison » en effectuant divers ajouts dosés dans des plasmas pauvres en carnitine et acylcarnitines (patients hémodialysés). Il est possible d'obtenir différents niveaux de contrôles pour chaque acylcarnitine disponible (AC saturés). Ces contrôles nous permettraient de poursuivre la validation de méthode des acylcarnitines et de bénéficier des contrôles internes au sein des séries pour les acylcarnitines. C'est la prochaine étape qui devra être réalisée au laboratoire. Nous n'avons pas pu l'envisager pour ce travail. De même, l'ajout des étalons internes manquants devra aussi être travaillé.

4.2 Principales difficultés de la technique

4.2.1 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technologie de pointe qui nécessite une grande maîtrise. Le personnel doit être formé et entraîné. La MS est sujette à des variations analytiques parfois difficiles à identifier et à maîtriser : phénomène de suppression d'ionisation, effets matrice…

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

4.2.3 La gamme

La préparation des échantillons est manuelle. Elle nécessite la prise de petits volumes (20µL), et de solvants. Des dilutions interviennent. Les mesures doivent être très précises, surtout pour la préparation de la gamme.

La gamme ne subit pas d'extraction, elle est réalisée sur matrice aqueuse alors que la matrice des échantillons à doser est une matrice plasmatique. Ce choix s'explique par la présence endogène de carnitine et d'acylcarnitines dans le plasma qui rend l'ajout dosé difficile et par l'effet matrice non maîtrisable et différent en fonction du plasma utilisé. Certaines équipes de recherche ont cherché à substituer le plasma par une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) (79)(133)(124). Cependant, le BSA n'a pas permis d'obtenir une gamme linéaire pour le C6, le C10 et le C12. Cette équipe a alors décidé d'utiliser du plasma témoin sain pour ces trois composés, leur concentration endogène chez le sujet sain étant très faible (79). D'autres équipes ont utilisé une matrice aqueuse (134). L'équipe de L.Vernez (31) a comparé les gammes effectuées dans l'eau, le plasma dialysé (cut off de la membrane 6-8000 Da) et le BSA 4% . Les résultats pour la calibration dans l'eau étaient de 10 à 20% plus élevés que dans le plasma dialysé. Les résultats sur plasma dialysé et sur BSA étaient identiques. Il semble difficile en pratique de dialyser les plasmas qui serviront pour la gamme. Cependant, la méthode pourrait être développée et testée avec une gamme sur BSA.

4.2.4 La chromatographie

Nous avons testé la méthode avant l'utilisation de l'HPLC sur un autre spectromètre de masse du laboratoire (API 3000). Les résultats montraient une intégration très difficile des pics : l'intégration automatique était aléatoire, les pics étaient larges, mal définis et nécessitaient une intégration manuelle fastidieuse et peu reproductible. Ces constatations nous ont amené à mettre au point une méthode comportant une étape de séparation chromatographique. Après avoir testé différents types de colonnes (2 colonnes C18 en phase inverse, une colonne HILIC), nous avons choisi une colonne en phase inverse C18 avec des paramètres permettant d'éluer au mieux les 12 acylcarnitines choisis. Comme nous l'avons vu dans la partie 2, la séquence d'élution comprend 100% de solvant aqueux puis 100% de solvant organique, ce qui permet une séparation satisfaisante des composés avec cette colonne (durée de vie: environ 500 analyses). La séparation préalable des molécules permet une intégration

automatiques des pics (gain de temps et meilleure reproductibilité) mais requiert un temps nettement plus long d'analyse (15 minutes au lieu de 3 minutes en FIA).

4.2.5 Suppression d'ionisation, effet matrice, saturation du signal

De nombreux phénomènes interviennent lors de l'ionisation des molécules dans la MS. Ainsi, certains composés présents dans le plasma peuvent modifier ou interférer avec cette ionisation. A l'opposé, le signal peut être saturé en cas de fortes concentrations en différents analytes: c'est le cas des points de gamme (la solution injectée comprend tous les acylcarnitines en concentration élevée) qui ont atteint 8.10^6 counts, seuil de saturation de l'analyseur. De ce fait, nous avons dû diluer les points de gamme au 1/10ème à la fin de la préparation.
En ce qui concerne un éventuel effet matrice, nous ne l'avons pas évalué.

4.3 Performances et limites de la méthode

Les limites de détection et de quantification de la carnitine et des acylcarnitines sont satisfaisantes par rapport aux domaines de valeurs physiologiques et pathologiques de ces molécules.
La limite supérieure de linéarité du C0 (60µM) correspond à une limite haute des valeurs physiologiques. Tout résultat supérieur à cette limite devra être dilué au 1/5ème.
Pour les acylcarnitines, les LSL sont inconnues. Il a été convenu de diluer au 1/10ème tous les échantillons ayant une valeur élevée de carnitine libre (100 µmol) pour éviter les phénomènes de suppression ionique (au niveau de la source) induits par un fort taux de CO. Une étude de la LSL devra être effectuée pour les acylcarnitines grâce à la méthode des ajouts dosés.
La répétabilité et la fidélité intermédiaire du CO sont comparables entre elles en fonction du niveau de concentration. Pour le niveau bas, le CV est autour de 24%. Il faut noter que ce point est dilué au 10ème, ce qui peut participer à l'augmentation du CV. Le CV du niveau intermédiaire à 11% dans les deux études de fidélité. Il correspond au niveau de carnitine qui sera plutôt normal haut d'après l'estimation de nos valeurs physiologiques. Le CV du point haut est autour de 12%. Pour les acylcarnitines, l'essai de répétabilité montre globalement des CV inférieurs à l'essai de FI. Nous pouvons expliquer cette tendance par la variabilité inter et intra-individuelle des gammes d'étalonnage, point très délicat de la méthode (dilutions, prises

de solvants…) et par la variabilité intrinsèque de la méthode spectrométrique. En FI, ces CV varient de 14% pour le C6 à 48% pour le C4. Globalement, ils sont autour de 20% pour la majorité des acylcarnitines.
L'estimation de l'incertitude de mesure du CO est plus grande pour les valeurs faibles : 47% versus 22% pour les valeurs intermédiaires et 25% pour les valeurs hautes. Le biologiste doit donc garder en mémoire ces différentes incertitudes (CV de la méthode, incertitudes de mesures…) dans son interprétation des dossiers et lors de la discussion avec le clinicien (diagnostic positif, exclusion d'un diagnostic, prélèvement de contrôle…).
La technique a un faible taux de contamination (0.22%) que l'on peut considérer comme négligeable.

4.4 Stabilité des acylcarnitines

Concernant la stabilité de la carnitine et des acylcarnitines dans le plasma à +4°C (à J0, J3 et J7), il semble que tous les composés soient stables (CV calculés inférieurs aux CV de la méthode) sauf pour le C2 dont le taux augmente avec le temps. Il est nécessaire de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'échantillons.
Cette augmentation du C2 pourrait être expliquée par la production d'acétylCoA et d'acylcarnitines, par les globules blancs par exemple.

4.5 Estimation des valeurs de référence biologique

4.5.1 Discussion générale

Une étude de Cavedon and al. visant à définir l'impact de l'âge et du sexe sur les taux de carnitine et d'acylcarnitines a été réalisée en Belgique entre 2001 et 2003 en 2005 sur 433 échantillons de sang total (buvards) d'individus sains. Le but était de savoir si l'utilisation des normes de nouveaux-nés âgés de 3 à 6 jours avait un impact sur le diagnostic de MHM chez des individus plus âgés. Les résultats ont montré qu'il y avait peu de différences liées au sexe mais une variation statistiquement significative des taux fonction de l'âge, qui restait cependant trop modeste pour avoir un impact majeur sur la plupart des MHM. La connaissance de ces variations pouvait être utile dans de rares cas où les anomalies étaient très discrètes, à la limite du seuil de décision médicale (132). D'autres études ont démontré que les

valeurs de la carnitine libre et des AC étaient plus élevées dans le sang total que sur plasma (135)(136) à cause des AC à longues chaînes de la membrane des érythrocytes. Il est probable que le schéma de variations dans le plasma soit le même que sur sang total mais cela nécessite confirmation sur d'importantes cohortes (132).

Nous avons utilisé ces groupes d'âge en les modifiant légèrement. Ils sont justifiés de la façon suivante :

- groupe 1 : nouveaux-nés prématurés : faible poids de naissance
- groupe 2 : nouveaux-nés à terme 1-7 jours (remplace le groupe contrôle 3-6 jours (période du Guthrie) : début de l'alimentation lactée, adaptation à la vie extra-utérine
- groupe 3 : nourrissons à terme 7 jours-2 mois : alimentation lactée exclusive
- groupe 4 : nourrissons à terme 2 mois-18 mois : diversification alimentaire, réduction du nombre de repas, allongement de la période de jeûne nocturne.
- groupe 5 : enfants de 18 mois à 5 ans : âge préscolaire
- groupe 6 : enfants de 5 à 10 ans : âge scolaire
- groupe 7 : enfants de 10 à 17 ans : adolescence
- groupe 8 : adultes à partir de 18 ans

L'âge de la diversification alimentaire en France est plutôt situé entre 4 et 6 mois et l'entrée dans l'âge scolaire est plutôt aux alentours de 3-4ans.

Le faible nombre d'échantillons étudiés ne nous permet pas d'obtenir de valeurs physiologiques mais il nous permet de vérifier et comparer les valeurs dont nous. Concernant le choix des tranches d'âge, nous avons suivi la publication belge (avec de minimes modifications) mais il serait utile de les adapter et de les comparer aux habitus français décrits ci-dessus dans une étude de plus grande envergure. De plus, nous ne pouvons pas totalement comparer nos valeurs à cette étude réalisée sur sang total. Nous pouvons comparer les tendances mais nous devons aussi comparer nos résultas aux autres valeurs de référence obtenues sur plasma, en gardant à l'esprit les différences de techniques.

Nous avons décidé de calculer les AC totaux ainsi que les ratios AC/CO mais les AC totaux sont en réalité incomplets étant donné que nous n'avons quantifié qu'une partie des AC. Cependant, ces AC que nous avons quantifiés représentent la près de 90% des AC totaux réels.

