

Recommandations concernant l'analyse du profil des acylcarnitines

Marie Nowoczyn, Cécile Acquaviva Bourdain, Christelle Corne, Régine Minet-Quinard, Laetitia Van Noolen, Roselyne Garnotel, Anne-Frédérique Dessein

DANS **ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE** 2020/5 Vol. 78 , PAGES 537 À 546
ÉDITIONS **JLE**

ISSN 0003-3898

DOI 10.1684/abc.2020.1582

Date de mise en ligne : 16/09/2024

Article disponible en ligne à l'adresse

<https://stm.cairn.info/revue-annaes-de-biologie-clinique-2020-5-page-537?lang=fr>



Découvrir le sommaire de ce numéro, suivre la revue par email, s'abonner...
Scannez ce QR Code pour accéder à la page de ce numéro sur Cairn.info.



Distribution électronique Cairn.info pour JLE.

Vous avez l'autorisation de reproduire cet article dans les limites des conditions d'utilisation de Cairn.info ou, le cas échéant, des conditions générales de la licence souscrite par votre établissement. Détails et conditions sur cairn.info/copyright.

Sauf dispositions légales contraires, les usages numériques à des fins pédagogiques des présentes ressources sont soumises à l'autorisation de l'Éditeur ou, le cas échéant, de l'organisme de gestion collective habilité à cet effet. Il en est ainsi notamment en France avec le CFC qui est l'organisme agréé en la matière.

Recommandations concernant l'analyse du profil des acylcarnitines

Recommendations for acylcarnitine profile analysis

Marie Nowoczyn¹

Cécile Acquaviva-Bourdain²

Christelle Corne³

Régine Minet-Quinard⁴

Laetitia Van Noolen³

Roselyne Garnotel⁵

Anne-Frédérique Dessein⁶

Groupe des biologistes
de la Société française
pour l'étude des erreurs
innées du métabolisme (SFEIM)

¹ Laboratoire de biochimie,
CHU Caen, France

² Service de biochimie et biologie
moléculaire Grand Est – UM Pathologies
métaboliques, érythrocytaires et dépistage
périnatal, Centre de biologie Est, Hospices
civils de Lyon, Bron, France

³ Laboratoire des maladies héréditaires du
métabolisme, Service de biochimie,
biologie moléculaire et toxicologie
environnementale,
CHU Grenoble-Alpes, France

⁴ Service de biochimie et génétique
moléculaire, CHU Clermont-Ferrand,
France

⁵ Laboratoire de biochimie-
pharmacologie-toxicologie,
Pôle de biologie territoriale,
CHU Reims, France

⁶ Centre de biologie pathologie génétique,
UF métabolisme général
et maladies rares, CHU Lille, France

Article reçu le 26 juin 2020,
accepté le 04 août 2020

Les anomalies du cycle de la carnitine, de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras et les aciduries organiques font partie des maladies héréditaires du métabolisme (MHM) qui sont souvent des maladies sévères pouvant, en cas de décompensation métabolique, conduire au décès brutal des patients atteints du fait d'un processus double

d'intoxication et de carence énergétique [1]. Ces pathologies peuvent se révéler à tout âge, les formes les plus graves s'exprimant en période néonatale.

Les anomalies du cycle de la carnitine et de la bêta-oxydation mitochondriale peuvent se manifester selon les cas par une hypoglycémie hypocétotique, une défaillance hépatique, des troubles musculaires (muscle squelettique et/ou cardiaque) et/ou neurologiques (voir pour revue [2]). La présentation clinique des aciduries organiques est plus variée, avec selon les cas un retard du développement

Résumé. Le diagnostic biochimique des maladies héréditaires du métabolisme nécessite la détection et l'identification simultanées d'un grand nombre de composés d'où l'intérêt des profils métaboliques. Le profil des acylcarnitines permet l'identification et la quantification de plus de trente composés. Dans le cadre du processus d'accréditation des examens de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189, le groupe issu de la Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme (SFEIM), recommande une démarche pour accréditer le profil des acylcarnitines. Les paramètres de validation et des recommandations sont discutés dans ce cadre spécifique.

Mots clés : profil des acylcarnitines, accréditation, norme, ISO 15189

Abstract. Biochemical diagnosis of hereditary metabolic diseases requires the detection and simultaneous identification of a large number of compounds, hence the interest in metabolic profiles. Acylcarnitine profile allows the identification and quantification of more than thirty compounds. As part of the accreditation process for medical biology examinations according to standard NF EN ISO 15189, the group from SFEIM recommends an approach to accredit acylcarnitine profile. Validation parameters and recommendations are discussed in this specific framework.

Key words: acylcarnitine profile ; accreditation, ISO standard, ISO 15189

Correspondance : M. Nowoczyn
<nowoczyn-m@chu-caen.fr>

psychomoteur, des vomissements, une léthargie, des convulsions, une hypoglycémie ou des difficultés respiratoires [3]. Une hyperammoniémie est souvent associée, habituellement plus marquée dans les aciduries organiques. A l'occasion d'un jeûne prolongé, d'un exercice physique intense ou d'un épisode infectieux peut survenir une décompensation métabolique dont l'évolution, fatale en l'absence de traitement adapté, est susceptible de laisser des séquelles plus ou moins invalidantes.