Les témoins pédiatriques ne présentent pas les critères d'exclusion définis mais ces patients ont consulté au CHU (urgences, consultations spécialisées) ou ont été hospitalisés. Nous connaissons les motifs de leur hospitalisation (dossier commun patient informatisé), la bronchiolite étant la cause la plus fréquente d'hospitalisation chez les nourrissons de l'étude. Pour une plus grande maîtrise et rigueur d'inclusion, il faudrait proposer des questionnaires ciblés aux parents (antibiotiques, alimentation, pathologie chronique…).
Nous avons exclu certains patients en cours d'étude car les valeurs retrouvées étaient aberrantes (part d'hémodilution, phase pré-analytique non totalement maîtrisée…) d'où le faible recrutement au final.
Il serait intéressant d'étudier les valeurs physiologiques sur sang de cordon dans le cadre d'un éventuel dépistage néonatal.
D'après les résultats de D.Rabier, il semble que le taux de carnitine augmente dès le début de la deuxième semaine de vie (à partir du 8ème jour) pour atteindre un taux proche de l'adulte à partir d'un an. Ces résultats ne concordent pas avec d'autres études (voir chapitre sur la régulation de la carnitine dans la partie 1).

Concernant les résultats des prématurés, nous ne disposons pas de valeurs de référence. Il a été rapporté une relation entre le poids de naissance et le taux de carnitine (cf partie 1) mais nous n'avons pas retrouvé cette relation dans notre étude (réflexion basée sur l'observation des résultats des prématurés, dont nous avions le poids de naissance, en annexe).
Les témoins adultes sont des individus sains, de 23 à 42 ans: 9 femmes et 5 hommes. Nous ne les avons pas différenciés fonction du sexe mais il semblerait que le sexe influe sur le taux de carnitine, les hommes ayant globalement des taux plus élevés de carnitine que les femmes dans notre étude. L'étude belge avait montré que les seuls les taux de C14, C16 et C18:1 comportaient des variations (non précisées) liées au sexe. Il serait aussi intéressant, sur une plus grande cohorte et à l'aide d'un questionnaire d'étudier l'influence de certains paramètres sur le taux de la carnitine et des acylcarnitines : sexe, tabagisme, index de masse corporel (IMC)…

4.5.2 Comparaison des résultats par rapport aux valeurs "normales" disponibles dans la littérature

De manière générale, les valeurs de carnitine totale, CO, C2 et acylcarnitines totaux sont dans la fouchette basse par rapport aux valeurs de la littérature. Les valeurs minimales et le 5ème

percentile sont mêmes parfois en dessous la limite inférieure la plus basse retrouvée dans cette littérature. En revanche, pour d'autres acylcarnitines, c'est le contraire avec souvent une moyenne qui reste dans les intervalles de la littérature mais parfois aussi très au dessus des "normales" comme:

-le C18, qui est augmenté de manière très importante pour les 5-17ans (avec une "tendance" haute pour les autres tranches d'âge)

-le C3, qui est augmenté chez les prématurés, 2-18 mois et 18-59 mois

Bien entendu, nous ne disposons pas de valeurs de référence de comparaison pour certaines tranches d'âges.

Voici la comparaison détaillée de quelques valeurs **adultes** avec les valeurs de la littérature:

*C0 : 18-**33** µM pour notre étude versus environ 20 à **47-60** µM pour les autres : notre limite haute (95ème percentile) est sans doute sous-estimée dans notre population, ce qui pourrait être expliqué par un recrutement prédominant de femmes. Cette constatation du CO abaissé ne se confirme pas sur les résultats des CQE: le C0 n'est pas "abaissé".

*C2 : 2.5-**6** µM pour notre étude versus 3-**13** µM

*C4 : 0.18-**0.75** µM pour notre étude versus 0.07-**0.5** µM : notre limite supérieure est plus élevée mais cet acylcarnitines est un des plus difficile à doser en raison de ses propriétés physico-chimiques (à la limite entre le comportement hydrophile et hydrophobe).

*C10 : 0.13-**0.81** µM pour notre étude versus 0.04-**0.3** µM

*C12: **0.05-0.27** µM pour notre étude versus **0.04-0.14** µM

Concernant les acylcarnitines (>C0), les limites inférieures sont moins sujettes à discussion car c'est leur augmentation qui est pathologique, signant une accumulation anormale.

4.5.3 Comparaison des résultats entre les différentes tranches d'âge

Il faut bien sûr prendre en compte la faible puissance statistique de notre étude. Il ne s'agit que de tendances qui restent à confirmer sur une plus large population.

Globalement, les tendances décrites précédemment dans les résultats sont les suivantes:

-Concentrations en CT et CO semblant augmenter un peu entre 2-18mois et 18-59 mois.

-Evolution assez stable des concentrations en AC totaux, C2, C4, C5, C6, C8, C10 (avec C10 adulte augmentant mais à confirmer).

-Evolution stable du ratio AC/CO.

-Evolution inhomogène du C3 avec pic chez les prématurés et 18-59 mois.

Les différences les plus notables en fonction de l'âge semblent concerner CT, C0 et C3 avec des concentrations un peu plus élevées chez les 2-18 mois et 18-59 mois. Dans l'étude de Cavedon and al. (132), le C0 est plus élevé chez les 2-18 mois et le C3 plus élevé sur sang de cordon et dans les groupes 2-18mois et 19-59mois. Le C10 n'est pas augmenté dans le groupe adulte. Ces résultats incitent à entamer une nouvelle étude afin de vérifier si ces tendances se confirment.

4.6 Principes d'interprétation

L'objectif de la mise en place d'une méthode quantitative basée sur une gamme d'étalonnage externe est l'obtention de valeurs chiffrées fiables, précises et reproductibles. Cependant, pour améliorer le diagnostic de ces pathologies, l'interprétation de ces valeurs doit suivre un schéma rigoureux. L'American College of Metabolic Genetics a émis quelques recommandations (81). Elles sont destinées au profil des acylcarnitines mais on peut les transposer au dosage quantitatif de ces molécules.

1) interprétation des résultats par un spécialiste qualifié
2) augmentation d'un ou plusieurs acylcarnitines basée sur la comparaison avec des bornes de référence établies selon l'âge et dont la pertinence a été vérifiée au laboratoire
3) l'interprétation est basée sur des schémas de reconnaissance et des corrélations entre les différents résultats de l'analyse, l'interprétation tient compte d'un faisceau d'arguments
4) Le diagnostic différentiel concernant les espèces ayant potentiellement des isomères (C4, C5, C5-OH, C5-DC) est critique et on ne pas statuer dessus (96).
5) Le schéma basique des marqueurs primaires/principaux associés à chaque pathologie doit être utilisé.
6) En plus des marqueurs primaires, l'utilisation des ratios est importante pour l'interprétation de résultats anormaux (exemple : ratio C8/C10 pour le déficit en MCAD).
7) Dans certains cas, l'analyse des l'analyse des acylcarnitines ne permet pas de mettre en évidence d'anomalies alors que la pathologie est présente (faux négatifs). Il faut

prendre en compte que l'accumulation d'acylcarnitines est le reflet de l'activité résiduelle d'enzymes défectueuses, de la quantité de carnitine (et précurseurs) apportée par l'alimentation et du statut anabolisme/catabolisme du patient.

8) En cas d'anomalies modestes, il faut se référer au niveau de carnitine du patient, un déficit en carnitine pouvant impacter l'analyse des résultats. Par exemple, l'accumulation d'un ou plusieurs acylcarnitines peut être provisoirement compensée par la carnitine qui détoxifie la cellule de ces acylcarnitines : la carnitine est donc abaissée et les acylcarnitines incriminés sont normaux ou légèrement élevés.
9) Certains médicaments (acide valproïque, acide pivalique, céfotaxime…) peuvent entraîner une augmentation d'un ou plusieurs acylcarnitines (137) (69)
10) D'autres composés exogènes (métabolites de certains médicaments, additifs alimentaires, solutés intraveineux contenant du dextrose) peuvent produire des espèces dont le rapport m/z est très proche des acylcarnitines d'intérêt diagnostic au risque de les masquer *(en mode precursor ion scan, dans le cadre du profil).*
11) Des artéfacts dus à l'alimentation sont aussi possibles. Ils sont souvent liés à des régimes particuliers (huiles enrichies en triglycérides à chaînes moyennes, régime cétogène : à très faible teneur en glucides) (138).

4.7 Perspectives

Il est indispensable de compléter la méthode en l'élargissant aux acylcarnitines « complexes ». Restent aussi les difficultés de séparation des isomères.

Les seuils de détection et de quantification de la méthode doivent permettre une meilleure discrimination en cas de valeurs à la limite des seuils pathologiques mais aussi pour un fin suivi des traitements.

Il semblerait important de pouvoir évaluer ce que cette technique apportera dans la pratique médicale par rapport à l'ancienne. Y aura-t-il plus de pathologies diagnostiquées grâce à cette technique ou à l'adaptation des référentiels des valeurs physiologiques ? Quel sera l'impact clinique s'il y en a un ?

Les valeurs de référence biologiques devront être confirmées sur un effectif de population significatif.

Des axes de recherche existent quant à une potentielle relation entre carnitine, acylcarnitines et pathologies métaboliques « acquises» comme le diabète de type 2 et l'obésité. Il y a aussi

Rapport-Gratuit.com

des études en rapport avec l'autisme et les maladies neurodégénératives. Au-delà de l'exercice de routine, notre technique pourrait être développée afin d'être utilisée pour la recherche.

Conclusion

Les anomalies du métabolisme des acides gras sont des pathologies complexes. Les cliniciens sont de plus en plus sensibilisés à leur diagnostic et les laboratoires tentent de progresser afin de proposer des examens fiables, reproductibles, précis et rapides. Nous avons mis au point une méthode comportant une étape de séparation chromatographique avant l'analyse spectrométrique. Cette méthode comporte des points positifs (bonne séparation des pics chromatographiques, intégration automatique de ces pics, seuils de détection et de quantification bas…) mais aussi des points négatifs qui devront être travaillés (extension de la méthode à d'autres acylcarnitines, amélioration de la gamme…). L'estimation des valeurs de référence biologiques que nous avons initiée nous incite à poursuivre le recrutement et à obtenir des informations cliniques pertinentes afin de répondre à certaines questions : quelle est la relation exacte entre poids de naissance et taux de carnitine ? Quelle est l'évolution des concentrations des différents acylcarnitines en fonction de l'âge ? Quelle est l'influence réelle du sexe sur les valeurs ? Peut-on identifier d'autres facteurs influençant significativement ces valeurs « physiologiques » ? Des paramètres tels que l'influence de l'hémolyse ou la stabilité des acylcarntines plasmatiques nécessitent aussi d'autres investigations. De plus, avec les exigences actuelles de l'accréditation, il semble primordial que nous puissions disposer de contrôles qualités internes "industriels". Ces méthodes hyper spécialisées et complexes, comportant une partie manuelle importante ainsi qu'un traitement de données en partie manuel lui aussi, sont accréditables en portée B mais elles nécessiteront un travail long et majeur afin de parvenir à ces exigences.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Références bibliographiques

1. Ricquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. MS Médecine Sci. 2005;21(5):512‑6.

2. De Lonlay P, Djouadi F, Bonnefont JP, Saudubray JM, Bastin J. La β-oxydation mitochondriale des acides gras: une voie métabolique essentielle du fonctionnement musculaire. Arch Pédiatrie. 2002;9:175‑8.

3. Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An overview of beta-oxidation disorders. Postępy Hig Med Dośw Online. 2009;63:266‑77.

4. Bieber LL. Carnitine. Annu Rev Biochem. 1988;57:261‑83.

5. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: role in brain. Prog Lipid Res. 2010;49(1):61‑75.

6. Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β-oxidation. J Inherit Metab Dis. oct 2010;33(5):469‑77.

7. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. Eur J Biochem FEBS. 15 févr 1997;244(1):1‑14.

8. Peng M, Fang X, Huang Y, Cai Y, Liang C, Lin R, et al. Separation and identification of underivatized plasma acylcarnitine isomers using liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the differential diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects. J Chromatogr A. déc 2013;1319:97‑106.

9. DiMauro S, DiMauro PM. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. Science. 20 nov 1973;182(4115):929‑31.

10. Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Hall CL, Corkey BE, Yang W, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. Pediatr Res. nov 1983;17(11):877‑84.

11. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. [Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments]. Ann Biol Clin (Paris). juin 2004;62(3):269‑77.

12. Pandor A, Eastham J, Beverley C, Chilcott J, Paisley S. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. Health Technol Assess Winch Engl. mars 2004;8(12):iii, 1‑121.

13. HAS. Evaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par la tchnique de spectrométrie de masse en tandem en population générale en France. 1er volet: dépistage du déficit en MCAD. [Internet]. 2011

[cité 11 févr 2014]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-07/synthese_depistage_neonatal_vf.pdf

14. De Jesús VR, Chace DH, Lim TH, Mei JV, Hannon WH. Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2 mai 2010;411(9-10):684‑9.

15. COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale SH GTA 04. 2011.

16. FDA. Guidance for industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001. Disponible sur: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf

17. Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FGS, et al. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. Obes Silver Spring Md. sept 2010;18(9):1695‑700.

18. GULEWITCH, KRIMBERG. Zur Kenntnis der Extraktionsstoffe der Muskeln. 2.Mitteilung über das Carnitin. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem. 1905;45:326‑30.

19. Tomita M, Sendju Y. Uber die Oxyaminverbindungen welche die Biuret Reaktionen zeigen. III. Spaltung der γ -amino-ß-oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponente. Physiol Chem. 169:263‑77.

20. Carter AL, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. J Child Neurol. nov 1995;10 Suppl 2:S3‑7.

21. Engel AG, Angelini C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome. Science. 2 mars 1973;179(4076):899‑902.

22. Engel AG, Rebouche CJ. Carnitine metabolism and inborn errors. J Inherit Metab Dis. 1984;7 Suppl 1:38‑43.

23. Hoppel, C. Determination of carnitine. in: Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. Ed. F.Hommes (Wilez-liss, New York) p.309-26.

24. Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. Mol Aspects Med. déc 2004;25(5-6):455‑73.

25. Rebouche CJ, Engel AG. Kinetic compartmental analysis of carnitine metabolism in the human carnitine deficiency syndromes. Evidence for alterations in tissue carnitine transport. J Clin Invest. mars 1984;73(3):857‑67.

26. Lombard KA, Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ. Carnitine status of lactoovovegetarians and strict vegetarian adults and children. Am J Clin Nutr. août 1989;50(2):301‑6.

27. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. FASEB J. 12 janv 1992;6(15):3379‑86.

28. Kleber HP. Bacterial carnitine metabolism. FEMS Microbiol Lett. 1 févr 1997;147(1):1‑9.

29. Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem J. 1 févr 2002;361(Pt 3):417‑29.

30. Nelson PJ, Pruitt RE, Henderson LL, Jenness R, Henderson LM. Effect of ascorbic acid deficiency on the in vivo synthesis of carnitine. Biochim Biophys Acta. 7 janv 1981;672(1):123‑7.

31. L.Vernez. Analysis of carnitine and acylcarnitines in biological fluids and application to a clinical study [Internet]. 2005. Disponible sur: http://edoc.unibas.ch/320/1/DissB_7322.pdf

32. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. Nutr Metab. 16 avr 2010;7(1):30.

33. FRIEDMAN S, FRAENKEL G. Reversible enzymatic acetylation of carnitine. Arch Biochem Biophys. déc 1955;59(2):491‑501.

34. Fritz I. The Effects of‘ Muscle ExtractrJ on the Oxidation of Pnlmitic Acid by Liver Slices and Homogenates1. Acta Physiol Scand. 1 déc 1955;34(4):367‑85.

35. Pande SV. A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. Proc Natl Acad Sci U S A. mars 1975;72(3):883‑7.

36. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. Physiol Rev. oct 1983;63(4):1420‑80.

37. Miyazawa S, Ozasa H, Osumi T, Hashimoto T. Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver. J Biochem (Tokyo). août 1983;94(2):529‑42.

38. Edwards YH, Chase JFA, Edwards MR, Tubbs PK. Carnitine Acetyltransferase: the Question of Multiple Forms. Eur J Biochem. 1 juill 1974;46(1):209‑15.

39. Brass EP, Hoppel CL. Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo. Biochem J. 15 sept 1980;190(3):495‑504.

40. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. Am J Kidney Dis. avr 2003;41, Supplement 4:S4‑12.

41. Arrigoni-Martelli E, Caso V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. Drugs Exp Clin Res. 2001;27(1):27‑49.

42. Melegh B, Pap M, Bock I, Rebouche CJ. Relationship of carnitine and carnitine precursors lysine, epsilon-N-trimethyllysine, and gamma-butyrobetaine in drug-induced carnitine depletion. Pediatr Res. oct 1993;34(4):460‑4.

43. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. Cell Metab. janv 2008;7(1):45‑56.

44. Mynatt RL. Carnitine and type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. sept 2009;25 Suppl 1:S45‑9.

45. Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, et al. Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid β-Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women. J Nutr. juin 2009;139(6):1073‑81.

46. Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O, et al. Carnitine Insufficiency Caused by Aging and Overnutrition Compromises Mitochondrial Performance and Metabolic Control. J Biol Chem. 21 août 2009;284(34):22840‑52.

47. Bieber LL, Krahling JB, Clarke PR, Valkner KJ, Tolbert NE. Carnitine acyltransferases in rat liver peroxisomes. Arch Biochem Biophys. 15 oct 1981;211(2):599‑604.

48. I B Fritz EA-M. Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system: interactions with membranes. Trends Pharmacol Sci. 1993;14(10):355‑60.

49. Arduini A, Mancinelli G, Radatti GL, Dottori S, Molajoni F, Ramsay RR. Role of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocytes. J Biol Chem. 25 juin 1992;267(18):12673‑81.

50. Rebouche CJ, Lombard KA, Chenard CA. Renal adaptation to dietary carnitine in humans. Am J Clin Nutr. 11 janv 1993;58(5):660‑5.

51. Cederblad G, Fåhraeus L, Lindgren K. Plasma carnitine and renal-carnitine clearance during pregnancy. Am J Clin Nutr. 9 janv 1986;44(3):379‑83.

52. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. Annu Rev Nutr. 1998;18:39‑61.

53. Borum PR. Possible Carnitine Requirement of the Newborn and the Effect of Genetic Disease on the Carnitine Requirement. Nutr Rev. 1 nov 1981;39(11):385‑90.

54. Georges B, Le Borgne F, Galland S, Isoir M, Ecosse D, Grand-Jean F, et al. Carnitine transport into muscular cells. inhibition of transport and cell growth by mildronate. Biochem Pharmacol. 1 juin 2000;59(11):1357‑63.

55. Xuan W, Lamhonwah A-M, Librach C, Jarvi K, Tein I. Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. Biochem Biophys Res Commun. 20 juin 2003;306(1):121‑8.

56. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, et al. Molecular and Functional Identification of Sodium Ion-dependent, High Affinity Human Carnitine Transporter OCTN2. J Biol Chem. 8 juill 1998;273(32):20378‑82.

57. Brooks H. Der Carnitin-Transporter OCTN2: wie wichtig ist er fu̇r den Carnitin-Transport? [S.l.]: [s.n.]; 2002.

58. Taylor PM. Absorbing competition for carnitine. J Physiol. 15 avr 2001;532(Pt 2):283.

59. Genuth SM, Hoppel CL. Acute hormonal effects on carnitine metabolism in thin and obese subjects: Responses to somatostatin, glucagon, and insulin. Metabolism. avr 1981;30(4):393‑401.

60. Schmidt-Sommerfeld E, Werner D, Penn D. Carnitine plasma concentrations in 353 metabolically healthy children. Eur J Pediatr. 1 mai 1988;147(4):356‑60.

61. Buchta R, Nyhan WL, Broock R, Schragg P. Carnitine in adolescents. J Adolesc Health Off Publ Soc Adolesc Med. sept 1993;14(6):440‑1.

62. Cederblad G. Plasma carnitine and body composition. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 1 mars 1976;67(2):207‑12.

63. N Takiyama KM. Age-and sex-related differences of serum carnitine in a Japanese population. J Am Coll Nutr. 1998;17(1):71‑4.