L'incidence cumulée estimée de ces MHM se situe entre 1/5 000 et 1/10 000 naissances [4], ce qui en fait des pathologies relativement fréquentes. Dans la mesure où certaines font partie des MHM traitables, il est important de porter le plus tôt possible un diagnostic précis et fiable afin de mettre en place le traitement adéquat et les mesures de prévention des décompensations ultérieures.

Le diagnostic de ces MHM repose sur des analyses de biochimie spécialisée. Un élément essentiel du bilan métabolique de première intention est l'étude du profil des acylcarnitines (ACN) sanguines. En effet, la physiopathologie des anomalies du cycle de la carnitine, de la bêta-oxydation et également des aciduries organiques nécessitant un traitement en urgence conduit à l'accumulation d'une ou plusieurs ACN caractéristiques associée à une diminution de la carnitine libre et/ou de l'acétylcarnitine.

Ce travail s'attache à proposer des recommandations de bonnes pratiques pour chaque étape de la réalisation du profil des ACN, du prélèvement à la validation biologique, établies à partir des données de la littérature internationale, des travaux collectifs commandés par la Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme (SFEIM), d'essais sur site réalisés dans deux laboratoires hospitaliers (Caen et Lille) et d'une enquête des pratiques menée en 2018 auprès des laboratoires hospitaliers français réalisant cette analyse en routine.

Étape pré-analytique

Modalités de prélèvement

Le prélèvement doit idéalement avoir lieu en période aiguë de décompensation (de préférence avant resucrage) ou, à défaut, au décours d'un jeûne aussi long que possible, adapté à l'âge du patient. Chez le nouveau-né, le prélèvement doit être réalisé juste avant un biberon.

Toute demande doit être accompagnée d'un formulaire de renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques, indispensable à l'interprétation. Les éléments suivants sont particulièrement importants à mentionner : hypoglycémie notamment hypocétotique, cardiomyopathie, rhabdomyolyse, intolérance à l'effort, hyperammoniémie, insuffisance hépatocellulaire ou cytolyse, stéatose hépatique aiguë gra-

vidique, syndrome de Reye, consanguinité, mort subite dans la fratrie...

Dans l'idéal, le profil des ACN sanguines doit être combiné à la chromatographie des acides organiques (CAO) urinaires (voir recommandations spécifiques).

Nature de l'échantillon

L'analyse peut être réalisée sur :

- sang séché sur buvard,
- plasma hépariné/sérum [5]/plasma EDTA à défaut,
- urine (sans conservateur),
- liquide amniotique.

Certains auteurs ont décrit la possibilité de réaliser un profil des ACN sur de la bile [6, 7], en particulier dans le cas où le déficit concerne l'oxydation des ACN à chaîne longue, mais l'utilisation de cette matrice reste anecdotique, décrite dans le cas de recherches *post-mortem*.

Sang séché sur buvard

Le sang capillaire prélevé par lancette ou le sang veineux hépariné doit être déposé immédiatement (moins de 2 minutes) et en une seule fois sur du papier buvard : la tache doit être visible de manière identique des deux côtés. Le buvard correctement imprégné doit sécher à température ambiante (2h à plat) et à l'air libre. La quantité minimale est de deux spots correctement remplis. Un certain nombre d'exemples de non-conformités d'échantillons sont présentées dans le guide [8].

Plasma/sérum

Si la matrice de référence reste le plasma hépariné, le sérum est une matrice acceptable [5, 9]. Le volume minimal conseillé est de 300 μ L de sang hépariné ou 100 μ L de plasma/sérum.

L'utilisation de plasma EDTA est possible en seconde intention, si aucune autre matrice n'est disponible. Il faut dans ce cas prendre en compte la possibilité d'extinction chimique et l'apparition de pics interférents, susceptibles de gêner la lecture du profil et de modifier modérément les résultats de quantification. Dans le cas d'un profil pathologique, l'interprétation n'est pas faussée [10, 11] (*Encadré 1*).

Urines

Les ACN dont la longueur de chaîne est supérieure à 12 carbones ne sont normalement pas éliminées dans l'urine. L'étude du profil des ACN dans cette matrice présente donc un intérêt limité.

L'indication principale d'un profil urinaire est l'acidurie glutarique de type I : chez les patients faiblement/non excréteurs, il est recommandé de doser les ACN dans les urines, en complément de la CAO urinaire et du profil d'ACN sanguines. Le profil des acylcarnitines urinaires peut se révéler informatif, en complément de la CAO urinaire, dans certaines aciduries organiques, par exemple le déficit en bio-

Encadré 1**Buvard vs. plasma : lequel choisir ?**

L'analyse sur plasma est quantitativement plus exacte. L'exactitude est moindre sur le buvard car il faut prendre en compte l'impact combiné de la prise d'essai moins calibrée et de la variation inter-individuelle liée à l'hématocrite.

Le buvard présente le double avantage d'un moindre volume de sang associé à un prélèvement moins invasif. Leur performance diagnostique est différente pour certaines maladies.

tinidase [5]. Le volume minimum nécessaire est de 500 μL d'urines (post-crise ou 1^{re} miction du matin à défaut) prélevées sans conservateur. Les résultats sont rapportés en mmol/mol de créatinine [12].

Liquide amniotique

L'étude du profil des ACN y est analytiquement faisable, suivant des modalités similaires au sérum/plasma [5]. Les indications sont :

- des signes d'appel échographiques d'acidurie glutarique de type 1 ;
- un risque établi d'acidurie organique ou de déficit isolé ou multiple de l'oxydation des acides gras (hors anomalie des chaînes longues), quand l'étude génétique ne permet pas d'établir un diagnostic prénatal.

L'analyse est réalisée en complément de la CAO. Dans la mesure où il n'existe pas de valeurs de référence établies pour cette matrice, et afin de pouvoir interpréter les résultats, il convient d'analyser dans la même série des liquides amniotiques de terme identique.

Acheminement – Délai – Prise en charge au laboratoire – Conservation**Sang séché sur buvard**

Le transport du buvard sec se fait à température ambiante, dans un contenant hermétiquement clos, dans la semaine suivant le prélèvement. Il convient d'éviter une humidité excessive qui pourrait entraîner une dilution des taches de sang (pas de glaçons...).

Sérum/plasma/urines/liquide amniotique

Des essais de stabilité en sang total hépariné (travaux de la SFEIM, 2016) ont mis en évidence la possibilité d'une élévation des ACN à longue chaîne dans le cas d'une conservation dépassant 1h30 à température ambiante, ou 3h à +4 °C. En conséquence, l'acheminement peut avoir lieu à température ambiante si le délai est inférieur à 1h30, doit se faire dans la glace fondante

au-delà, et l'échantillon doit être centrifugé à +4 °C dans les 3 heures qui suivent le prélèvement. Une fois décanté, le plasma doit être congelé à -20 °C dans les 24 heures [9].

Si ces conditions de transport et de préparation ne sont pas respectées, le rejet de l'échantillon ne doit pas être systématique et l'acceptation avec dérogation est faite au cas par cas par le biologiste.

La présence d'un ictère ou d'un trouble ne doit pas induire un rejet de l'échantillon car ils ne sont pas source d'interférences techniques. La lactescence peut être une cause d'interférence biologique, à confronter aux circonstances de prélèvement. Une hémolyse macroscopique ne constitue pas une cause de rejet de l'échantillon mais doit être signalée dans la mesure où des variations significatives du profil peuvent être observées.

Des conditions d'acheminement et de prise en charge similaires doivent être appliquées aux tubes secs, aux urines et aux liquides amniotiques. Dans le cas des urines, il convient d'envisager les contraintes pré-analytiques spécifiques au dosage de la créatinine urinaire.

Dans le cas d'une analyse sous-traitée, le pré-analytique et les contraintes afférentes doivent être assurés dans le laboratoire du centre demandeur. Les échantillons doivent être acheminés congelés (carboglace ou enceinte thermostatée) au laboratoire qui réalise l'analyse.

Conservation – Ré-analyse**Buvards**

Au-delà de 14 jours à température ambiante, il se produit une hydrolyse significative des ACN en carnitine libre et leurs acides gras correspondants, d'autant plus rapide que la chaîne hydrocarbonée est courte. Il convient donc, pour une conservation à long terme (1 an), de les stocker à -20 °C avec dessiccant ; au-delà, la stabilité des ACN à chaîne courte n'est pas bonne (pour une étude détaillée de la conservation de chaque ACN, se référer à [13]).

Les buvards du dépistage néonatal (J3) sont parfois utilisés pour réaliser *a posteriori* un profil des ACN, par exemple en cas de mort inattendue du nourrisson. Lors de l'interprétation, les conditions de conservation de ces buvards doivent être prises en compte (+4 °C avec dessiccant pendant 1 an, selon les recommandations de l'Association française dépistage prévention handicap enfant).

Plasma

Le plasma congelé à -20 °C peut être conservé pendant une période de 12 à 18 mois (au-delà, la stabilité des ACN à chaînes courtes ne serait plus assurée) [5] (*Encadré 2*).

Encadré 2

Recommandations pré-analytiques			
Prélèvement	Tache de sang séché sur buvard	Sang prélevé sur tube sec ou héparinate de Li	Urine
Quantité minimale	2 spots correctement remplis	300 µL de sang total 100 µL de plasma/sérum	500 µL d'urine
Acheminement	Température ambiante A l'abri de l'humidité	<i>Tube primaire</i> +4°C (délai : 3 heures jusque décantation) <i>Plasma/sérum (labo. extérieur)</i> -20°C	+4°C (délai : 3 heures) ou -20°C (labo extérieur)
Conservation pré-analytique	Température ambiante A l'abri de l'humidité	-20°C	-20°C
Conservation pour ré-analyse	-20°C avec dessicant (jusqu'à 1 an)	-20°C (12-18 mois)	-20°C (12-18 mois)