64. Opalka JR, Gellerich F-N, Zierz S. Age and Sex Dependency of Carnitine Concentration in Human Serum and Skeletal Muscle. Clin Chem. 12 janv 2001;47(12):2150‑3.

65. Pons R, De Vivo DC. Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. J Child Neurol. nov 1995;10 Suppl 2:S8‑24.

66. Whitfield J, Smith T, Sollohub H, Sweetman L, Roe CR. Clinical effects of L-carnitine supplementation on apnea and growth in very low birth weight infants. Pediatrics. mars 2003;111(3):477‑82.

67. Bowyer BA, Fleming CR, Ilstrup D, Nelson J, Reek S, Burnes J. Plasma carnitine levels in patients receiving home parenteral nutrition. Am J Clin Nutr. janv 1986;43(1):85‑91.

68. Ringseis R, Hanisch N, Seliger G, Eder K. Low availability of carnitine precursors as a possible reason for the diminished plasma carnitine concentrations in pregnant women. BMC Pregnancy Childbirth. 25 avr 2010;10:17.

69. Silva MF, Selhorst J, Overmars H, van Gennip AH, Maya M, Wanders RJ, et al. Characterization of plasma acylcarnitines in patients under valproate monotherapy using ESI-MS/MS. Clin Biochem. nov 2001;34(8):635‑8.

70. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiter JPN, IJlst L, Duran M, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. J Inherit Metab Dis. 1 avr 2008;31(2):205‑16.

71. Scruggs ER, Dirks Naylor AJ. Mechanisms of zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy. Pharmacology. 2008;82(2):83‑8.

72. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. J Cell Physiol. mars 2000;182(3):339‑50.

73. L Van Noolen. Détermination du profil des acylcarnitines plasmatiques par spectrométrie de masse en tandem: développement de la technique et intérêt pour le diagnostic de maladies héréditaires du métabolisme [Internet]. 2011. Disponible sur: http://dumas.ccsd.cnrs.fr/docs/00/64/09/75/PDF/2011GRE17039_van_noolen_laetitia_1_D_.pdf

74. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. Annu Rev Physiol. 2002;64:477‑502.

75. Glycolyse, béta-oxydation et cycle de l'acide citrique. [Internet]. Disponible sur: www.ulysse.u-bordeaux.fr

76. Ketogenesis pathway [Internet]. Disponible sur: http://www.mitosciences.com/ketogenesis_pathway

77. Sim KG, Hammond J, Wilcken B. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid β-oxidation disorders. Clin Chim Acta. sept 2002;323(1–2):37‑58.

78. Mansour FR, Wei W, Danielson ND. Separation of carnitine and acylcarnitines in biological samples: a review. Biomed Chromatogr. 1 oct 2013;27(10):1339‑53.

79. Peng M, Liu L, Jiang M, Liang C, Zhao X, Cai Y, et al. Measurement of free carnitine and acylcarnitines in plasma by HILIC-ESI-MS/MS without derivatization. J Chromatogr B. août 2013;932:12‑8.

80. Kivilompolo M, Öhrnberg L, Orešič M, Hyötyläinen T. Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance–hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. mai 2013;1292:189‑94.

81. Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. Genet Med. févr 2008;10(2):151‑6.

82. SFEIM. Acylcarnitines, journées biologie et qualité [Internet]. 2013. Disponible sur: http://www.sfeim.org/IMG/pdf/Acylcarnitines_mise_a_jour_10-2013.pdf

83. Friedman S. Determination of carnitine in biological materials. Arch Biochem Biophys. mai 1958;75(1):24‑30.

84. Cederblad G, Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. mars 1972;37:235‑43.

85. Lowes S, Rose ME. Simple and unambiguous method for identifying urinary acylcarnitines using gas chromatography--mass spectrometry. The Analyst. mai 1990;115(5):511‑6.

86. Minkler PE, Ingalls ST, Hoppel CL. High-performance liquid chromatographic separation of acylcarnitines following derivatization with 4'-bromophenacyl trifluoromethanesulfonate. Anal Biochem. 15 févr 1990;185(1):29‑35.

87. Mardones C, Vizioli N, Carducci C, Rios A, Valcarcel M. Separation and determination of carnitine and acyl-carnitines by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Anal Chim Acta. 23 févr 1999;382(1):23‑31.

88. Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. Clin Chem. nov 2001;47(11):1945‑55.

89. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. Clin Chem. juill 1997;43(7):1129‑41.

90. Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem. nov 1997;43(11):2106‑13.

91. Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. Clin Chem. nov 2001;47(11):2040‑4.

92. De Sain-van der Velden MGM, Diekman EF, Jans JJ, van der Ham M, Prinsen BHCMT, Visser G, et al. Differences between acylcarnitine profiles in plasma and bloodspots. Mol Genet Metab. sept 2013;110(1-2):116‑21.

93. Daniel Rabier. Carnitine [Internet]. 2003 [cité 25 avr 2014]. Disponible sur: http://www.em-consulte.com/article/61050/carnitine

94. Ofman R, Ruiter JPN, Feenstra M, Duran M, Poll-The BT, Zschocke J, et al. 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency Is Caused by Mutations in the HADH2 Gene. Am J Hum Genet. mai 2003;72(5):1300‑7.

95. Dietzen DJ, Rinaldo P, Whitley RJ, Rhead WJ, Hannon WH, Garg UC, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry; executive summary. Clin Chem. 2009;55(9):1615‑26.

96. Sweetman L, Millington DS, Therrell BL, Hannon WH, Popovich B, Watson MS, et al. Naming and counting disorders (conditions) included in newborn screening panels. Pediatrics. mai 2006;117(5 Pt 2):S308‑14.

97. Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 15 mai 2006;142C(2):77‑85.

98. Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, TsuyoshiKayo, Wada Y, Nezu J, et al. Genetic Epidemiology of the Carnitine Transporter OCTN2 Gene in a Japanese Population and Phenotypic Characterization in Japanese Pedigrees with Primary Systemic Carnitine Deficiency. Hum Mol Genet. 11 janv 1999;8(12):2247‑54.

99. Scaglia F, Wang Y, Singh RH, Dembure PP, Pasquali M, Fernhoff PM, et al. Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. déc 1998;1(1):34‑9.

100. Tein I, De Vivo DC, Bierman F, Pulver P, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, et al. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. Pediatr Res. sept 1990;28(3):247‑55.

101. Bonnefont J-P, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. Mol Aspects Med. oct 2004;25(5–6):495‑520.

102. Leslie ND, Tinkle BT, Strauss AW, Shooner K, Zhang K. Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, Smith RJ, et al., éditeurs. GeneReviews(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 8 avr 2014]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6816/

103. Van Maldegem BT, Wanders RJA, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. J Inherit Metab Dis. oct 2010;33(5):507‑11.

104. Olpin SE. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. mars 2004;70(3):293‑308.

105. Ko HH, Yoshida E. Acute fatty liver of pregnancy. Can J Gastroenterol. janv 2006;20(1):25‑30.

106. Wanders RJA, Ruiter JPN, IJlst L, Waterham HR, Houten SM. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. J Inherit Metab Dis. oct 2010;33(5):479‑94.

107. Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. Semin Neonatol. févr 2002;7(1):65‑74.

108. Jane Gick. Les aciduries organiques: guide pour les patients, les parents et les familles. [Internet]. European registry and network for Intoxication type Metabolic Diseases; Disponible sur: www.e-imd.org

109. Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I – revised recommendations. J Inherit Metab Dis. 1 juin 2011;34(3):677‑94.

110. MamEA APHP. Prise en charge des détresses métaboliques aigues [Internet]. Disponible sur: portail-web.aphp.fr/mamea/IMG/doc/Urgence_Rea_MaMEA.doc

Rapport-Gratuit.com

111. Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. Clin Chem. 2001;47(7):1166‑82.

112. Rashed MS, Ozand PT, Bennett MJ, Barnard JJ, Govindaraju DR, Rinaldo P. Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. Clin Chem. août 1995;41(8 Pt 1):1109‑14.

113. Rinaldo P, Studinski AL, Matern D. Prenatal diagnosis of disorders of fatty acid transport and mitochondrial oxidation. Prenat Diagn. 1 janv 2001;21(1):52‑4.

114. Menet M-C. Principes de la spectrométrie de masse. Rev Francoph Lab. 2011;2011(437):41‑53.

115. Moussa F, Benoist J-F, Thioulouse E, Berthe M-C, Couderc R. Spectrométrie de masse et maladies métaboliques héréditaires. Rev Francoph Lab. 2011;2011(437):65‑72.

116. ABSciex. Présentation LC-MS, principes et applications.

117. www.absciex.com.

118. Hainque B, Baudin B, Lelièvre P. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Médecine-Sciences Flammarion; 2008.

119. Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage [Internet]. Disponible sur: http://www.doping.chuv.ch/

120. La chromatographie liquide [Internet]. Disponible sur: http://biochimej.univ-angers.fr

121. Jacob V. La chromatigraphie liquide haute performance [Internet]. 2010. Disponible sur: http://iut-tice.ujf-grenoble.fr

122. Marjorie Cesbron. Validation de méthode de l'homocystéine. 2014.

123. Chromatographie liquide haute performance [Internet]. Disponible sur: www.ac-nancy-metz.fr

124. Vernez L, Wenk M, Krähenbühl S. Determination of carnitine and acylcarnitines in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. 2004;18(11):1233‑8.

125. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:17‑45.

126. Ghoshal AK, Guo T, Soukhova N, Soldin SJ. Rapid measurement of plasma acylcarnitines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry without derivatization. Clin Chim Acta. août 2005;358(1–2):104‑12.

127. Vianey-Saban C. Acycarnitine profile: which method? Diagnostic value, pitfalls... San Diego (USA); 2009.

128. R. Talbot; N. Manning. A rough guide to acylcarnitines [Internet]. Disponible sur: www.fodsupport.org/documents/MetBio-Chromatogram

129. ERNDIM External Quality Assurance Scheme for Special Assays in Serum.

130. McHugh DMS, Cameron CA, Abdenur JE, Abdulrahman M, Adair O, Al Nuaimi SA, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. mars 2011;13(3):230‑54.

131. Belay B, Esteban-Cruciani N, Walsh CA, Kaskel FJ. The use of levo-carnitine in children with renal disease: a review and a call for future studies. Pediatr Nephrol Berl Ger. mars 2006;21(3):308‑17.

132. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. Clin Chem. avr 2005;51(4):745‑52.

133. Minkler PE, Stoll MSK, Ingalls ST, Yang S, Kerner J, Hoppel CL. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. Clin Chem. sept 2008;54(9):1451‑62.

134. Maeda Y, Ito T, Suzuki A, Kurono Y, Ueta A, Yokoi K, et al. Simultaneous quantification of acylcarnitine isomers containing dicarboxylic acylcarnitines in human serum and urine by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. 2007;21(5):799‑806.

135. Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, McMahon DJ, Tein I, Naylor EW, et al. Neonatal blood carnitine concentrations: normative data by electrospray tandem mass spectometry. Pediatr Res. mai 2003;53(5):823‑9.

136. Schoderbeck M, Auer B, Legenstein E, Genger H, Sevelda P, Salzer H, et al. Pregnancy-related changes of carnitine and acylcarnitine concentrations of plasma and erythrocytes. J Perinat Med. 1995;23(6):477‑85.

137. Abdenur JE, Chamoles NA, Guinle AE, Schenone AB, Fuertes AN. Diagnosis of isovaleric acidaemia by tandem mass spectrometry: false positive result due to pivaloylcarnitine in a newborn screening programme. J Inherit Metab Dis. août 1998;21(6):624‑30.

138. Iacobazzi V, Pasquali M, Singh R, Matern D, Rinaldo P, di San Filippo CA, et al. Response to therapy in carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency due to a novel missense mutation. Am J Med Genet A. 15 avr 2004;126A(2):150‑5.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Liste des Figures

Figure 1: La structure de la carnitine, formule développée
Figure 2: Biosynthèse de la carnitine à partir du TML
Figure 3: Etapes de la biosynthèse de la carnitine, structures chimiques des métabolites de cette biosynthèse
Figure 4: Synthèse et métabolisme de la carnitine
Figure 5: Schéma de l'activation des acides gras
Figure 6 : Rôle de la carnitine dans le transport oxydatif des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie et dans la régulation du ratio acyl-CoA/CoA intramitochondrial
Figure 7: La carnitine au milieu des différentes voies du métabolisme énergétique
Figure 8: Cycle de la ß oxydation des acides gras intra mitochondriale
Figure 9: Cycle de la ß oxydation des acides gras intra mitochondriale, schéma simplifié
Figure 10: Exemple de la ß oxydation de l'acide stéarique (C18)
Figure 11: Cycle de Krebs
Figure 12: Schéma de la cétogénèse
Figure 13: Structures de la carnitine et des acylcarnitines
Figure 14: Exemples d'acylcarnitines ayant des longueurs de chaînes carbonées différentes
Figure 15: Schéma récapitulatif des anomalies de l'oxydation des AG
Figure 16: Schéma de l'origine de quatre aciduries organiques
Figure 17: Diagramme des investigations réalisées en Australie devant un patient suspect de présenter un trouble de la ßOAG
Figure 18: Composants d'un spectromètre de masse
Figure 19: ESI, processus d'ionisation à pression atmosphérique
Figure 20: Schéma du principe d'un triple quadrupôle
Figure 21: Notions fondamentales sur le quadrupôle
Figure 22: Triple quadrupôle MS
Figure 23: Schématisation du mode MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Figure 24: Spectre de masse des ions fils
Figure 25: Spectre de masse des ions précurseurs
Figure 26: Schéma d'une trappe à ions
Figure 27: Spectromètre de masse Api 5500 Qtrap (ABSciex)
Figure 28: Domaines d'application de la chromatographie liquide

Figure 29: Principe de la chromatographie liquide
Figure 30: Pouvoir d’élution de la phase mobile en HPLC
Figure 31: Profil des acylcarnitines par spectrométrie de masse en tandem
Figure 32: Essai de chromatographie avec une colonne HILIC
Figure 33: Essai de chromatographie avec une colonne en phase inverse, courte, C18
Figure 34: Essai de chromatographie avec une colonne en phase inverse, longue, C18
Figure 35: Zoom sur les pics de C5 à C18, avec une colonne en phase inverse, longue, C18
Figure 36: Gamme d'étalonnage: valeurs et courbe pour le C0
Figure 37: Gamme d'étalonnage: valeurs et courbe pour le C12
Figure 38: Exemple d’intégration automatique d’un pic et de son étalon interne deutéré.
Figure 39: Représentation des étalons internes deutérés sur un profil
Figure 39: Etude de la LSL du C0
Figure 40: Evolution des concentrations en CT, CO, C2 et AC fonction de l'âge.
Figure 41: Evolution des concentrations en C3, C4, C5 en fonction de l'âge.
Figure 42: Evolution des concentrations en C6, C8 et C10 en fonction de l'âge.
Figure 43: Evolution des concentrations en C12, C14, C16 et C18 en fonction de l'âge.

Liste des tableaux

Tableau I: Contenu des aliments en carnitine
Tableau II: Acylcarnitines (1ère colonne) associés à leur abréviation (longueur de chaîne, 2éme colonne),
Tableau III: Nomenclature et structure chimique des acylcarnitines saturés
Tableau IV: Exemples de valeurs de référence biologiques adulte de la carnitine et de acylcarnitines
Tableau V: Concentrations plasmatiques en fonction de l'âge chez des individus sains sans distinction de sexe.
Tableau VI: Incidence des erreurs innées du métabolisme des acides aminés, des acides gras et des acides organiques aux Etats-Unis
Tableau VII: Nomenclature des pathologies métaboliques (1ére colonne) nécessitant une exploration des acylcarnitines
Tableau VIII: Orientation étiologiques vers les différentes voies métaboliques devant un patient suspect de pathologie métabolique en phase aigue
Tableau IX: Comparaison des techniques d'analyse des AC dans les centres de référence en France
Tableau X: Concentrations cibles de travail des étalons internes marqués, en micromolaire
Tableau XI: Préparation des solutions mère de standards non deutérés
Tableau XII: Préparation de la gamme
Tableau XIII: Consommation du tampon
Tableau XIV: Pump time table

Tableau XV: Essais de répétabilité pour le CO à trois niveaux de concentration différents
Tableau XVI: Répétabilité des acylcarnitines
Tableau XVII: Fidélité intermédiaire du CO
Tableau XVIII: Fidélité intermédiaire des acylacrnitines
Tableau XIX: Evaluation de la justesse du CO à trois concentrations différentes
Tableau XX: Domaines d'incertitudes de mesure pour le C0 (valeur +/-U) à trois niveaux de concentration différents
Tableau XXI: LOD et LOQ des acylcarnitines
Tableau XXII: Stabilité des acylcarnitines
Tableau XXIII: Etude de la contamination

Tableau XXIV: Recueil des témoins et moyenne d'âge
Tableau XXV: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez l'adulte, 9 femmes et 5 hommes, âgés de 23 à 42 ans
Tableau XXVI: Valeurs physiologiques des acylcarnitines plasmatiques chez 9 prématurés
Tableau XXVII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 3 nourrissons âgés de 1 à 7 jours
Tableau XXVIII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 7 nourrissons âgés de 7 jours à 2 mois
Tableau XXIX: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 11 nourrissons âgés de 2 à 18 mois
Tableau XXX: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 7 enfants âgés de 18 à 59 mois
Tableau XXXI: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 8 enfants âgés de 5 à 10 ans
Tableau XXXII: Valeurs des acylcarnitines plasmatiques chez 10 témoins âgés de 10 à 17 ans

Annexes

A. Détail de l'étude des témoins adultes

Adultes 9 femmes, 5 hommes moyenne d'âge: 27 ans

	TA1 F	TA2 M	TA3 F	TA4 M	TA5 M	TA6 F
CT	22,9	42,4	27,4	36,9	34,9	32,8
C0	19	35,4	19,9	30,8	29,2	28,4
C2	2,36	3,92	5,76	4,16	4,02	3,3
C3	0,236	0,444	0,247	0,651	0,362	0,401
C4	0,458	0,423	0,408	0,223	0,489	0,134
C5	0,0897	0,214	0,0866	0,0749	0,134	0,0433
C6	0,0927	0,173	0,125	0,116	0,0935	0,0929
C8	0,101	0,36	0,178	0,202	0,0941	0,103
C10	0,182	0,729	0,302	0,336	0,149	0,14
C12	0,126	0,259	0,168	0,0872	0,12	0,0273
C14	0,0807	0,119	0,0948	0,0274	0,08	0,0203
C16	0,122	0,231	0,131	0,119	0,133	0,0953
C18	0,0704	0,145	0,0718	0,0786	0,0882	0,0624
AC	3,9	7	7,5	6,1	5,7	4,4
AC/C0	0,21	0,20	0,38	0,20	0,20	0,15

moyenne CO femmes: 22µM
moyenne C0 hommes: 28,74µM

TA7 F	TA8 F	TA9 M	TA10 F	TA11 F	TA12 F	TA13 M
27,4	34,6	38,8	29,2	25,6	26,1	25,5
22,8	28,4	27,6	22,3	18,5	21,5	20,7
2,61	3,11	6,89	4,05	4,71	2,98	2,94
0,503	0,611	0,459	0,243	0,595	0,313	0,335
0,211	0,68		0,398	0,866	0,473	0,421
0,298	0,345	0,26	0,0779	0,146	0,117	0,107
0,142	0,181	0,219	0,129	0,0987	0,0839	0,0893
0,0658	0,23	0,418	0,454	0,107	0,0879	0,142
0,133	0,382	0,667	0,949	0,143	0,124	0,234
0,0675	0,0854	0,214	0,278	0,116	0,118	0,146
		0,103	0,103	0,0823	0,078	0,0957
		0,165	0,13	0,137	0,112	0,179
		0,112	0,09	0,0697	0,074	0,129
4.6	6.2	11,2	6,9	7,1	4,6	4,8
0.2	0.22	0,41	0,31	0,38	0,21	0,23