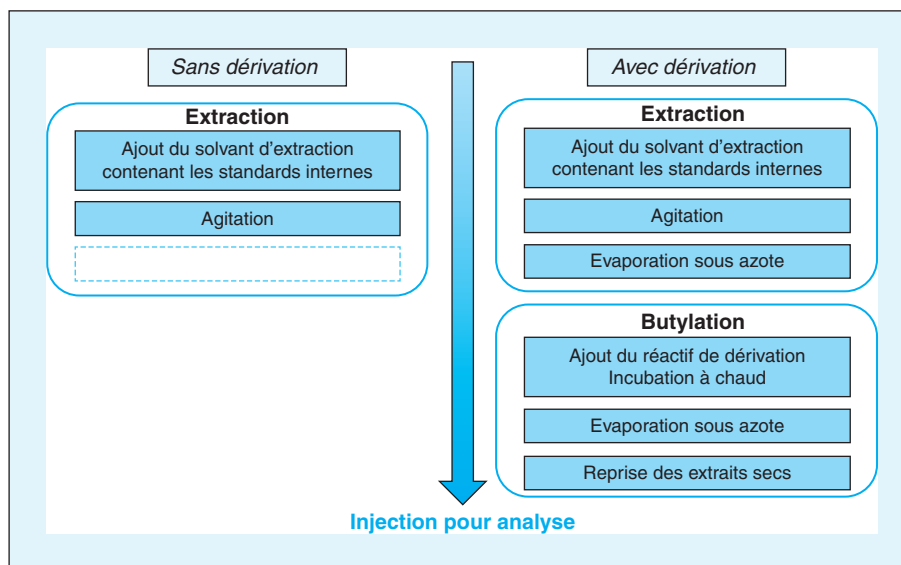


Figure 1. Etapes respectives des protocoles de dosage des ACN avec et sans dérivation.

Etapes analytiques

Principes généraux

Le processus analytique peut être envisagé de deux manières (figure 1) : à savoir avec ou sans étape de dérivation.

Les résultats de l'enquête des pratiques [14] mettent en évidence une grande variabilité tout au long du processus analytique. Dans la suite de ce paragraphe, les facteurs de variation principaux seront pointés et leur impact étudié, indépendamment de la question du suivi métrologique des équipements critiques (pipettes, thermoblocs, enceintes thermostatées...) (Encadré 3).

Modalités pratiques

Étalonnage

Différentes modalités peuvent être envisagées :

- utilisation d'un mélange commercial d'étalons internes deutérés titrés (tableau 1).
- utilisation d'un mélange « maison » d'étalons internes deutérés titrés ;
- préparation à chaque série d'une gamme de calibration externe à partir de solutions « maison » d'ACN non deutérées avec présence d'étalons internes deutérés.

Extraction

La prise d'essai et la méthodologie doivent/peuvent être adaptées selon les matrices. Si les kits commerciaux four-

Encadré 3**Méthode avec ou sans dérivation : laquelle choisir ?**

Les techniques avec dérivation sont majoritairement utilisées en France à l'heure actuelle ; elles présentent cependant l'inconvénient d'une sensibilité diminuée pour les ACN dicarboxyliques. De plus, la dérivation peut introduire un effet matrice supplémentaire : tout effet matrice rend moins fiable la quantification des composés qui n'ont pas d'étalons marqués de même structure.

Les techniques sans dérivation doivent être envisagées avec un analyseur présentant une très bonne sensibilité. Puisque tel est le cas pour les analyseurs récents, ces techniques présentent de nombreux avantages :

- la rapidité de mise en œuvre ;
- une meilleure stabilité donc une meilleure quantification de la carnitine libre ;
- une amélioration de la durée de vie des analyseurs liée à l'absence d'injection de composés corrosifs.

Il existe pour chaque modalité des solutions commerciales intégrant tout ou partie du processus : ceci constitue un élément intéressant dans la perspective d'une harmonisation des pratiques entre les laboratoires. La décision du choix de l'une ou l'autre de ces modalités revient au laboratoire, en regard de son équipement, du volume d'analyses à prendre en charge, de ses contraintes d'organisation, de ses contraintes financières.

nissent une solution « clé en main », la littérature fournit une grande variété de protocoles (voir pour exemples [5, 6, 15]). Différentes modalités ont été identifiées au niveau du protocole d'extraction :

- nature du solvant d'extraction,
- durée et modalités d'agitation,

– conditions d'évaporation (pour les techniques avec dérivation).

Toutes sont jugées non critiques soit sur la base de la variété des pratiques individuelles françaises [14], soit sur la base de tests réalisés sur site. La *figure 2* résume les variations observées/testées et les recommandations qui en découlent.

Dérivation (selon méthode)

Il est possible, lorsqu'on choisit une méthode avec dérivation, de produire soit des butylesters soit des méthylesters. La pratique la plus répandue consiste à former des butylesters [5] ; en France, l'ensemble des laboratoires utilisant une méthode de dérivation ont choisi la butylation [14].

Différentes sources de variation ont été identifiées au niveau du protocole de dérivation :

- durée et température de butylation,
- conditions d'évaporation.

Toutes sont jugées non critiques soit sur la base de la variété des pratiques individuelles françaises [14], soit sur la base de tests réalisés sur site. La *figure 3* résume les variations observées/testées et les recommandations qui en découlent. À noter, il existe en France un lien inverse entre la durée et la température de dérivation. Suite à l'enquête de pratiques, nous recommandons une dérivation à 60 °C pendant 15 minutes.