TA 14 F	Moyenne	Médiane	Ecart type	mini	maxi	5è percentile	95è percentile	
22	30,46	28,30	6,28	22	42,4	22,59	40,06	CT
17,5	24,43	22,55	5,46	17,5	35,5	18,15	32,41	C0
2,92	3,84	3,61	1,27	2,36	6,89	2,52	6,16	C2
0,235	0,40	0,38	0,15	0,235	0,651	0,24	0,63	C3
0,54	0,44	0,42	0,19	0,134	0,866	0,18	0,75	C4
0,1	0,15	0,11	0,09	0,0433	0,345	0,06	0,31	C5
0,0829	0,12	0,11	0,04	0,0829	0,219	0,08	0,19	C6

0,097	0,19	0,12	0,13	0,0658	0,454	0,08	0,43	C8
0,136	0,33	0,21	0,27	0,133	0,949	0,13	0,81	C10
0,114	0,14	0,12	0,07	0,0273	0,259	0,05	0,27	C12
0,0777	0,08	0,08	0,04	0,0203	0,119	0,02	0,11	C14
0,109	0,14	0,13	0,05	0,0953	0,231	0,10	0,20	C16
0,0613	0,09	0,08	0,03	0,0613	0,145	0,06	0,14	C18
4,5	6,036	5.9	1.9	3,9	11,2	4.23	8.8	AC
0,26	0,25	0.22	0.08	0,15	0,4	0.18	0.39	AC/C0

B. Détail de l'étude des témoins prématurés (9)

préma (9)

	AC	AC/C	CT	C0	C2	C3	C4	C5	C6
T63 PN=2300g	2,57	0,33	10,40	7,83	1,09	0,92	0,07	0,11	0,01
T80 PN=770g	4,72	0,78	10,80	6,08	2,36	1,58	0,10	0,09	0,02
T90 PN=2250g	6,10	0,35	23,70	17,60	3,28	1,92	0,20	0,22	0,02
T91 PN=2310g	4,40	0,39	15,60	11,20	2,70	0,52	0,14	0,08	0,03
T62 PN=750g	1,88	0,23	10,20	8,32	0,63	0,65	0,13	0,11	0,00
T104 PN=1710g	3,60	0,21	21,10	17,50	2,88	0,43	0,01	0,04	0,01
T111 PN=2100g	4,70	0,14	39,00	34,30	2,97	0,96	0,26	0,18	0,05
T112 PN=1785g	5,10	0,17	35,90	30,80	3,46	0,63	0,28	0,28	0,05
T113 PN=1480g	3,89	0,11	39,39	35,50	2,85	0,49	0,13	0,14	0,03
moyenne	4,11	0,30	22,90	18,79	2,47	0,90	0,14	0,14	0,03
médiane	4,40	0,23	21,10	17,50	2,85	0,65	0,13	0,11	0,02
écart-type	1,294	0,204	12,355	11,811	0,971	0,522	0,089	0,074	0,018
valeur min	1,88	0,11	10,2	6,08	0,63	0,43	0,01	0,04	0
valeur max	6,1	0,78	39,39	35,5	3,46	1,92	0,28	0,28	0,05
5ème percentile	2,16	0,12	10,28	6,78	0,82	0,45	0,03	0,057	0,005
95ème percentile	5,7	0,62	39,2	35	3,39	1,78	0,27	0,25	0,05

C8	C10	C12	C14	C16	C18	
0,07	0,06	0,06	0,03	0,10	0,10	T63 PN=2300g
0,13	0,13	0,10	0,05	0,09	0,09	T80 PN=770g
0,08	0,08	0,09	0,03	0,07	0,09	T90 PN=2250g
0,15	0,22	0,14	0,06	0,22	0,13	T91 PN=2310g
0,05	0,05	0,07	0,03	0,09	0,11	T62 PN=750g
0,06	0,08	0,03	0,00	0,04	0,02	T104 PN=1710g
0,07	0,08	0,08	0,01	0,04	0,02	T111 PN=2100g
0,10	0,11	0,10	0,01	0,04	0,02	T112 PN=1785g
0,09	0,06	0,03	< 0	0,04	0,02	T113 PN=1480g
0,09	0,10	0,08	0,03	0,08	0,07	moyenne
0,08	0,08	0,08	0,03	0,07	0,09	médiane
0,032	0,053	0,034	0,023	0,057	0,045	écart-type
0,05	0,05	0,03	0	0,04	0,02	valeur min
0,15	0,13	0,14	0,06	0,22	0,13	valeur max
0,06	0,06	0,031	0,002	0,039	0,018	5ème percentile
0,14	0,18	0,12	0,06	0,17	0,12	95ème percentile

C. Détail des témoins de 0-7jours (3)

0-7jours

	CT	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8
T65 M 0-1m	50,9	45,4	3,95	0,542	0,25	0,166	0,062	0,064
T117 F 0-1m	17	12,3	3,06	0,126	0,101	0,131	0,105	0,192
T151 F 0-1m	20,9	17,7	1,98	0,166	0,05	0,118	0,053	0,0581
moyenne	29,6	25,13	3,00	0,28	0,13	0,14	0,074	0,10
médiane	20,9	17,7	3,06	0,166	0,101	0,131	0,062	0,064
écart type	18,55	17,76	0,99	0,23	0,10	0,02	0,03	0,08
minimum	17	12.3	1,98	0,126	0,05	0,118	0,053	0,058
maximum	50.9	45,4	3,95	0,542	0,25	0,166	0,105	0,192
5èm percentile	17,39	12,84	2,088	0,13	0,055	0,1193	0,0543	0,05869
95èm percentile	47,9	42,63	3,861	0,5044	0,2351	0,1625	0,1007	0,1792

C10	C12	C14	C16	C18	AC	AC/C0	
0,0637	0,112	0,108	0,0958	0,102	5,5	0,12	T65 M 0-1m
0,311	0,204	0,14	0,207	0,127	4,7	0,38	T117 F 0-1m
0,0651	0,136	0,129	0,203	0,153	3,2	0,18	T151 F 0-1m
0,15	0,15	0,13	0,17	0,13	4,47	0,23	moyenne
0,0651	0,136	0,129	0,203	0,127	4,7	0,18	médiane
0,14	0,05	0,02	0,06	0,03	1,17	0,14	écart type
0,0637	0,112	0,108	0,0958	0,102	3,2	0,12	minimum
0,311	0,204	0,129	0,207	0,153	5,5	0,38	maximum
0,06384	0,1144	0,1101	0,10652	0,1045	3,35	0,13	5è percentile
0,28641	0,1972	0,1389	0,2066	0,1504	5,42	0,36	95èpercentile

D. Détail des témoins de 7jours-2mois (7)

	CT	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8
T114M 0-1m	14,6	11,5	2,18	0,083	0,0182	0,088	0,06	0,074
T116 M 0-1m	48	43,5	3,25	0,351	0,191	0,156	0,063	0,066
T125 F 0-1m	14,1	11,4	1,88	0,061	0,032	0,093	0,041	0,041
T153 F 0-1m	35,4	28,9	5,1	0,244	0,0994	0,095	0,095	0,128
T105 F 1-2m	25,3	21,2	2,25	0,408	0,265	0,168	0,175	0,135
T154 M 1-2m	39,5	35,7	2,04	0,515	0,194	0,177	0,144	0,114
T21 F 1-2m	32,1	28,4	2,19	0,639	0,107	0,163	0,167	0,058
moyenne	29,86	25,80	2,70	0,33	0,13	0,13	0,11	0,09
médiane	32,10	28,40	2,19	0,35	0,11	0,16	0,09	0,07
écart type	12,65	11,98	1,15	0,21	0,09	0,04	0,06	0,04
minimum	14,10	11,40	1,88	0,08	0,02	0,09	0,04	0,04
maximum	48,00	43,50	5,10	0,64	0,27	0,18	0,18	0,14
5ème percentile	14,25	11,43	1,93	0,07	0,02	0,09	0,05	0,05
95ème percentile	45,45	41,16	4,55	0,60	0,24	0,17	0,17	0,13

Rapport-Gratuit.com

C10	C12	C14	C16	C18	AC	AC/C0	
0,074	0,104	0,114	0,187	0,131	3,1	0,270	T114M 0-1m
0,0573	0,126	0,109	0,101	0,1	4,5	0,103	T116 M 0-1m
0,0329	0,101	0,109	0,166	0,125	2,7	0,237	T125 F 0-1m
0,17	0,158	0,134	0,147	0,106	6,5	0,225	T153 F 0-1m
0,229	0,175	0,0975	0,152	0,0703	4,1	0,193	T105 F 1-2m
0,177	0,107	0,0681	0,135	0,0816	3,8	0,106	T154 M 1-2m
0,129	0,109		0,0845	0,0391	3,7	0,130	T21 F 1-2m
0,12	0,13	0,11	0,14	0,09	4,06	0,18	moyenne
0,13	0,11	0,11	0,15	0,10	3,80	0,19	médiane
0,07	0,03	0,02	0,04	0,03	1,23	0,07	écart type
0,03	0,10	0,07	0,08	0,04	2,70	0,10	minimum
0,23	0,18	0,13	0,19	0,13	6,50	0,27	maximum
0,04	0,10	0,08	0,09	0,05	2,82	0,10	5ème percentile
0,21	0,17	0,13	0,18	0,13	5,90	0,26	95ème percentile

E. Détail des témoins de 2-18 mois (11)

	AC	AC/C0	CT	C0	C2	C3	C4	C5
T71	9,5	0,2914	42,1	32,6	8,02	0,374	0,233	0,129
T 17	3,6	0,16	26,10	22,50	1,96	0,57	0,14	0,13
T 20	4,8	0,1121	47,60	42,80	3,07	0,42	0,16	0,12
T 64	3,9	0,2086	22,60	18,70	2,57	0,37	0,04	0,09
T 81	6,5	0,1526	49,10	42,60	4,15	1,10	0,21	0,13
T 92	6,6	0,1964	40,20	33,60	4,46	0,65	0,10	0,09
T 96	6,1	0,1164	58,5	52,4	4,31	0,795	0,195	0,0945
T 93	4	0,1105	40,2	36,2	2,28	0,87	0,197	0,251
T128	10,3	0,5124	30,4	20,1	7,78	1,25	0,327	0,116
T 131	5	0,1316	43	38	3,55	0,68	0,187	0,0641
T 94	9,3	0,2527	46,1	36,8	7,37	0,652	0,186	0,0982
moyenne	6,32727	0,2041	40,536	34,21	4,5018	0,7029	0,1797	0,1193
médiane	9,4	0,2721	44,1	34,7	7,695	0,513	0,2095	0,1136
écart-type	2,4017	0,1183	10,576	10,39	2,2271	0,2859	0,0731	0,0485
valeur min	3,6	0,1105	22,6	18,7	1,96	0,37	0,04	0,0641
valeur max	10,3	0,51	58,5	52,4	8,02	1,25	0,327	0,25
5ème percentile	3,75	0,1113	24,35	19,4	2,12	0,37	0,0694	0,0746
95ème percentile	9,9	0,4019	53,8	47,6	7,9	1,175	0,28	0,1905

C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18	
0,159	0,055	0,146	0,114		0,215	0,087	T71
0,07	0,13	0,16	0,13	0,03	0,08	0,13	T 17
0,08	0,16	0,19	0,17	0,05	0,13	0,24	T 20
0,06	0,11	0,15	0,16	0,04	0,14	0,18	T 64
0,08	0,12	0,18	0,19	0,07	0,11	0,17	T 81
0,08	0,12	0,19	0,19	0,09	0,21	0,34	T 92
0,066	0,041	0,131	0,142	0,058	0,083	0,174	T 96
0,041	0,016	0,081	0,074	0,05	0,092	0,0893	T 93
0,055	0,024	0,1	0,206	0,073	0,162	0,287	T128
0,04	0,033	0,116	0,07	0,05	0,086	0,063	T 131
0,083	0,112	0,235	0,169	0,083	0,156	0,177	T 94
0,073	0,083	0,153	0,147	0,059	0,133	0,1753	moyenne
0,121	0,083	0,191	0,142	0,083	0,186	0,132	médiane
0,032	0,05	0,045	0,046	0,018	0,049	0,0853	écart-type
0,04	0,016	0,08	0,07	0,03	0,08	0,063	valeur min
0,159	0,16	0,254	0,26	0,083	0,215	0,34	valeur max
0,04	0,02	0,09	0,072	0,037	0,083	0,075	5ème percentile
0,121	0,144	0,213	0,2	0,085	0,214	0,312	95ème percentile

F. Détail des témoins de 18-59 mois (7)

	AC	AC/C0	CT	C0	C2	C3	C4	C5
T76	9,70	0,1708	66,50	56,80	4,34	4,05	0,39	0,17
T77	5,50	0,2174	30,80	25,30	3,91	0,61	0,08	0,07
T 157	5,10	0,1735	34,50	29,40	3,47	0,39	0,28	0,11
T 145	9,80	0,1863	62,40	52,60	8,18	0,31	0,33	0,14
T 129	5,30	0,1468	41,40	36,10	3,84	0,44	0,35	0,16
T 95	8,50	0,1793	55,90	47,40	7,19	0,27	0,31	0,11
T 156	8,10	0,2832	36,70	28,60	6,84	0,28	0,25	0,07
moyenne	7,43	0,19	46,89	39,46	5,40	0,91	0,28	0,12
médiane	8,10	0,18	41,40	36,10	4,34	0,39	0,31	0,11
écart-type	2,08384	0,0447	14,449	12,7	1,9368	1,391	0,0995	0,0396
valeur min	5.1	0.147	30.8	25.3	3.47	0.27	0.08	0.07
valeur max	9.8	0.28	66.5	56.8	8.18	4.05	0.39	0.17
5ème percentile	5,16	0,154	31,91	26,29	3,581	0,2708	0,1342	0,0684
95ème percentile	9,77	0,2635	65,27	55,54	7,883	3,0189	0,3765	0,1655

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18	
0,02	0,09	0,14	0,10	0,06	0,18	0,19	T76
0,02	0,10	0,15	0,10	0,05	0,15	0,18	T77
0,06	0,13	0,21	0,10	0,08	0,12	0,12	T 157
0,06	0,13	0,19	0,09	0,07	0,12	0,19	T 145
0,03	0,05	0,06	0,07	0,07	0,11	0,16	T 129
0,04	0,09	0,14	0,09	0,07	0,12	0,13	T 95
0,04	0,09	0,10	0,07	0,06	0,10	0,11	T 156
0,04	0,10	0,14	0,09	0,07	0,13	0,15	moyenne
0,04	0,09	0,14	0,09	0,07	0,12	0,16	médiane
0,016	0,028	0,05	0,015	0,011	0,028	0,0318	écart-type
0.02	0.05	0.06	0.07	0.05	0.1	0.11	valeur min
0.06	0.13	0.21	0.1	0.08	0.18	0.19	valeur max
0,02	0,059	0,072	0,07	0,052	0,105	0,1147	5ème percentile
0,06	0,131	0,202	0,104	0,08	0,173	0,1881	95ème percentile

G. Détail des témoins de 5-10 ans (8)

	AC	AC/C0	CT	CO	C2	C3	C4	C5
T50	6,5	0,1757	43,5	37	4,3	0,618	0,28	0,104
T66	9,3	0,3185	38,5	29,2	6,91	0,558	0,272	0,0964
T73	8,3	0,3756	30,4	22,1	6,7	0,465	0,179	0,0926
T75	4,6	0,1762	30,7	26,1	2,58	0,652	0,309	0,103
T102	5,5	0,2083	31,9	26,4	3,75	0,518	0,223	0,0659
T108	8,2	0,2742	38,1	29,9	4,89	0,672	0,361	0,141
T123	4,6	0,1723	31,3	26,7	2,94	0,536	0,244	0,069
T127	3,9	0,1418	31,4	27,5	2,25	0,588	0,261	0,09
moyenne	6,3625	0,2303	34,475	28,11	4,29	0,5759	0,2661	0,0952
médiane	5,2	0,1587	37,45	32,25	3,275	0,603	0,2705	0,097
écart-type	2,02833	0,0831	4,8963	4,291	1,7821	0,0702	0,0548	0,0233
valeur min	3,9	0,1723	30,4	22,1	2,25	0,465	0,179	0,0659
valeur max	9,3	0,3756	43,5	37	6,91	0,672	0,361	0,141
5ème percentile	4,145	0,1525	30,505	23,5	2,3655	0,4836	0,1944	0,067
95ème percentile	8,95	0,3556	41,75	34,52	6,8365	0,665	0,3428	0,1281

C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18		
0,078	0,035	0,041	0,028	0,021	0,103	0,883		T50
0,11	0,182	0,27	0,119	0,034	0,121	0,592		T66
0,103	0,102	0,119	0,068	0,038	0,101	0,351		T73
0,081	0,061	0,068	0,039	0,02	0,075	0,572		T75
0,092	0,115	0,159	0,068	0,024	0,086	0,332		T102
0,158	0,475	0,654	0,127	0,03	0,1	0,551		T108
0,087	0,054	0,058	0,031	0,021	0,083	0,534		T123
0,08	0,052	0,031	0,013	0,014	0,074	0,512		T127
0,099	0,134	0,175	0,062	0,025	0,093	0,5409	moyenne	
0,079	0,043	0,036	0,021	0,017	0,088	0,6975	médiane	
0,027	0,146	0,209	0,042	0,008	0,016	0,1696	écart-type	
0,078	0,035	0,031	0,013	0,014	0,074	0,332	valeur min	
0,11	0,475	0,654	0,127	0,038	0,121	0,883	valeur max	
0,079	0,041	0,034	0,018	0,016	0,074	0,3387	5ème percentile	
0,141	0,372	0,52	0,124	0,037	0,115	0,7812	95ème percentile	

H. Détail des témoins de 11-17 ans (10)

	AC	AC/C0	CT	CO	C2	C3	C4	C5
T41	5,2	0,1417	41,9	36,7	3,07	0,73	0,248	0,118
T51	4,4	0,1406	35,7	31,3	2,46	0,702	0,26	0,148
T72	6,4	0,2747	29,7	23,3	3,98	0,465	0,195	0,155
T74	5,1	0,2297	27,3	22,2	3,38	0,557	0,327	0,0688
T83	10,5	0,3409	41,3	30,8	8,18	0,523	0,392	0,152
T97	7,7	0,2429	39,4	31,7	5,43	0,656	0,257	0,128
T124	4,5	0,2143	25,5	21	2,74	0,498	0,246	0,0629
T137	3,9	0,1535	29,3	25,4	2,27	0,542	0,228	0,0845
T138	13,9	0,4982	41,8	27,9	11,5	0,725	0,487	0,167
T140	8,6	0,351	33,1	24,5	6,59	0,456	0,213	0,0962
moyenne	7,02	0,2588	34,5	27,48	4,96	0,5854	0,2853	0,118
médiane	5,8	0,2363	34,4	26,65	3,68	0,5495	0,2525	0,123
écart-type	3,20998	0,1129	6,365	5,046	3,0085	0,1077	0,0912	0,038
valeur min	3,9	0,1406	25,5	21	2,27	0,456	0,195	0,0629
valeur max	13,9	0,498	41,9	36,7	11,5	0,725	0,487	0,167
5ème percentile	4,125	0,1411	26,31	21,54	2,3555	0,4601	0,2031	0,0656
95ème percentile	12,37	0,432	41,855	34,45	10,006	0,7278	0,4443	0,1616

C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18		
0,077	0,071	0,066	0,029	0,014	0,078	0,648		T41
0,078	0,062	0,044	0,027	0,016	0,067	0,564		T51
0,09	0,08	0,096	0,044	0,026	0,102	1,13		T72
0,092	0,1	0,079	0,042	0,024	0,102	0,38		T74
0,106	0,107	0,116	0,07	0,031	0,082	0,683		T83
0,104	0,096	0,12	0,068	0,033	0,1	0,687		T97
0,076	0,064	0,063	0,034	0,018	0,071	0,64		T124
0,074	0,074	0,056	0,021	0,011	0,051	0,484		T137
0,123	0,082	0,112	0,053	0,023	0,08	0,504		T138
0,103	0,145	0,152	0,076	0,027	0,097	0,669		T140
0,092	0,088	0,09	0,046	0,022	0,083	0,6389	moyenne	
0,091	0,081	0,088	0,043	0,024	0,081	0,644	médiane	
0,016	0,025	0,034	0,02	0,007	0,017	0,2003	écart-type	
0,074	0,062	0,044	0,021	0,011	0,051	0,38	valeur min	
0,123	0,145	0,152	0,076	0,033	0,102	1,13	valeur max	
0,074	0,063	0,05	0,023	0,012	0,058	0,4268	5ème percentile	
0,115	0,128	0,138	0,073	0,032	0,102	0,9307	95ème percentile	