Cette étape est *a priori* non critique en termes de rendement de butylation puisque l'on normalise avec l'étalon interne qui subit le même traitement. Néanmoins, il est possible d'évaluer l'efficacité de dérivation en tant qu'indicateur de bonne réalisation de cette étape : l'acétylcarnitine non butylée ($m/z = 204$) doit représenter moins de 20 % de l'acétylcarnitine totale ($m/z = 260 + m/z = 204$).

Analyse en spectrométrie de masse en tandem*Chromatographie préalable (selon méthode)*

Une étape de séparation chromatographique n'est pas indispensable, mais elle permet de séparer les formes isobares et donc de réduire les interférences [5]. Ce choix est laissé

Tableau 1. Composition respective des mélanges d'étalons internes deutérés commercialisés en France (données mars 2020).

Fournisseur (référence)	C0	C2	C3	C4	C5	C5OH	C5DC	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C16OH	C18
Chromsystems (55004 ou 57004)	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case bleue
CIL (NSK-B)	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case blanche	Case blanche	Case bleue	Case blanche	Case blanche	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case blanche
CIL (NSK-B-G)	Case blanche	Case blanche	Case blanche	Case blanche	Case blanche	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case blanche	Case bleue	Case blanche	Case blanche	Case bleue	Case bleue	Case bleue
Perkin Elmer (3026-0030 ou 3040-0010)	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case bleue	Case blanche	Case bleue

Case bleue : présence dans le mélange ; case blanche : absence du mélange. NB : le décalage d'unités de masse varie selon le fournisseur et n'est donc pas précisé.

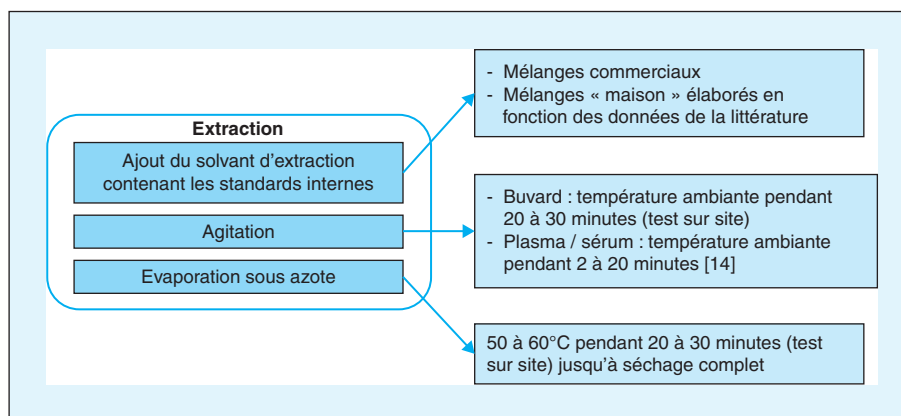


Figure 2. Recommandations pour l'étape d'extraction.

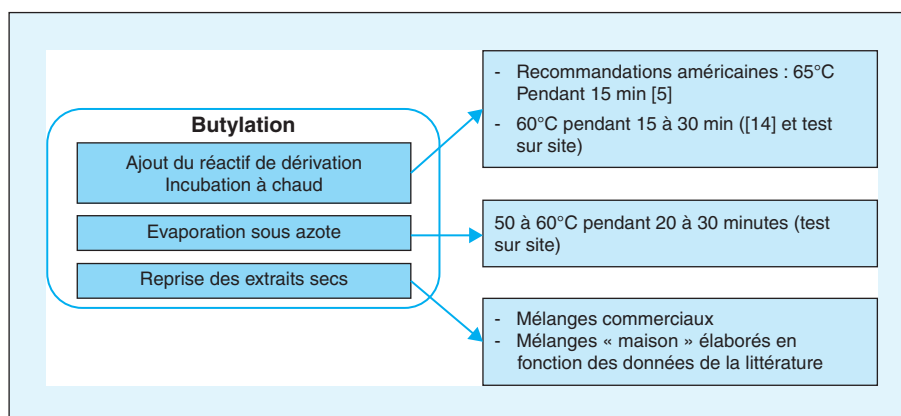


Figure 3. Recommandations pour l'étape de dérivation.

à l'appréciation du laboratoire en fonction des contraintes qui lui sont propres. Quelle que soit la méthode utilisée, il est important d'en connaître les limites et les interférences.

Mode d'acquisition

L'acquisition est réalisée en mode positif. L'utilisation du mode ion parent (recherche des précurseurs de l'ion 85 commun à toutes les ACN butylées ou non dérivées [6]) est recommandée dans la mesure où elle permet d'obtenir un profil complet en permettant ainsi de détecter des composés que l'on n'a pas préalablement désignés (exemple : acide formiminoglutamique ou benzoylcarnitine). Il est également possible d'utiliser le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) qui permet la quantification plus exacte d'acylcarnitines préalablement désignées : son intérêt dépend donc du nombre d'acylcarnitines d'intérêt diagnostique qu'elle cible. Du fait de l'amélioration des performances des équipements, il est envisageable de réaliser sur chaque échantillon, avec une durée totale d'analyse raisonnable, une double acquisition en combinant ces deux modes afin de bénéficier de leurs avantages respectifs.

Paramétrage

Le *tableau 2* indique pour chaque ACN les transitions avec ou sans butylation et l'étalon interne recommandé pour la quantification. À noter, une quantification peut donner des résultats différents en fonction de l'étalon interne utilisé ; il appartient donc à chaque laboratoire de confronter ces paramètres avec ceux correspondant aux étalons internes effectivement employés et d'adapter les valeurs de référence en conséquence.

Au-delà de l'interprétation qualitative du profil dans son ensemble, la quantification en tant que support de l'interprétation est recommandée pour les composés dont les performances analytiques peuvent être suivies par des contrôles de qualité externe. La quantification des composés pour lesquels il n'existe pas à ce jour d'étalon interne spécifique, de contrôle interne de qualité (CIQ) et/ou d'EEQ n'est envisagée que si elle appuie un profil anormal, ou par analyse semi-quantitative en mode MRM.

Le choix des modalités de quantification est sous la responsabilité du biologiste et doit prendre en compte les limites de la méthode sélectionnée.

Tableau 2. Acquisition des butylesters d'acylcarnitines et des acylcarnitines non dérivées.

Composé	Transition		Quantification	Remarque	Existence d'un EEQ quantitatif
	Butylesters d'ACN	ACN non dérivées			
C0	218>85	162>85	C0*		SAS, SAU, ACS, CDC, SADBS
C2	260>85	204>85	C2*		ACS, CDC
C3	274>85	218>85	C3*		ACS, CDC
C4	288>85	232>85	C4*		ACS, CDC
<i>C5:1</i>	300>85	244>85	C5*		ACS
C5	302>85	246>85	C5*		ACS, CDC
<i>C4OH</i>	304>85	248>85	C4*		
C6	316>85	260>85	C6*	C8* ou C5* si non disponible	ACS, CDC
C5OH	318>85	262>85	C5OH*	C5* si non disponible	
C8	344>85	288>85	C8*		ACS, CDC
<i>C3DC</i>	360>85	304>85	C3*		ACS, CDC
<i>C10:1</i>	370>85	314>85	C10*	C8* ou C12* si non disponible	CDC
C10	372>85	316>85	C10*	C8* ou C12* si non disponible	ACS, CDC
<i>C4DC</i>	374>85	318>85	C4*		ACS, CDC
C5DC	388>85	332>85	C5DC*	C5* si non disponible	ACS, CDC
<i>C12:1</i>	398>85	342>85	C12*	C14* si non disponible	
C12	400>85	344>85	C12*	C14* si non disponible	
<i>C14:2</i>	424>85	368>85	C14*		
<i>C14:1</i>	426>85	370>85	C14*		ACS, CDC
C14	428>85	372>85	C14*		ACS, CDC
<i>C8DC</i>	430>85	374>85	C8*		
<i>C14OH</i>	444>85	388>85	C14*		
<i>C16:1</i>	454>85	398>85	C16*		
C16	456>85	400>85	C16*		ACS, CDC
<i>C16:1OH</i>	470>85	414>85	C16*		
<i>C16OH</i>	472>85	416>85	C16*		ACS, CDC
<i>C18:2</i>	480>85	424>85	C18*	C16* si non disponible	
<i>C18:1</i>	482>85	426>85	C18*	C16* si non disponible	ACS, CDC
C18	484>85	428>85	C18*	C16* si non disponible	ACS, CDC
<i>C18:1OH</i>	498>85	442>85	C18*	C16* si non disponible	
<i>C18OH</i>	500>85	444>85	C18*	C16* si non disponible	ACS, CDC

Les étalons internes sont indiqués par un astérisque, le décalage d'unité de masse variant selon le fournisseur choisi. Les composés quantifiés sur leur propre étalon interne sont présentés en gras, ceux quantifiés sur un étalon interne similaire sont présentés en italique. Quatre programmes quantitatifs d'évaluation externe de la qualité sont présentés (données mars 2020). SAS (ERNDIM Special Assay Serum), SAU (ERNDIM Special Assay Urine), ACS (ERNDIM AcylCarnitines in Serum), CDC (CDC Newborn Screening), SADBS (ERNDIM Special Assay in Dry Blood Spot). À noter, les deux derniers programmes ont pour matrice du sang séché sur buvard. Les pics interférents observés lors de l'analyse du plasma EDTA présentent les transitions suivantes : 406>85, 462>85 et 518>85 (formation de butylesters) / 350>85, 406>85, 462>85 (méthode sans dérivation).

Performance des méthodes

La validation de méthode du profil des ACN doit se faire selon les préconisations de la norme ISO 15189 [16]. Il s'agit d'un processus simple entrant dans la ligne de portée BM BB02. La validation de méthode se fait en portée B. L'étude de répétabilité et de fidélité intermédiaire doit se faire sur 2 niveaux de concentrations différents (CIQ ou pool surchargé). Pour chaque niveau de concentration, 15

valeurs sont nécessaires (à adapter en fonction des pratiques et des contraintes propres à chaque laboratoire).

Les coefficients de variation (CV) limites à utiliser pour valider les performances de la méthode (répétabilité, reproductibilité, incertitude de mesure) sont ceux préconisés par la *Food and drug administration* (FDA) en 2018, soit 15 %. Lorsque la concentration évaluée est proche de la limite inférieure de quantification, un CV de 20 % est acceptable [17] ; au vu des données de la littérature (voir

pour exemple [18]) et des essais conduits sur site, ces CV limites semblent adaptés aux méthodes de dosage des ACN. En cas de CV supérieur à ces valeurs, il convient de déterminer si les variations observées entraînent des modifications de l'interprétation clinico-biologique. La variabilité inter-opérateur peut être évaluée par le suivi des CIQ et l'obtention de résultats conformes quels que soient les opérateurs. La justesse ne peut être évaluée puisqu'il n'existe pas d'organisme proposant une externalisation des CIQ. L'évaluation de la spécificité analytique n'est pas applicable dans la mesure où l'identification des ACN repose sur des transitions spécifiques à chacune. Le calcul de l'incertitude de mesure est peu informatif pour cet examen dans la mesure où il est sans impact clinique sur l'interprétation des résultats. En l'absence de gamme de calibration, la limite de détection doit être considérée comme égale à 3 fois l'écart-type du rapport signal/bruit et la limite de quantification à 10 fois cet écart-type. La détermination stricte et systématique d'une limite supérieure de linéarité pour chaque acylcarnitine quantifiée ne présente qu'un intérêt théorique, dans la mesure où l'interprétation finale du résultat intègre le profil dans son ensemble. La limite supérieure de linéarité peut être évaluée de façon indirecte par l'absence de saturation du signal, et de manière globale par la performance du laboratoire aux différents programmes d'EEQ qualitatifs ou quantitatifs. La recherche d'une contamination inter-échantillon peut être évaluée en analysant un échantillon de concentration élevée (CIQ haut), 3 fois consécutivement suivi d'un blanc également analysé 3 fois et de répéter 3 fois cette séquence. Le taux de contamination doit être inférieur au CV de répétabilité. En cas de contamination inter-échantillon, il appartient à chaque laboratoire de définir des règles de repasse des échantillons suivants. La stabilité des réactifs est indiquée par le fournisseur (une traçabilité des dates d'utilisation et de péremption de ces réactifs ainsi que des lots réactifs doit être mise en place). Pour les solutions préparées par le laboratoire la stabilité des réactifs est évaluée par le suivi des CIQ. L'existence de valeur de références pour la majorité des ACN ne constitue qu'une aide à l'interprétation, le plus important étant l'analyse du profil dans son ensemble.

Évaluation de la qualité et suivi de performances

Contrôles internes de qualité

Il est nécessaire d'encadrer chaque série par l'analyse d'un ou plusieurs niveaux de CIQ. Il peut s'agir de CIQ commerciaux : dans ce cas, il existe différentes propositions intégrant la variété des matrices (buvard, sérum). Il peut également s'agir de pools « maison », surchargés ou non. Les règles d'acceptation ou de rejet des CIQ permettant de valider ou non la série sont celles définies dans le processus qualité du laboratoire. Dans chaque cas, il

convient de vérifier les valeurs-cibles et écarts-types pour chaque composé au cours d'une période probatoire avant d'utiliser un nouveau lot de CIQ. La durée et le nombre d'échantillons analysés au cours de la période probatoire est laissé à l'appréciation de chaque laboratoire, en fonction de son organisation.

Évaluation externe de la qualité

En plus des programmes d'EEQ quantitatifs précédemment décrits, il existe des programmes qualitatifs permettant aux participants d'évaluer leurs performances en termes d'interprétation diagnostique (ERNDIM *Acylcarnitines in Dried Blood Spots*). Chaque laboratoire doit participer à un programme d'EEQ adapté à sa pratique et à son mode de rendu des résultats.

Suivi de performances

Le suivi de la fidélité intermédiaire, de l'exactitude, de l'incertitude de mesure, l'analyse de la conformité des EEQ et le taux de CIQ rejetés peuvent être utilisés pour le suivi des performances de la méthode (*Encadré 4*).

Étape post-analytique

Délai de rendu

En contexte d'urgence (demande motivée par un métabolicien senior), le profil des ACN doit être rendu dans les 2 à 3 jours qui suivent le prélèvement. En dehors de ce contexte, il convient de réaliser l'analyse dans les quinze jours suivant le prélèvement. Ceci prend en compte la conservation des ACN précédemment évoquée.

Modalités de rendu

Tout compte-rendu doit comporter au minimum un commentaire formulé par un biologiste habilité, issu d'une étude systématique du profil au moment de la validation biologique. L'élaboration de ce commentaire se fonde sur la confrontation des résultats quantitatifs et des intervalles de référence applicables (données de la littérature et/ou vérifications du laboratoire). Certains ratios peuvent aider à l'interprétation des résultats. Un laboratoire peut choisir de faire figurer ou non sur le compte-rendu tout ou partie des résultats de quantification selon l'allure du profil obtenu.

Causes d'erreur/Interférences/Sources de variation du profil

En dehors des maladies héréditaires du métabolisme, de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques peuvent entraîner des variations attendues du profil des ACN et compliquer son analyse. Il faut également prendre en compte lors de l'interprétation les traitements en cours au

Encadré 4

Recommandations analytiques

<p>Etalonnage</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mélange d'étalons internes deutérés titrés « maison » ou commerciaux • Gamme de calibration externe « maison » <p>Extraction</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout d'un solvant organique contenant les étalons internes • Agitation à température ambiante pendant 20 minutes • Evaporation sous azote entre 50°C et 60°C pendant 20 à 30 minutes <p>Dérivation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout du réactif et incubation à 60°C pendant 15 minutes • Evaporation sous azote entre 50°C et 60°C pendant 20 à 30 minutes <p>Reprise des extraits secs</p> <p>Analyse en spectrométrie de masse en tandem</p> <ul style="list-style-type: none"> • Avec ou sans séparation chromatographique préalable • Double acquisition : mode ion parent et mode MRM <p>Evaluation de la qualité</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utilisation de CIQ adaptés aux matrices utilisées et encadrant la série • Le CIQ le plus concentré doit être analysé en fin de série • Participation du laboratoire à des programmes d'EEQ qualitatifs et quantitatifs 	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Technique sans dérivation</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Technique avec dérivation</p> </div> </div>
--	---

Encadré 5

Recommandations post-analytiques

Délai de rendu

- En contexte d'urgence : dans les 48 à 72h suivant le prélèvement.
- Hors contexte d'urgence : < 15 jours.

Modalités de rendu

- Commentaire formulé par un biologiste habilité après étude systématique du profil +++.
- Comparaison des résultats de quantification avec les normes en vigueur au laboratoire, et calcul et interprétation des rapports molaires spécifiques de pathologies.
- Le résultat quantitatif peut apparaître ou non dans le compte-rendu.

moment du prélèvement. Pour ces raisons, toute demande doit être accompagnée d'un formulaire de renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques. La présence d'une hémolyse, d'un ictère ou d'un trouble ne sont pas sources d'interférences techniques. La lactescence peut être une cause d'interférence biologique, à confronter aux circonstances de prélèvement (prélèvement non à jeun). Une hémolyse macroscopique peut induire des variations significatives : le relargage de composés intracellulaires fournit un profil intermédiaire se rapprochant du profil obtenu sur buvard (*Encadré 5*).

Remerciements. Les auteurs remercient les relecteurs : Claude Bendavid, Jean-François Benoist, Samir Mesli, Chris Ottolenghi et Odile Rigal.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. van Rijt WJ, Koolhaas GD, Bekhof J, Heiner Fokkema MR, de Koning TJ, Visser G, *et al.* Inborn errors of metabolism that cause sudden infant death: a systematic review with implications for population neonatal screening programmes. *Neonatology* 1995 ; 109 : 297-302.
2. Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJA. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders. *Annu Rev Physiol* 2016 ; 78 : 23-44.
3. Vaidyanathan K, Narayanan MP, Vasudevan DM. Organic acidurias: an updated review. *Indian J Clin Biochem* 2011 ; 26 : 319-25.
4. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system-executive summary. *Pediatrics* 2006 ; 117 : S296-307.
5. Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med* 2008 ; 10 : 151-6.
6. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 1797-817.
7. 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* 1995 ; 41 : 1109-14.
8. Groupe de travail qualité – Commission technique AFDPHE. Guide pour l'accréditation des laboratoires de dépistage néonatal selon la norme NF EN ISO 15189, 2014.
9. Briand G, Acquaviva C. Pré-analytique et profil des acylcarnitines. Journée qualité SFEIM 2016. www.sfeim.org/content/centre-documentaire.

10. Osorio JH. Effect of anticoagulant type during the blood sample collection process on the determination of the acylcarnitine profile in blood and plasma. *Biosalud* 2010 ; 9 : 9-13.
11. Corne C, Van Noolen L. Influence de l'EDTA et profil des acylcarnitines. Journée qualité SFEIM 2017. www.sfeim.org/contenu/centre-documentaire.
12. Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel P, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta* 2003 ; 327 : 47-57.
13. Fingerhut R, Ensenaer R, Röschinger W, Arnecke R, Olgemöller B, Roscher AA. Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Anal Chem* 2009 ; 81 : 3571-5.
14. Basley M, Nowoczyn M, Dessein AF. Vers l'accréditation des acylcarnitines. Journée qualité SFEIM 2018. www.sfeim.org/contenu/centre-documentaire.
15. Roe CR, Roe DS. Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultured human cells. *Mol Genet Metab* 1999 ; 68 : 243-57.
16. Norme NF EN ISO 15189. Exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale, décembre 2012.
17. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation Guidance for industry. FDA, 2018.
18. Giesbertz P, Ecker J, Haag A, Spanier B, Daniel H. An LC-MS/MS method to quantify acylcarnitine species including isomeric and odd-numbered forms in plasma and tissues. *J Lipid Res* 2015 ; 56 : 2029-39.