En rouge, les valeurs bien en dehors des bornes (selon les référentiels des tableaux IV et V)

Table des matières

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE D'ANGERS 2

COMPOSITION DU JURY 6

REMERCIEMENTS 7

LISTE DES ABREVIATIONS 10

PLAN 12

INTRODUCTION 13

PARTIE 1 REVUE DE LA LITTERATURE 17

Chapitre 1 La carnitine 17
1.1 Historique et aspects généraux 17
1.2 Biosynthèse de la L-carnitine 19
1.3 Rôles de la carnitine 22
1.3.1 Transport des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie, lieu de leur oxydation 23
1.3.2 Régulation du ratio acyl-CoA/CoA dans la mitochondrie 25
1.3.3 Détoxification de métabolites pouvant être toxiques 26
1.3.4 Oxydation des acides gras dans les peroxysomes 27
1.3.5 Neuroprotection 27
1.3.6 Autres fonctions 28
1.4 Régulation de la carnitine dans l'organisme 28
1.4.1 Aspects généraux 28
1.4.2 Le transport de la carnitine vers les tissus périphériques 29
1.4.3 Régulation de la distribution tissulaire de la carnitine 30
1.5 Les déficits acquis en carnitine 30
1.5.1 Situations pathologiques 30
1.5.2 Situations physiologiques 32
1.5.3 Effet de certains médicaments 32

Chapitre 2 La béta-oxydation des acides gras (ßOAG) 34
2.1 Son rôle 34
2.2 Le cycle de la ß-oxydation 34
2.3 Devenir des substrats : les acétyl-CoA 38
2.3.1 Oxydation dans le cycle de Krebs 38
2.3.2 Précurseurs de la biosynthèse des lipides et des phospholipides 39
2.4 Régulation de la ß oxydation des acides gras 41
2.5 Oxydation microsomale et peroxysomale des acides gras 41

Chapitre 3 Les acylcarnitines 42
3.1 Aspects généraux 42
3.2 Les différents types d'acylcarnitines 42
3.3 Méthodes d'exploration des acylcarnitines 46
3.3.1 Aspects généraux 46
3.3.2 Point sur la dérivatisation des acylcarnitines 46
3.3.3 Historique des techniques 47
3.3.4 Acylcarnitines: approches qualitatives, quantitatives, semi-quantitatives et ratios 48

3.3.5 Différences entre acylcarnitines réalisés sur papier buvard et sur plasma 49
3.4 Interférences analytiques 49
3.4.1 Les toxiques 49
3.4.2 L'hémolyse 50
3.4.3 L'anticoagulant EDTA 50
3.4.4 La cétose 50
3.5 Valeurs physiologiques des acylcarnitines et de la carnitine 50
3.6 Place de l'exploration des acylcarnitines en pathologie 53

Chapitre 4 Carnitine, acylcarnitines et erreurs innées du métabolisme 54
4.1 Le contexte 54
4.2 Les anomalies de transport de la carnitine et du cycle de la carnitine 58
4.2.1 Les anomalies de transport de la carnitine 58
4.2.2 Les anomalies du cycle de la carnitine 59
4.3 Les anomalies du cycle de la ßOAG (à l'intérieur de la mitochondrie) 60
4.3.1 Le déficit en Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD ; phenotype MIM number : 609575) 60
4.3.2 Le déficit en Medium chain Acy-CoA Dehydrogenase (MCAD; phenotype MIM number: 607008) 61
4.3.3 Le déficit en Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD; phenotype MIM number : 606885) . 61
4.3.4 Le déficit en Long Chain 3 Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD)/ protéine trifonctionnelle (TFP) 62
4.3.5 Une forme mixte entre anomalie de la ßOAG et anomalie du catabolisme d'acides aminés ramifiés : l'acidurie glutarique de type 2 (AG2) / déficit multiple en acyl-CoA dehydrogénase (MADD) 63
4.4 Les aciduries organiques ou acidémies organiques AO 64
4.4.1 Généralités 64
4.4.2 Les aciduries organiques classiques 65
4.4.3 Les aciduries organiques cérébrales 66
4.5 Principes de traitement et de suivi des anomalies de la ßOAG et des aciduries organiques 66
4.5.1 Traitement et suivi des anomalies de la ßOAG 66
4.5.2 Traitement et suivi des aciduries organiques 67

Chapitre 5 Stratégie diagnostique des anomalies de la ß oxydation des acides gras et de certaines anomalies du métabolisme des acides organiques 68
5.1 Orientation générale devant une suspicion de maladie métabolique 68
5.2 Orientation devant une suspicion d'anomalie de la ß oxydation des acides gras ou de certaines aciduries organiques 69
5.2.1 Généralités 69
5.2.2 Explorations spécialisées 69
5.2.3 Explorations complémentaires 70
5.2.4 Exemple de stratégie diagnostique australienne devant un patient suspect d'anomalie de la ßOAG 71

Chapitre 6 Principes de la spectrométrie de masse 73
6.1 Introduction 73
6.2 Notions élémentaires et définitions 74
6.3 Les sources d'ionisation 75
6.3.1 Définition 75
6.3.2 La source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) 75
6.3.3 L'ionisation par électro-nébulisation ou ESI 75
6.4 Les analyseurs de masse 77
6.4.1 Généralités 77
6.4.2 Analyseurs utilisant un champ électrique oscillant 77
6.4.3 Couplage des méthodes séparatives avec la spectrométrie de masse 84
6.4.4 Notion de quantification en spectrométrie de masse 89

PARTIE 2 DONNEES EXPERIMENTALES 94

Chapitre 1 Objectifs de l'étude et mise au point de la méthode 94
1.1 Objectifs et justification de l'étude 94
1.2 Mise au point de la méthode: considérations générales 95

Chapitre 2 Matériel et méthode 100
2.1 Principe 100
2.2 Etapes préanalytiques 100
2.3 Matériel 101
2.3.1 Réactifs 101
2.3.2 Etalons internes deutérés 101
2.3.3 Standards non deutérés pour la préparation de la gamme 102
2.3.4 Contrôles de qualité 102
2.3.5 Matériel et consommable 103
2.3.6 LC/MSMS 103
2.4 Méthode 104
2.4.1 Préparation des étalons internes 104
2.4.2 Préparation des standards de carnitine et acylcarnitines non deutérés pour la gamme d'étalonnage externe 104
2.4.3 Préparation de la gamme d'étalonnage externe 106
2.4.4 Préparation des échantillons et des contrôles 106
2.4.5 Préparation des tampons 107
2.4.6 L'HPLC, paramètres issus de la mise au point de la méthode 108
2.4.7 Paramètres du spectromètre de masse 109
2.5 Validation de méthode 110
2.5.1 Particularités des analytes étudiés 110
2.5.2 Paramètres étudiés 111
2.6 Tests de stabilité de la carnitine et des acylcarnitines 114
2.7 Approximation des valeurs de référence biologique 115

Chapitre 3 Résultats 115

3.1 Validation de méthode 116
3.1.1 Répétabilité 116
3.1.2 Fidélité intermédiaire 118
3.1.3 Evaluation de la justesse du CO 119
3.1.4 Estimation de l'incertitude de mesure 120
3.1.5 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) en µM 121
3.1.6 Limites supérieures de linéarité (LSL) 122
3.1.7 Stabilité des acylcarnitines 122
3.1.8 Etude de la contamination 123
3.2 Valeurs de référence biologique 124
3.2.1 Adultes 125
3.2.2 Témoins prématurés 126
3.2.3 Témoins âgés de 1 à 7 jours 128
3.2.4 Témoins âgés de 7 jours à 2 mois 128
3.2.5 Témoins âgés de 2 à 18 mois 130
3.2.6 Témoins âgés de 18 à 59 mois 131
3.2.7 Témoins âgés de 5 à 10 ans 132
3.2.8 Témoins âgés de 10 à 17 ans 133
3.2.9 Evolution des analytes fonction de l'âge 134

Chapitre 4 Discussion 137
4.1 Particularités et principales difficultés des analytes à doser 137
4.1.1 Molécules très hétérogènes 137
4.1.2 Absence de gold standard 137
4.1.3 Absence de contrôles qualité 137
4.1.4 Etalons internes choisis 138

4.1.5 Axes d'amélioration 138
4.2 Principales difficultés de la technique 138
4.2.1 La spectrométrie de masse 138
4.2.3 La gamme 138
4.2.4 La chromatographie 139
4.2.5 Suppression d'ionisation, effet matrice, saturation du signal 140
4.3 Performances et limites de la méthode 140
4.4 Stabilité des acylcarnitines 141
4.5 Estimation des valeurs de référence biologique 141
4.5.1 Discussion générale 141
4.5.2 Comparaison des résultats par rapport aux valeurs "normales" disponibles dans la littérature 143
4.5.3 Comparaison des résultats entre les différentes tranches d'âge 144
4.6 Principes d'interprétation 145
4.7 Perspectives 146

CONCLUSION 148

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 149

LISTE DES FIGURES 159

LISTE DES TABLEAUX 161

Annexes 163
A. Détail de l'étude des témoins adultes 163
B. Détail de l'étude des témoins prématurés (9) 164
C. Détail des témoins de 0-7jours (3) 165
D. Détail des témoins de 7jours-2mois (7) 166
E. Détail des témoins de 2-18 mois (11) 167
F. Détail des témoins de 18-59 mois (7) 168
G. Détail des témoins de 5-10 ans (8) 169
H. Détail des témoins de 11-17 ans (10) 170

Table des matières 172

Permis d'imprimer

Rapport-Gratuit.com

Page blanche

Dernière de couverture

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES