



HAL
open science

Contribution au profilage des acides organiques urinaires, chez l'enfant

Naira Pérez-Vásquez

► **To cite this version:**

Naira Pérez-Vásquez. Contribution au profilage des acides organiques urinaires, chez l'enfant. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112054 . tel-01217357

HAL Id: tel-01217357

<https://theses.hal.science/tel-01217357>

Submitted on 19 Oct 2015

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

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



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : LETIAM, Unité Universitaire Interdisciplinaire Lip (Sys)²

THESE DE DOCTORAT

CHIMIE

Par

Naira PEREZ VASQUEZ

**CONTRIBUTION AU PROFILAGE DES ACIDES ORGANIQUES
URINAIRES, CHEZ L'ENFANT**

Date de soutenance : 10/04/2015

Composition de jury :

Directeur de thèse :	Fathi MOUSSA	PU (Université Paris Sud)
Rapporteurs :	Marie-Claude MENET Didier THIEBAUT	MCU-HDR (Université Paris Descartes) D.R.CNRS (ESPCI ParisTech)
Examineurs :	Pedro ALMEIDA-DE-OLIVEIRA Thierry BILLETTE DE VILLEMEUR Myriam BONOSE Rémy COUDERC Sophie ROBIN	PU (Université Paris Sud) PU-PH (AP-HP / Université Paris 6) MCU (Université Paris Sud) Dr. HDR (AP-HP) Dr. (Société BIOEXIGENCE)

RESUME

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple quadripolaire (*GC-qMS*) est la technique la plus utilisée dans l'exploration des acides organiques urinaires dans le cadre du diagnostic des aciduries organiques (AO). Cependant, après analyse par *GC-MS* de plus de 1000 échantillons d'urines recueillis auprès d'enfants atteints de troubles neurologiques, moins de 0,5% d'entre eux ont reçu un diagnostic positif. Ceci témoigne de l'urgence de rechercher de nouveaux biomarqueurs dans le domaine des troubles neurologiques associés à des erreurs innées du métabolisme (EIM).

L'objectif principal de cette thèse a été de développer une nouvelle méthode d'analyse des échantillons urinaires par chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (*GCxGC-qMS*) et d'évaluer son apport dans le profilage métabolique de ces échantillons. Par ailleurs, dans le cadre du diagnostic des AO, dans un objectif de simplification de la procédure de préparation de l'échantillon, nous avons évalué une autre approche d'analyse directe en temps réel couplée à la spectrométrie de masse « *DART-MS* » des acides organiques urinaires.

La première étape de notre travail a été de développer un protocole de préparation de l'échantillon compatible avec une méthode de séparation bidimensionnelle. Puis, grâce à l'étude systématique des différentes conditions de séparation, nous avons développé une méthode par *CGxCG-qMS* parfaitement adaptée à la séparation des composés extraits.

Après validation analytique, la méthode proposée a été ensuite évaluée par le profilage des composés organiques présents dans des échantillons urinaires prélevés chez des volontaires sains. Par rapport aux profils obtenus par une méthode par *GC-qMS* classique, optimisée, les profils chromatographiques obtenus par la méthode proposée présentent une sensibilité et une résolution nettement plus élevées. Ceci se traduit par la détection en *GCxGC-qMS* de nombreux composés supplémentaires, jusqu'à 92, selon les échantillons. Parmi les composés supplémentaires détectés et caractérisés, certains sont d'un intérêt diagnostique reconnu.

Malgré les difficultés liées à l'étape de préparation de l'échantillon et au traitement des données, l'ensemble des résultats obtenus par la méthode proposée sur de nombreux échantillons urinaires a confirmé les potentialités et la nécessité d'utiliser la chromatographie bidimensionnelle dans le domaine de la découverte de candidats biomarqueurs. Il s'agit maintenant de poursuivre l'identification des composés supplémentaires détectés dans les échantillons urinaires étudiés et d'appliquer la

méthode proposée à un plus grand nombre d'échantillons témoins et pathologiques afin d'essayer d'identifier des candidats biomarqueurs.

Enfin, les essais préliminaires par la technique *DART-MS*, effectués dans un laboratoire de la Direction des Applications Militaires (DAM) du CEA, ont été axés sur la détection d'un panel d'acides organiques représentatifs des différentes anomalies rencontrées lors des AO. Malgré les effets de suppression ionique qui restent à éliminer, les résultats obtenus montrent que cette approche mérite d'être approfondie.

ABSTRACT

Among inherited metabolic diseases, organic acidemia (OA) or organic aciduria is characterized by urinary excretion of abnormal amounts or types of organic acids. OA is mostly associated with genetic conditions resulting in a specific step of amino acid catabolism dysfunction. Such alterations can produce disease states that range from mild to lethal neurological involvement.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) remains the most used analytical technique for detecting specific urinary organic metabolites related to OA. However, after analyzing more than 1,000 urine samples collected from children with neurological disorders, by this technique less than 0.5% of them were positive. Thus, the discovery of new biomarker candidates for other metabolic diseases is urgently needed.

The main objective of this thesis was to evaluate a new method using two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCxGC-MS) for the both qualitative and quantitative metabolic profiling of children's urine. As compared to GC-MS, GCxGC-MS shows great resolution power and high peak capacity. For this purpose, we first developed a GCxGC-MS method with an appropriate sample preparation protocol for urinary organic acids profiling. Applied to urine samples of healthy children and children with neurological disorders, the proposed method showed high sensitivity and peak capacity thus opening new possibilities for the characterization of new biomarker candidates. For instance, by this technique, we were able to detect in urines samples more than ninety additional compounds, which are not detected by a conventional GC-MS method. However, taken together the obtained results show that while the GCxGC technique has unmatched power to separate compounds in a complex mixture, the sample preparation protocol remains a limiting step for the precise quantification of the detected compounds.

On another hand, in order to reduce the sample preparation step, we evaluated the direct analysis in real time (DART) method for the urinary organic acids screening. The obtained results are very promising.

A ti PAPIITO,
A mon père,

Mon ange qui me protège toujours depuis le ciel, je suis sûre qu'il est très fier de moi.

A ti MAMITA,
A ma mère,

Sans ton aide, ni ton courage je n'aurais pas pu venir en France pour faire mes études, c'est grâce à tes efforts que j'en suis arrivée là. TE AMO MAMITA BELLA, tu es ma force et mon courage.

A ti ÑAÑITA y a ti TIITA,
A ma sœur et ma tante,

Pour votre amour, votre compréhension, et vos encouragements qui me donnent l'énergie de continuer. Vous êtes mon inspiration et je serais toujours là pour vous.

A ti mi CORAZONCITO,
A mon petit cœur,

Pour ton amour, ta patience, ton aide et ton soutien surtout pendant ces derniers mois. Je suis heureuse avec toi à mes côtés. Je t'aime !

REMERCIEMENTS

Ce doctorat a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE entre la société BIOEXIGENCE et le laboratoire LETIAM. Je tiens à remercier d'une part, mon directeur de thèse, le Pr. Fathi MOUSSA également directeur de LETIAM pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir suivi tout au long de ma thèse avec ces précieux conseils. D'autre part, je souhaite remercier le Dr. Carol COURDEROT-MASUYER et la société BIOEXIGENCE pour m'avoir soutenu et financé ces trois années de recherche.

Je tiens sincèrement à remercier le Dr. Myriam BONOSE pour m'avoir encadré et guidé tout au long de ce travail. Merci pour ton investissement, ta gentillesse, ta disponibilité et d'avoir été si souvent à mon écoute. Nous avons pu également partager d'agréables moments dans d'autres domaines comme le sport et le bricolage... Merci pour tous ces bons moments tant personnellement que professionnellement, je t'en suis extrêmement reconnaissante.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de mon jury, spécialement M. Didier THIEBAUT, Directeur de recherche CNRS et Mme. Marie Claude MENET, Maître de conférences à l'université Paris Descartes, qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux, ainsi qu'à Mme. Sophie ROBIN, chercheur à la société BIOEXIGENCE; M. Pedro ALMEIDA de OLIVEIRA, Professeur à l'Université Paris Sud; M. Thierry BILLETTE de VILLEMEUR, Professeur à l'Université Paris 6 et Chef de service en Neuropédiatrie à l'Hôpital Armand Trousseau; M. Remy COURDEC, Chef de service en biochimie à l'Hôpital Armand Trousseau pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Nathalie LEVEQUE pour m'avoir encadré et transmis ses connaissances scientifiques tout au long de la première année de thèse.

Plusieurs collaborations ont pu être effectuées:

Tout d'abord, avec le service Biochimie de l'hôpital Armand Trousseau où je remercie à nouveau M. Remy COURDEC pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire

et Mme Elizabeth THIOULOUSE pour m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à l'aboutissement de mon travail.

J'adresse également mes remerciements à M. Maxime BRIDOUX, Ingénieur-chercheur au Commissariat de l'Energie Atomique (CEA); Mme. Isabelle RIVALS, Maître de conférences à l'ESPCI et M. Jérôme VIAL, Maître de conférences à l'ESPCI pour vos importantes contributions.

Je remercie tout le reste de l'équipe du laboratoire LETIAM qui a participé d'une manière ou d'une autre à ma réussite. Merci Sylvie pour tes bons conseils et ton soutien surtout dans les moments où j'en avais le plus besoin. Merci Jeannot pour tes conseils, ton aide m'a été très précieuse principalement en ce qui concerne la chromatographie en phase gazeuse. Merci Pr. Alain Tchaplà et Marine pour m'avoir toujours apporté une réponse à mes questions. Merci Philippe pour ton aide principalement avec le matériel. Merci Yvonne pour ta gentillesse. Merci à mes camarades Dorra, Pierre, Murphy et Arnaud pour votre amitié, convivialité, encouragements et pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Merci aux nouveaux arrivés, Graziely, Sanaz et Aurélien pour avoir partagé avec moi ces derniers moments au labo.

Je suis également reconnaissante pour le chaleureux accueil que m'a réservé l'ensemble du personnel du service de Biochimie à l'hôpital Armand Trousseau.

Je remercie enfin toute ma famille même si elle se trouve loin de moi en ce jour si spécial et je tiens à dire merci à ma nouvelle famille, Yvette, Didier et Jonathan que j'ai eu la chance de trouver ici.



SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ACIDEMIES ORGANIQUES	
I.1 Les erreurs innées du métabolisme.....	6
I.2. Les acidémies organiques.....	8
I.2.1.Prévalence.....	8
I.2.2. Transmission génétique.....	9
I.2.3. Origines des troubles.....	10
I.2.4. Manifestations cliniques.....	14
I.2.5. Diagnostic : acides organiques.....	15
I.2.6. Stratégies d'évaluation.....	20
I.2.7. Traitement.....	21
Références bibliographiques.....	25
CHAPITRE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC DES ACIDEMIES ORGANIQUES	
II.1. La chromatographie en phase gazeuse.....	33
II.1.1. Gaz vecteur.....	35
II.1.2. Système d'injection.....	35
II.1.3. Système séparatif.....	37
II.1.4. Détection.....	38
II.2. Couplage avec la spectrométrie de Masse (GC-MS).....	39
II.2.1. Système d'introduction de l'échantillon.....	39
II.2.2. Source d'ionisation.....	40
II.2.3. Analyseur quadripolaire.....	42
II.3. Applications de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à l'analyse des acides organiques.....	44
II.3.1. Préparation d'échantillons.....	44

II.3.1.1. Echantillon urinaire.....	45
II.3.1.2. Extraction.....	46
II.3.1.3. Dérivation.....	47
II.3.2. Analyses actuelles en chromatographie en phase gazeuse.....	48
II.4. La chromatographie gazeuse bidimensionnelle.....	52
II.4.1. Principe.....	52
II.4.2. Système de chromatographie gazeuse bidimensionnelle.....	55
II.4.2.1. Modulation.....	55
II.4.2.2. Colonnes.....	60
II.4.2.3. Détection.....	62
II.4.3. Applications de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle à l'analyse des acides organiques.....	65
Références bibliographiques.....	67

CHAPITRE III. MATERIELS ET MÉTHODES

III.1. Echantillon urinaire.....	79
III.2. Protocole de préparation de l'échantillon.....	80
III.2.1. Dilution urinaire.....	80
III.2.2. Extraction des acides organiques.....	81
III.2.3. Dérivation.....	81
III.3. Méthodes d'analyses	83
II.3.1 Chromatographie en phase gazeuse.....	83
II.3.2 Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle.....	84
II.3.3 Spectrométrie de masse.....	86
III.4. Acquisition et traitement des données.....	86
III.5. Procédure de validation de méthode.....	87

CHAPITRE IV. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES PAR GCxGC-MS

IV.1. Développement d'une méthode de dosage des acides organiques par GCxGC-MS.....	92
--	----

IV.1.1. De la GC-MS vers la GCxGC-MS.....	92
IV.1.2. Développement de la méthode GCxGC.....	96
IV.1.2.1. Modulation.....	96
IV.1.2.2. Programmation de température.....	98
IV.1.2.3. Combinaison de colonnes.....	102
IV.1.2.4. Procédure d'élimination de l'urée.....	107
IV.1.3. Détection par spectrométrie de masse.....	113
IV.1.4. Stabilité de l'échantillon.....	114
IV.2. Comparaison qualitative de la méthode GCxGC-MS à une méthode GC-MS classique.....	116
IV.2.1. Comparaison des profils urinaires: GC-MS Vs GCxGC-MS.....	116
IV.2.2. Métabolites urinaires détectés.....	120
IV.3. Quantification.....	127
IV.3.1. Essais préliminaires.....	127
IV.3.2. Développement de la méthode de préparation de l'échantillon...	128
IV.3.3. Validation de la méthode GCxGC-MS.....	130
IV.3.3.1. Linéarité.....	131
IV.3.3.2. Fidélité intermédiaire.....	132
IV.3.3.3. Limites de détection et quantification.....	133
IV.3.4. Application à l'acide quinolinique.....	134
IV.3.4.1. L'acide quinolinique et la neuro-dégénérescence.....	134
IV.3.4.2. Quantification de l'acide quinolinique urinaire chez l'enfant.....	137
IV.4. Comparaison de profils: résultats préliminaires.....	140
IV.4.1. Comparaison de chromatogrammes: Logiciel GC-LC Concordance.....	141
IV.4.2. Comparaison de cartes graphiques: Collaboration ESPCI.....	145
Références bibliographiques.....	151

CHAPITRE V. ANALYSE DIRECTE EN TEMPS REEL « DART » DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

Introduction.....	160
V.1 Introduction à l'analyse directe en temps réel « DART».....	161
V.1.1. La source d'ionisation « DART».....	161
V.1.2. Les mécanismes d'ionisation.....	162
V.1.2.1. Ionisation positive.....	163
V.2.2. Ionisation négative.....	164
V.1.3. Le DART et le métabolome humain.....	165
V.2. Instrumentation.....	165
V.2.1. Introduction de l'échantillon.....	165
V.2.2. Source d'ions « DART »	165
V.2.3. LTQ - Orbitrap XL.....	167
V.3. Développement d'une méthode d'analyse directe en temps réel «DART»...	167
V.3.1. Echantillons.....	167
V.3.2. Détectabilité des acides organiques.....	170
V.3.3. Application aux échantillons urinaires d'enfants.....	173
V.3.3.1 Approche qualitative.....	173
V.3.3.2. Approche quantitative.....	175
Conclusion.....	179
Références bibliographiques.....	180
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	183
ANNEXES.....	188
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	197
ABREVIATIONS.....	204

INTRODUCTION GENERALE

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) demeure la technique analytique la plus utilisée pour l'étude de composés organiques urinaires. Cette méthode d'analyse est incontournable pour les analyses qualitatives et quantitatives de métabolites urinaires spécifiquement liés à de nombreuses erreurs innées du métabolisme (EIM), notamment l'acidémie organique (AO).

L'acidémie organique est caractérisée par la présence ou l'augmentation des quantités d'acides organiques éliminées dans les urines. Selon l'Association d'Acidémies Organiques (OAA), l'acidémie organique peut affecter environ une naissance sur 5000. Elle est associée à des mutations génétiques conduisant à un déficit enzymatique responsable du dysfonctionnement spécifique d'une étape du catabolisme des acides aminés. Le blocage de la voie métabolique produit, dès lors, une accumulation des acides organiques dans les fluides biologiques, notamment le sang et l'urine.

L'accumulation des acides organiques dans les fluides biologiques conduit généralement à l'altération de l'équilibre acido-basique et des voies du métabolisme intermédiaire. Ces modifications peuvent générer des états pathologiques qui vont de l'atteinte neurologique légère à des états pathologiques graves pouvant entraîner le décès. Dans certains cas, le pronostic et le développement des enfants atteints dépendent d'un diagnostic précoce et précis, suivi d'une intervention thérapeutique appropriée.

Si les symptômes cliniques peuvent suggérer, parfois, un diagnostic spécifique qui peut être confirmé par des tests métaboliques de dépistage de routine ou par des tests plus spécifiques, il n'en est pas de même dans la majorité des cas.

En effet, après analyse par GC-MS de plus de 1000 échantillons d'urine recueillis auprès d'enfants atteints de troubles neurologiques, hospitalisés à l'hôpital Armand Trousseau-La Roche-Guyon (Assistance Publique Hôpitaux de Paris), moins de 0,5% d'entre eux ont reçu un diagnostic positif. Ceci témoigne de l'urgence de rechercher de nouveaux biomarqueurs dans le domaine des troubles neurologiques.

De nos jours, le profilage du métabolome urinaire est une approche incontournable pour la découverte de nouveaux candidats biomarqueurs des troubles métaboliques. L'utilisation des techniques classiques de séparation comme la GC-MS pour mener cette

recherche est une tâche difficile, car le milieu urinaire est un mélange complexe contenant des centaines, voire des milliers, de composés de natures différentes, à des concentrations très variées. Dès lors, l'utilisation d'une méthode de séparation plus efficace telle que la chromatographie gazeuse multidimensionnelle devrait faciliter la tâche. Par rapport à la *GC*, la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (*GCxGC*) se caractérise par une grande puissance de résolution et une capacité de pic élevée. De ce fait, la séparation des constituants d'un mélange complexe par cette méthode, couplée à une détection par spectrométrie de masse, ouvre de nouvelles possibilités pour améliorer la caractérisation de l'échantillon global.

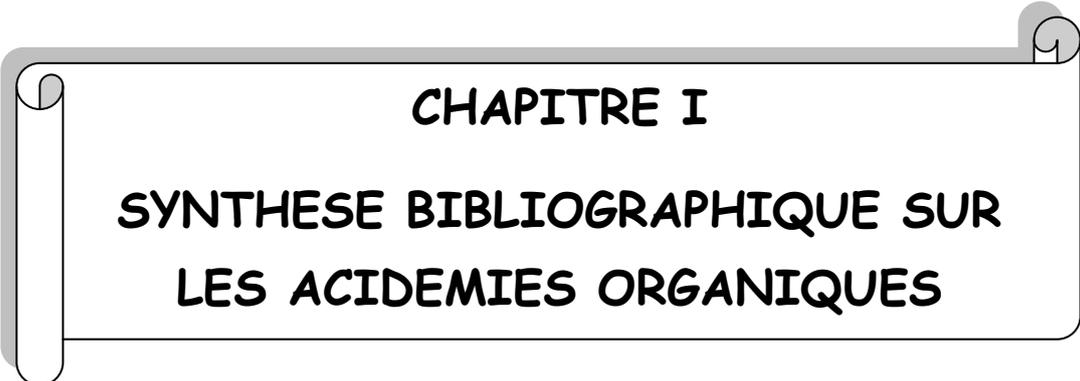
L'objectif principal de cette thèse a été d'évaluer l'apport de la *GCxGC-MS* dans le profilage métabolique des échantillons urinaires. Par ailleurs, dans un objectif de simplification de la procédure et de gain de temps, notamment en évitant les étapes longues et fastidieuses de préparation de l'échantillon, une approche d'analyse directe en temps réel couplée à la spectrométrie de masses (*DART-MS*), des acides organiques urinaires, sera aussi évaluée.

La première partie de cet exposé sera consacrée au rappel bibliographique de quelques notions concernant les erreurs innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques, notamment les acidémies organiques. Dans cette partie, nous rappellerons aussi les méthodes actuelles de dosage des acides organiques urinaires, notamment par *GC-MS*.

Dans la deuxième partie, nous exposerons nos travaux dédiés au développement d'une méthode de dosage par *GCxGC-MS*, ainsi que les résultats de l'étude comparative *GCxGC-MS* versus *GC-MS*.

La troisième partie sera consacrée aux essais préliminaires de l'analyse directe en temps réel couplée à la spectrométrie de masse, des acides organiques urinaires.

La dernière partie, enfin, sera dédiée à la conclusion et aux perspectives ouvertes par ce travail.



CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR
LES ACIDEMIES ORGANIQUES

I.1 Les erreurs innées du métabolisme

I.2. Les acidémies organiques

I.2.1. Prévalence

I.2.2. Transmission génétique

I.2.3. Origines des troubles

I.2.4. Manifestations cliniques

I.2.5. Diagnostic : acides organiques

I.2.6. Stratégies d'évaluation

I.2.7. Traitement

« Les erreurs innées du métabolisme sont un groupe de maladies complexes et hétérogènes, qui généralement sont le produit d'une activité déficiente dans une voie métabolique. Elles sont causées par la mutation de l'ADN qui produit une modification de la structure des protéines et altère sa fonction. Ces troubles biochimiques, lorsqu'ils affectent des protéines enzymatiques vitales, peuvent donner lieu à des déséquilibres chimiques importants pour l'organisme. Les métabolites intermédiaires formés s'accumulent de manière anormale dans cette voie métabolique et provoquent de manière précoce des signes et symptômes visibles. Souvent, ces métabolites intermédiaires produisent comme effet, soit une neuro-toxicité directe, soit des altérations secondaires de l'équilibre acido-basique comme dans les acidémies (ou aciduries) organiques. »

I.1. LES ERREURS INÉES DU MÉTABOLISME

En 1902, Sir A. Garrod décrit pour la première fois les signes cliniques d'une maladie métabolique, "l'alkaptonurie". Il observe que la pathologie suit une distribution familiale et il conclut que certaines maladies, affectant l'individu tout au long de sa vie, surviennent parce que l'activité d'une enzyme impliquée dans le métabolisme intermédiaire est totalement ou partiellement déficitaire. Depuis ce moment-là le concept d'erreur innée du métabolisme est né [*Shoemaker et Elliott, 1991*]. Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont un groupe de maladies complexes et hétérogènes, qui généralement sont le produit d'une activité déficiente dans une voie métabolique. Elles sont causées par la mutation de l'ADN qui produit une modification de la structure des protéines et altère sa fonction. Ces troubles biochimiques, lorsqu'ils affectent des protéines enzymatiques vitales, peuvent donner lieu à des déséquilibres chimiques importants pour l'organisme. Au sein du système nerveux, ces modifications peuvent donner lieu à une détérioration graduelle du sujet ou provoquer de crises soudaines. Les conséquences cliniques de ce type de maladie sont souvent très graves et peuvent être une cause de mortalité et de morbidité, surtout en bas âge [*Liebich et Forst, 1990; Prieto et al, 2007; Bonafé et al, 2011*]. Le développement des symptômes et signes cliniques de ces maladies dépend beaucoup de la nature du défaut biochimique. En général, quand le déficit enzymatique est au début de la voie métabolique, l'accumulation du composant nutritionnel ne provoque pas d'observations cliniques précoces. Tandis que si le défaut est plus éloigné, les métabolites intermédiaires s'accumulent dans cette voie en quantité anormale, et provoquent de manière précoce des signes et symptômes visibles. Souvent, les métabolites intermédiaires sont ceux qui produisent comme effet, soit une neuro-toxicité directe, soit des altérations secondaires de l'équilibre acido-basique comme dans les acidémies (ou aciduries) organiques [*Liebich et Forst, 1990*].

Les maladies métaboliques héréditaires considérées individuellement, sont peu nombreuses, mais la plupart sont décrites dans la littérature. Il y a environ 500 maladies métaboliques héréditaires nommées comme l'EIM [*Ricquier, 2005*]. Il est probable que l'incidence de ces erreurs innées soit sous-estimée, parce que quelques-

unes d'entre elles restent sans diagnostic ou ne sont pas détectées. Les EIM constituent environ un tiers des maladies génétiques d'étiologie connues et peuvent toucher tous les organes. Ces maladies chez l'enfant ont une incidence globale entre 1:2000 et 1:4000, selon une étude réalisée en 2011 [Bonafé et al, 2011].

Les EIM peuvent se classer en trois groupes principaux selon la fonction affectée :

- * Groupe 1: Dans ce groupe, sont incluses les maladies altérant la synthèse et le catabolisme des molécules complexes. Les symptômes sont permanents, progressifs, indépendant d'un procès inter-récurrent et ne sont pas mis en relation avec l'ingestion des aliments. Dans ce groupe, on retrouve toutes les maladies lysosomales, les maladies peroxysomales, les maladies de transport et de communication intercellulaire.
- * Groupe 2: Ce groupe intègre les troubles qui provoquent une intoxication aiguë et progressive par l'accumulation de composés toxiques proches du lieu de blocage métabolique. Cela comprend les aminoacidopathies, la plupart des aciduries organiques, les défauts innés de l'urée et les intolérances aux sucres.
- * Groupe 3: Ce groupe comprend des EIMs avec les symptômes dus à une déficience dans la production ou l'utilisation de l'énergie. Dans ce cas, l'organisme ne dispose pas de l'énergie nécessaire pour son fonctionnement normal, et il apparaît une faille multi-organique générale. Dans ce groupe se trouvent les défauts de glycogénoses, les acidémies innées lactiques, les troubles de l'oxydation des acides gras et les maladies de la chaîne respiratoire mitochondriale [Ricquier, 2005; Martins, 1999].

Les EIMs sont des altérations monogénétiques qui font qu'un sujet est génétiquement anormal en un seul de ses 50 000 gènes. Ces maladies sont considérées comme une spécialité pédiatrique car une partie de ces maladies se produisent, soit de

façon aigüe chez le nouveau-né, soit comme trouble de croissance ou retard de développement chez l'enfant. Les EIMs peuvent se diagnostiquer par la présence de certains métabolites dans l'urine, tels que les acides organiques, les acylcarnitines, les aminoacides, etc. [Bonafé et al, 2011]. Si le diagnostic est précoce et précis, le traitement sera plus efficace et on pourra, le plus tôt possible, éviter ou retarder les séquelles, voire sauver la vie du patient [Liebich et Forst, 1990].

Nous avons focalisé notre travail sur le cas des acidémies (ou aciduries) organiques.

I.2. LES ACIDEMIES ORGANIQUES

Le corps est incapable de tolérer de grandes quantités d'ammoniac ou d'acides organiques parce qu'ils se comportent comme des poisons. Pour faire face à ce problème, il existe dans le foie des processus qui transforment ces toxines et les éliminent par l'urine. Les acides organiques sont la clé et quelque fois le produit final de nombreux métabolismes créant des substances endogènes comme exogènes : neurotransmetteurs, acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, acides gras, sucres; dont les métabolismes sont tous intriqués [Hoffman et al, 2003]. Ils sont produits continuellement dans l'organisme, on les retrouve également comme résidus métaboliques de certains microorganismes ainsi que dans certaines drogues et certains produits toxiques [Lehotay et Clarke, 1995]. Les troubles liés aux acides organiques sont appelés « aciduries organiques ou acidémies organiques » (AO). Il s'agit d'un important groupe d'EIM qui apparaît à cause d'une défectuosité dans les voies métaboliques intermédiaires d'aminoacides, des glucides, de la β -oxydation des acides gras [Sperl, 1993].

I.2.1. Prévalence

Les acidémies organiques sont rares individuellement mais nombreuses collectivement et sont les troubles métaboliques les plus fréquents dans la période

néonatale. Il y a plus de 100 erreurs innées du métabolisme dont beaucoup sont des aciduries organiques, environ cinquante maladies présentes durant la période néonatale [Saudubray et Charpentier, 2001]. Bien que les aciduries organiques soient très rares individuellement, il est admis que leur incidence est d'au moins 1/10 000 naissances [Saudubray, 1991]. Le sexe du malade n'est pas une caractéristique dans la prévalence des EIM [Choudhuri et al, 2006].

I.2.2. Transmission génétique

Les aciduries organiques sont héritées d'un mode autosomique récessif. Les parents d'un probant possèdent, chacun, au moins un allèle défectueux, et par conséquent, ils peuvent effectuer une seule copie de la mutation responsable de la maladie à leurs descendants. Les porteurs hétérozygotes sont asymptomatiques. À la conception, lorsque les deux parents sont porteurs hétérozygotes, chaque descendant a une chance de 25% d'être atteint, une chance de 50% d'être un porteur asymptomatique et une probabilité de 25% d'être non affecté et non porteur (Fig.I.1). Tous les descendants des personnes atteintes d'aciduries organiques sont obligatoirement porteurs et chacun de ses descendants a un risque d'être porteur à 50%.

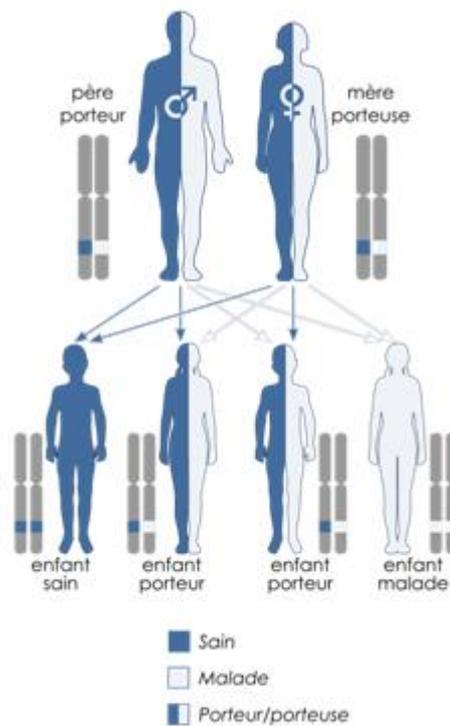


Figure I.1. Schéma de transmission autosomique récessif des aciduries organiques.

En utilisant des techniques de génétique moléculaire, il est possible de trouver la mutation qui produit l'acidurie organique chez le malade. Dans les désordres autosomiques récessifs, il est commun d'avoir deux mutations différentes. Cependant la détection du porteur peut être difficile si seulement une mutation a été identifiée [Menkes et al, 2006].

Il est convenable de définir un conseil génétique pour obtenir les risques potentiels concernant la future progéniture et d'identifier les options reproductives pour le porteur.

I.2.3. Origines des troubles

Les aciduries organiques proviennent de causes héréditaires. La majorité des désordres classiques résultent du catabolisme anormal de la chaîne ramifiée d'acides aminés ou de lysine. Les caractéristiques de quelques troubles sont résumées

dans le tableau I.1. Elles présentent la voie métabolique affectée de l'acide aminé et l'enzyme impliquée [Sheashore, 2014].

Tableau I.1. Troubles métaboliques en acidémies organiques causés par un catabolisme anormal d'acides aminés.

Maladie	Acide aminé dont la voie est affecté	Enzyme
Maladie de sirop d'érable (MSUD)	Leucine Isoleucine valine	Chaîne ramifiée de cétoacide deshydrogenase
Acidémie propionique	Isoleucine Valine Méthionine Thrénine	Propionyl CoA carboxylase
Acidémie méthylmalonique (MMA)	Isoleucine, Valine, Méthionine Thrénine	Méthyl malonique CoA mutase
Acidémie méthylmalonique et homocystinurie type cblC	Isoleucine, Valine, Méthionine Thrénine	MMACHC protéine
Acidémie isovalérique	Leucine	Isovaleryl CoA dehydrogenase
Déficiences biotine-insensible 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase	Leucine	3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase
Déficiences 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase (HMG-CoA)	Leucine	HMG-CoA lyase
Déficiences cétothiolase	Isoleucine	Mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase
Acidémie glutarique type I	Lysine Hydroxylisine Tryptophane	Glutaryl CoA deshydrogenase

Les aciduries organiques se caractérisent par l'accumulation d'acides organiques dans les tissus et les liquides biologiques : plasma, liquide céphalorachidien (LCR), liquide amniotique, humeur aqueuse et particulièrement l'urine. Cette accumulation anormale est due à la déficience d'une enzyme sur l'une des voies métaboliques. Les acides organiques sont donc accumulés dans le plasma et excrétés en grandes quantités dans les urines. Les métabolites sont excrétés grâce à leur solubilité dans l'eau [Ozand et Gascon, 1991; Narayanan et al, 2011], le diagnostic biologique est donc plus facile à effectuer au niveau urinaire [Saudubray, 1991].

Plus communément, les aciduries organiques entourent principalement les enzymes de deux voies métaboliques principales : l'une d'entre elles est l'étape de dégradation des acides aminés et l'autre correspond à la β -oxydation des acides gras [Rowland et Pedley, 2010].

Pendant le processus du métabolisme des protéines, chaque aminoacide utilise une voie métabolique où intervient une série d'enzymes tout au long du processus. Chaque enzyme est essentielle pour convertir une substance en une autre. Dans le cas où les enzymes sont défailtantes, les produits s'accumulent au niveau d'un point de blocage et deviennent nocifs pour l'organisme. L'acide organique qui s'accumule à cet endroit de la voie métabolique peut donner son nom au dysfonctionnement associé.

Dans la figure I.2 on visualise un exemple de blocage métabolique qui peut avoir lieu sur le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. Ce cycle est une des voies métaboliques les plus importantes chez l'être vivant. Dans le cycle de Krebs, il peut y avoir des blocages dans n'importe quelle étape intermédiaire, tout dépend du défaut génétique qui se produit dans l'organisme de l'enfant. L'exemple concerne la déficience de l'enzyme α -cétoglutarase deshydrogénase qui par conséquence produit l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique. Si cette accumulation s'accompagne d'une augmentation des concentrations de l'acide lactique et l'acide glutarique, il s'agit dans ce cas de l'acidurie oxoglutarique.

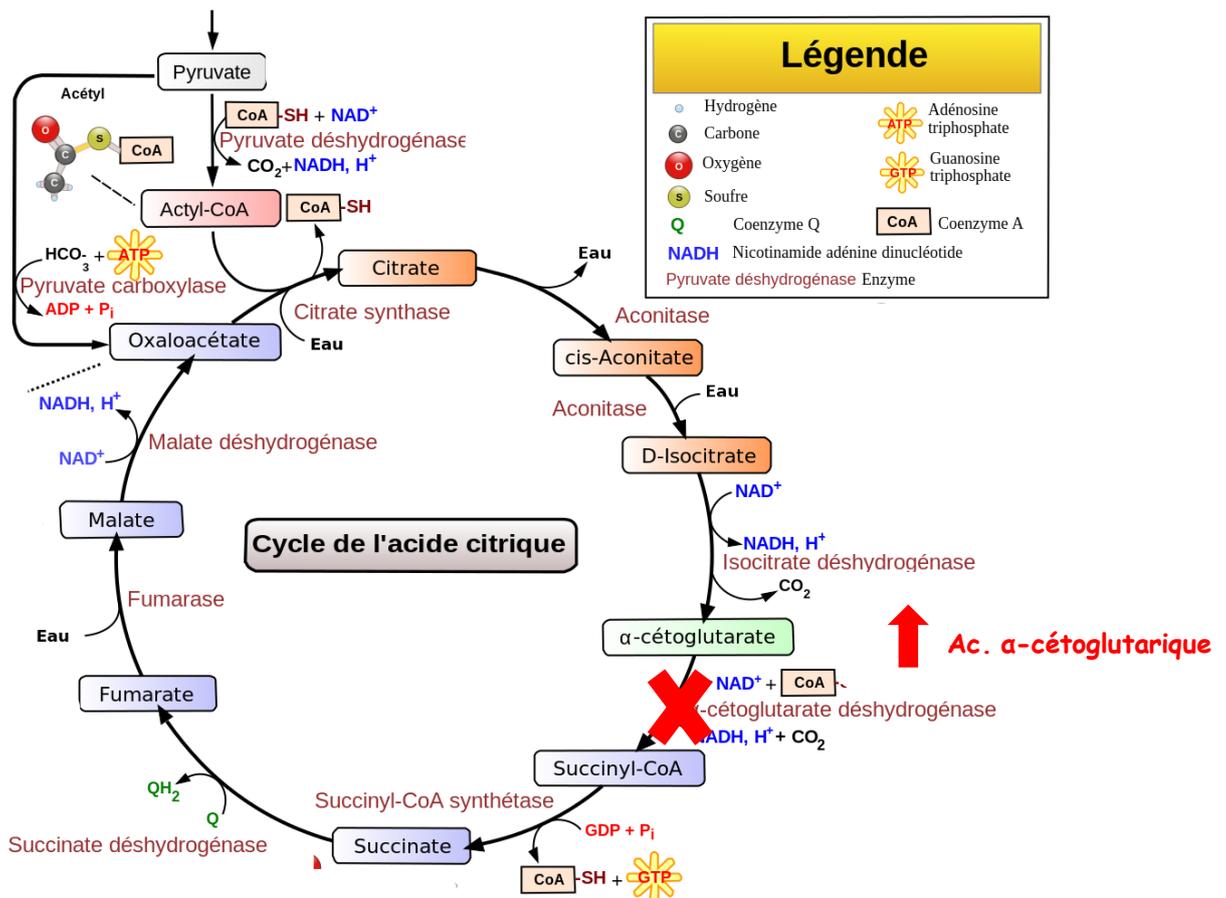


Figure I.2. Cycle métabolique du Krebs ou cycle de l'acide citrique. Exemple de blocage dans la voie métabolique due à une déficience enzymatique, produisant une accumulation du produit intermédiaire (acide α -cétoglutarique).

L'augmentation de la concentration en produits intermédiaires dans un bloc métabolique peut conduire à une intoxication. D'autres anomalies résultent d'une diminution de la production d'énergie au niveau cellulaire: classe à laquelle appartiennent les déficits de l'oxydation des acides gras.

Les aciduries organiques classiques sont associées par défaut au catabolisme de la méthionine, la thréonine et à la chaîne ramifiée des aminoacides : leucine, isoleucine et valine. Les aciduries organiques incluent plus de 50 désordres différents et sont la plus fréquente cause d'encéphalopathies aiguës en bas âge.

I.2.4. Manifestations cliniques

L'âge ainsi que la forme de la présentation clinique varie d'un enfant à l'autre. Elle dépend aussi du degré d'accumulation toxique des substances. Les facteurs de l'environnement peuvent provoquer l'apparition et la gravité de la maladie comme par exemple, le régime alimentaire, les infections récurrentes, le jeûne, les drogues, etc [Vaidyanathan et al, 2011]. Les aciduries organiques sont plus fréquemment vues au sein des nouveaux nés et des enfants.

Le symptôme principal est la toxicité aigüe située dans le cerveau. L'enfant peut présenter : une mauvaise alimentation, un retard de développement, une hépatomégalie, des vomissements, des déshydratations, des hypotonies, des hypertonies, des tachypnées, une cytopénie, une ataxie, une hépatomégalie et des symptômes neurologiques : des convulsions et une léthargie progressant vers un coma et la mort [Seashore, 2014]. Des anomalies biochimiques sont également telles que: un déséquilibre d'acidose métabolique, des valeurs basses de bicarbonate, l'hyperammoniémie, l'hypoglycémie, l'acidémie lactique, la tryglycéridémie, des niveaux élevés d'acides gras et de cétones [Hommes, 1991]. Ces manifestations sont dues à une hyperproduction ou à une accumulation d'acides organiques intermédiaires qui inhibent les autres métabolismes [Lehotay et al, 1995].

Après l'auscultation, la reconnaissance des symptômes et les premières analyses, la décision doit être urgente puisque quelques aciduries organiques peuvent être soignées [Rowland et Pedley, 2010]. Les nourrissons présentent habituellement une somnolence, une respiration rapide et des vomissements. Occasionnellement, quelques années peuvent s'écouler avant que les enfants développent des symptômes. Un grand nombre de pathologies développées commencent par une crise dès la naissance, un bon pronostic peut être réalisé s'il y a une détection rapide et des mesures thérapeutiques adaptées. Lorsque les manifestations sont plus tardives, l'évènement grave est occasionné par des facteurs déclenchants, incluant des infections respiratoires banales, des vaccinations, un jeûne trop prolongé. Parfois la progression des signes neurologiques peut être le seul signe de la maladie. [Lehotay et al, 1995]. Les manifestations

chroniques sont, quant à elles, focalisées sur des retards mentaux [Chalmers et al, 1984]. Dans certains cas, les enfants émettent une odeur particulière dégagée par les acides nocifs, comme par exemple les enfants atteints d'acidurie isovalérique qui peuvent émettre une mauvaise odeur des pieds [Goodman et Markey 1981]. Certaines d'acidémies organiques bien délimitées cliniquement sont connues comme « Acidémies organiques cérébrales », où les manifestations neurologiques prédominent ou parfois sont même exclusives [Vaidyanathan et al, 2011]. Il s'agit notamment de la carence en glutaryl-CoA déshydrogénase (type de acidurie glutarique I), déficit en semi-aldéhyde succinique déshydrogénase (acidurie 4-hydroxybutyrate), l'acidurie mévalonique, l'acidurie N-acétylaspartique (maladie de Canavan) et l'acidurie L-2-hydroxyglutarique. Ces troubles sont souvent non diagnostiqués et leur incidence réelle est beaucoup moins bien connue que celle des acides organiques "classiques" [Hoffmann et al, 1994].

I.2.5. Diagnostic : acides organiques

Le diagnostic est basé sur les résultats de l'analyse des acides organiques dans les milieux biologiques. Les acides organiques sont caractérisés par la présence d'un groupement carboxylique (COOH) dont la formule générale est: "R-COOH". Groupement extrêmement répandu, il recouvre des molécules très diverses. Les acides gras, les prostaglandines, les leucotriènes, les catécholamines sont des acides organiques. Ils sont solubles dans l'eau et peuvent contenir différents groupements qui leurs donnent une polarité différente (amine, cétone, phényle, sulfure entre autres) [Saudubray, 1991] (Figure. I.3).

La classification des principaux types d'acides organiques présents dans différents milieux biologiques est indiquée en annexe I.1.

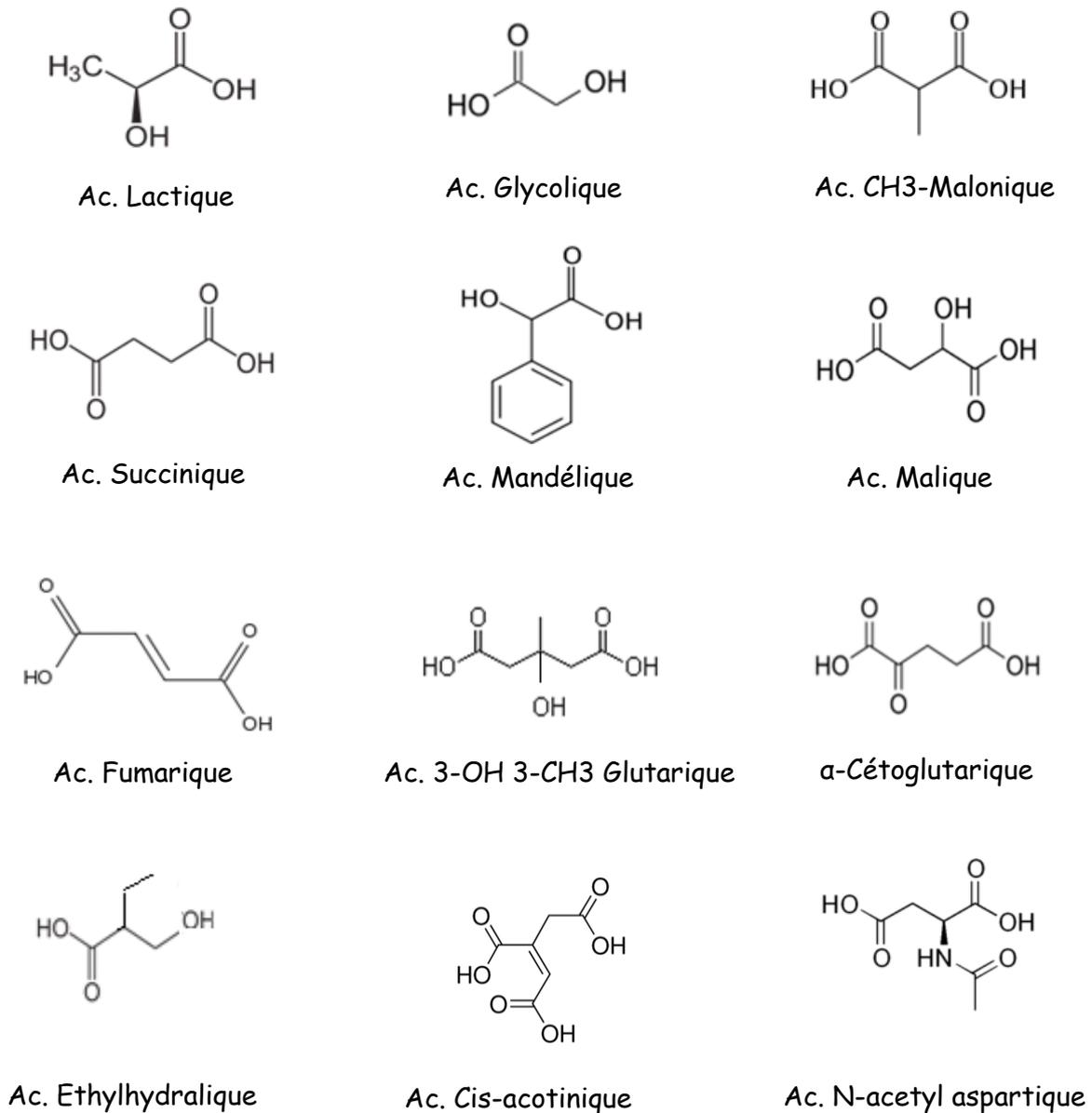


Figure I.3. Quelques structures des acides organiques

On retrouve principalement dans l'urine les acides organiques suivants: Les acides gras, les acides dicarboxyliques et les acides phénoliques.

La détection des acides organiques peut se faire dans différents milieux biologiques comme le sérum [Rifai, 1998; Hagen et Korson, 1999], le liquide amniotique

[*Nicholls et al, 1978; Gordon et al, 1980; Sweetman, 1987, Inoue et al, 2008*], mais l'urine est le milieu biologique très largement utilisé car il fournit une information importante pour l'état métabolique de l'organisme [*Watts, 1975; Nakagawa, 2010; Liebich et Gesele, 1999; Kaluzna et al, 2014*].

L'analyse du sang (plasma et sérum) et de l'urine sont traditionnellement utilisés pour le diagnostic des plusieurs maladies métaboliques. Ils fournissent des informations complémentaires sur l'état de l'organisme [*Maher et al, 2007*]. Mais l'urine présente des avantages par rapport au plasma : 1) L'urine peut être obtenue en grande quantité avec un échantillonnage non invasif et une répétition de l'échantillonnage ne pose pas de problèmes. 2) La préparation de l'échantillon est moins complexe car il contient une faible quantité de protéines [*Fernandez et Luque de Castro, 2012*].

Le sérum est utilisé dans le cas d'un diagnostic posé après décès ou d'anurie (diminution du volume d'urine). Une analyse du liquide céphalorachidien (LCR) pourrait être effectuée dans quelques cas particuliers comme le déficit en glutaryl coenzyme A déshydrogénase où le profil urinaire reste normal [*Lehotay et al, 1995*].

Le diagnostic est en général plus facile à mettre en œuvre lorsque les urines collectées sont obtenues lors d'une phase de décompensation métabolique aigüe. Plus de 200 acides organiques différents peuvent être excrétés dans l'urine. La confirmation du diagnostic nécessite des instruments performants comme : HPLC [*Al-Dirbashi et al, 2005; Ghoraba et al, 2014*], GC-MS [*Fu et al, 2000; Inoue et al, 2008*], la spectrométrie de masse [*Kimura et al, 1999*], l'analyse des dosages enzymatiques/ADN. La chromatographie en couche mince [*Bhatt et al, 1982*] et le test de DNPH (essai de dinitrophényl hydrazine) [*Narayanan et al, 2011; Strauss et al, 2013*] sont également utilisés lorsque les premiers ne sont pas disponibles, mais ils ne confirment pas le diagnostic. La résonance magnétique nucléaire du proton (RMN) [*Engelke et al, 2007*], est aussi considérée comme une technique prometteuse pour le diagnostic des aciduries organiques [*Vaidyanathan et al, 2011*].

L'analyse des acides organiques est donc d'une grande valeur dans la reconnaissance d'un large groupe d'acides organiques du métabolisme, aussi bien que dans beaucoup d'autres domaines du métabolisme. Le diagnostic précoce est d'une importance capitale et peut prévenir des séquelles incluant un retard physique-moteur et/ou un retard mental.

Une certaine généralisation peut être faite sur quelques présentations cliniques mais grâce à l'analyse biochimique de routine, on peut suggérer quels sont les métabolites qui pourront être d'une grande valeur pour le diagnostic [Rowland et Pedley, 2010].

Chaque pathologie des aciduries organiques varie en fonction de la voie métabolique impliquée, de la nature de métabolites incriminés, des effets secondaires de l'anomalie et du déficit complet ou partiel. Le même déficit métabolique peut se présenter différemment chez deux patients selon la sévérité, l'âge et les interactions gène-gène et gène-environnement mettant en évidence l'individualité de chaque enfant.

Les métabolites impliqués dans le diagnostic des aciduries organiques sont indiqués en annexe I.2.

Chacune des anomalies du métabolisme des acides organiques est associée à une anomalie urinaire. Cependant dans certains cas, particulièrement dans les déficits de l'oxydation des acides gras, les anomalies peuvent être faibles et surtout intermittentes

D'autres causes peuvent produire une excrétion anormale ou importante des acides organiques, elles sont considérées comme des désordres secondaires et elles peuvent être liées à :

- * **La prise de médicaments:** L'acide valproïque, est le principal produit interférant de cette l'analyse et ce d'autant qu'il est administré au cours de nombreuses affections touchant le métabolisme des aminoacides et acides organiques. Un certain nombre d'entre elles entraîne des phénomènes d'hypertonies et de convulsions. Lors de son métabolisme, il induit une

augmentation des acides dicarboxyliques et produit également une hyperammoniémie évoquant une anomalie du métabolisme.

Certains antibiotiques comme l'ampicilline et la méthécilline entraînent une acidurie dicarboxylique.

- * **L'alimentation:** Certains acides organiques sont utilisés dans l'alimentation comme l'acide adipique, un des principaux adjuvants de la gélatine alimentaire, et de tout ce qui est épaississant et un dérivé de l'acide succinique qui est incorporé dans de nombreuses alimentations infantiles.

Les triglycérides à chaînes moyennes sont des compléments alimentaires fréquemment administrés aux enfants présentant des anomalies de type malabsorption intestinale. De nombreux laits enrichis ou encore spécifiques de certaines pathologies provoquent l'apparition d'une acidurie organique.

- * **Les déficits vitaminiques:** Le déficit en vitamine B12, cofacteur indispensable de la transformation de la méthylmalonyl CoA en succinyl CoA est associé à une acidurie méthylmalonique. Bien que le taux retrouvé ne soit jamais plus élevé que ceux détectés lors des pathologies héréditaires, ce phénomène se rencontre souvent en cas de régime végétarien et chez des enfants nourris au lait de la mère étant elle-même végétarienne.

Le déficit alimentaire de riboflavine (Vitamine B₂) est associé à une acidurie dicarboxylique. Le déficit de thiamine (vitamine B₁) entraîne une augmentation de l'acide lactique.

- * **Les bactéries intestinales:** La fermentation de polysaccharides alimentaires dans l'intestin entraîne la formation d'acides organiques qui normalement sont rapidement métabolisés au niveau hépatique. Les bactéries sont une source importante d'acide propionique et d'acide méthylmalonique. Chez les patients présentant ces erreurs métaboliques, le traitement par antibiotiques est indispensable et quasi constant. Dans les gastroentérites aiguës, on peut

retrouver une augmentation des acides méthylmaloniques, éthylmaloniques et hydroxypropioniques qui disparaissent dès la guérison.

- * **La prématurité:** Les acides organiques retrouvés dans les urines de l'enfant de moins de 33 semaines sont totalement différents de ceux qui sont émis par les enfants à terme. Ce phénomène est dû à l'immatunité aussi bien hépatique que rénale. Une forte quantité d'acides organiques est retrouvée avec une augmentation de cétones. Cette augmentation d'acides dicarboxyliques a été attribuée à l'augmentation de l'utilisation de graisses pour la production d'énergie chez ces enfants prématurés. On remarque en particulier l'augmentation de l'acide éthylmalonique [*Lehotay et al, 1995*].

Il est donc important de signaler avant l'analyse si l'enfant suit une thérapie médicamenteuse ou une thérapie avec compléments alimentaires, afin de pouvoir mieux interpréter les résultats.

I.2.6. Stratégies d'évaluation

Il est important de déterminer la cause précise de l'acidémie organique pour établir un pronostic, une stratégie de traitement appropriée, et un conseil génétique.

- * **L'histoire de la famille :** Bien qu'il existe des antécédents familiaux de mort néonatale dans les familles d'un cas suscité, il sera nécessaire de considérer l'acidémie organique comme un cas plausible. Une histoire de cas négatifs dans la famille n'exclut pas cette possibilité.
- * **L'analyse des acides aminés du plasma :** En fonction du trouble, l'analyse d'acides aminés dans le plasma peut être utile parce que les anomalies spécifiques des concentrations d'acides aminés plasmatiques fournissent un indice important pour l'identification de la voie perturbée.
- * **Dosage de l'activité enzymatique :** Lorsque la détection d'analytes spécifiques rétrécit les possibilités de diagnostic, l'activité de l'enzyme déficiente est dosée

dans des lymphocytes ou des fibroblastes en culture comme test de confirmation. A part les nombreuses voies possibles, aucun dosage enzymatique unique ne peut établir le diagnostic. C'est d'ailleurs pourquoi il est important que des études complémentaires soient réalisées.

- * **Tests de génétique moléculaire** : Des tests de génétique moléculaire peuvent être utilisés pour confirmer le diagnostic chez certains individus touchés, car les gènes mutent et provoquent des troubles d'acides organiques.

I.2.7. Traitement

La plupart des aciduries organiques répondent positivement au traitement, et spécialement chez le nouveau-né. Un diagnostic précoce et un rapide management sont essentiels pour obtenir un bon résultat. La principale thérapie est de rétablir l'homéostasie biochimique et physiopathologique [Acosta et Ryan, 1997 ; Baric et al, 1998]. Les traitements bien que similaires dans leur principe, dépendent de la lésion biochimique spécifique et sont basés sur la position du blocage métabolique, ainsi que sur l'effet du composé toxique.

Dans de nombreux cas, un diagnostic rapide de l'anomalie enzymatique en cause peut prévenir les périodes de crise et réduire les retards psychomoteurs.

Les traitements stratégiques sont les suivants :

- * **Alimentaire**

L'objectif du traitement est de maintenir le taux sanguin d'ammoniac en dessous du seuil toxique. Les situations susceptibles d'augmenter le taux d'ammoniac sont les consommations inappropriées de protéines, mais surtout, les épisodes infectieux et maladies intercurrentes.

Le régime alimentaire est spécifique pour chaque trouble car il fournit les aminoacides essentiels dans un régime contraire à la protéine déficiente [Van Vliet et al, 2014]. Le but de la thérapie est de fournir tous les nutriments

indispensables pour promouvoir le développement physique et mental du malade [Yannicelli, 2006].

* **Composés complémentaires pour éliminer les métabolites toxiques.**

Certains enfants devront prendre des médicaments et d'autres non. Les médicaments susceptibles d'être administrés sont :

- **La carnitine** : son rôle est d'absorber l'acide organique toxique présent dans le sang et permet son passage et son élimination dans l'urine.
- **La glycine** : c'est un acide aminé qui possède la même action que la carnitine. Dans certaines affections, il peut être administré en monothérapie, lorsque le patient répond favorablement.
- **Le metronidazole** : Cet antibiotique est administré en très faible dose par rapport à la posologie adaptée pour combattre une infection. Les bactéries normales qui vivent dans les intestins fabriquent des acides organiques et le métronidazole est utilisé pour réduire cette quantité fabriquée et absorbée par l'intestin. Il est très utilisé pour les troubles du métabolisme du propionate. Son administration intermittente peut réduire la production de propionate par les bactéries intestinales.

En plus de ces produits, il existe une grande variété de médicaments susceptibles d'être utilisés chez les patients atteints d'acidurie organique, cependant les descriptions antérieures sont les plus couramment utilisées. Des exemples d'autres traitements plus spécifiques sont :

- **La thiamine** : Elle est utilisée pour un traitement plus ciblé comme pour le désordre de la thiamine-sensible MSUD.
- **La hydroxocobalamine** : Elle est utilisée pour traiter l'acidémie méthylmalonique.

*** Soins de longue durée**

Les soins continus nécessitent l'appui de nutritionnistes et de médecins compétents. Une surveillance fréquente de la croissance, du développement, et des paramètres biochimiques est indispensable. Les résultats à long terme peuvent être excellents concernant les acides organiques. Toutefois, le traitement approprié ne garantit pas un bon résultat, car les malades atteints par les aciduries organiques sont médicalement fragiles [De Baulny et al 2005].

Des épisodes fréquents de décompensation peuvent être dévastateurs pour le système nerveux central. Toute source de stress catabolique tels que : les vomissements, la diarrhée, la maladie fébrile, et la diminution de l'absorption orale peuvent entraîner une décompensation. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une intervention rapide et agressive. Au cours de la décompensation aiguë, les stratégies de traitement sont dirigées vers l'élimination des précurseurs d'acides aminés toxiques par la restriction de sa consommation et l'utilisation d'une mesure complémentaire comme l'hémodialyse [Shaefer et al, 1999]. Au cours de la décompensation aiguë, le soutien de soins intensifs est souvent nécessaire. L'acidose peut avoir besoin d'être corrigée ainsi que la maintenance de la fonction cérébrale grâce notamment, à une perfusion du glucose et une oxygénation adéquate. Une surveillance biochimique attentive et fréquente est essentielle. Des détoxifiants sélectifs tels que la glycine et la carnitine sont donnés dans certains cas, comme par exemple dans le 3-methylcrotonyl glycinuria [Fernandez et al, 2006].

*** La transplantation** La transplantation hépatique a été réalisée sur un petit nombre d'enfants affectés et bien que son résultat ait été un succès dans de nombreux cas, elle ne peut pas être considérée comme un traitement de première ligne. En effet, les complications habituelles de la transplantation du foie y compris son rejet ont été rapportés [Burdelski et Ullrich, 1999 ;

Saudubray et al, 1999]. Après cette intervention chirurgicale, leur santé est considéré comme bonne [*Leonard et al, 2001 ; Kayler et al, 2002*].

Une transplantation combinée « foie-rein » a une augmentation de plus en plus importante dans le rôle du traitement de l'acidose méthylmalonique, car il corrige la maladie rénale dont encore beaucoup de personnes souffrent et aboutit à un état métabolique proche de la normale [*Mc Guire et al, 2008*].

Dans le cas de l'acidémie propionique, la transplantation hépatique seule, améliore la maladie mais n'élimine pas complètement le trouble puisque le rein produit également l'acide propionique.

Parfois, l'état des patients atteints d'acidurie organique et présentant un état critique, peut s'aggraver et se traduire par la mort. Même si le traitement n'est pas disponible, l'identification de l'acidémie organique est important pour le conseil génétique et pour établir un éventuel diagnostic prénatal possible dans une future gestation [*Burlina et al, 1999*].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acosta P.B, Ryan A.S. Function dietitians providing nutrition support to patients with inherited metabolic disorders. *J. Am. Diet. Assoc.* 1997, 97, 783-786.

Al-Dirbashi O.Y, Jacob M, Al-Amoudi M, Al-Kahtani K, Al-Odaib A, El-Badaoui F, Rashed M.S. Quantification of glutaric and 3-hydroxyglutaric acid in urine of glutaric acidemia type I patients by HPLC with intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. *Clin. Chim. Acta.* 2005, 359, 179-189.

Baric I, Zschocke J, Christenses E, Duran M, Goodman S.I, Leonard J.V, Muller E, Morton D.H, Superti-Furga A, Hoffman G.F, Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J. Inherit Metab. Dis.* 1998, 21, 326-340.

Bhatt H.R, Green A, Linnell J.C. A sensitive micromethod for the routine estimation of methylmalonic acid in fluids and tissues using thin layer chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 1982, 118, 311-321.

Bonafé L, Pelet B, O Boulat, Superti-Furga A. Les erreurs innées du métabolisme: un nouveau défi pour la médecine adulte. *F. Med Suisse.* 2011, 11, 607-612.

Burdelski M, Ullrich K. Liver transplantation in metabolic disorders: summary of the general discussion. *Eur J Pediatr.* 1999, 158 Suppl 2, S95-96.

Burlina A.B, Bonafe L, Zacheloo F. Clinical and biochemical approach to the neonate with a suspected inborn error of amino acid and organics acid metabolism. *Sem Perinatol.* 1999, 23, 162-173.

Chalmers R.A, Stacey T.E, Tracey B.M. L-carnitine: Insufficiency in disorders of organic acids metabolism: response to L-carnitine by patients with methylmalonic aciduria and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1984, 7, 109-110.

Choudhuri T, Sengupta S, Inborn errors of metabolism - An indian perspective. *Int. J. Hum. Genet.* 2006, 6, 89-91.

De Baulny H.O, Benoist J.F, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray J.M. Methylmalonic and propionic acidaemias: management and outcome. *J. Inherit Metab Dis.* 2005, 28, 415-423.

Engelke U.F.H, Oostendorp M, Wevers R.A. Chapter 14 - NMR Spectroscopy of body fluids as a metabolomics approach to inborn errors of metabolism. *The Handb. Metabonomics and Metabolomics.* 2007, pag 375-412.

Fernandez-Peralbo M.A, Luque de Castro M.D. Preparation of urine samples prior to targeted or metabolomics mass-spectrometry analysis. *Trends Anal. Chem.* 2012, 41, 75-85.

Fernandez J, Saudrubray J.M, Van Der Berghe G, Walter J.H. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnostic and treatment.* 4th Edition. Edit. Sheddin Renate. Springer, Germany, 2006, pag. 257.

Fu X.W, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S. Simplified screening for organic acidemia using GC-MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. *Early Hum. Dev.* 2000, 58, 41-55.

Ghoraba D.A, Mohamed M.M, Zaki O.K. Screening of disease associated with abnormal metabolites for evaluation of HPLC in organic aciduria profiling. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 2014, 15, 69-78.

Goodman S.I, Markey SP. *Diagnosis of organic acidemias by chromatography-Mass spectrometry.* 1981. New York. Ed. Alan R. Liss

Gordon N, Sweetman L, Nyhan W. L, Hombeck C, Griffiths J, Mörch L, Brandänge S. Isotope dilution analysis of methylcitric acid in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of propionic and methylmalonic acidemia. *Clinica Chimica Acta*, 1980, 1075, 175-183.

Hagen Th, Korson M. Quantification of glutaric acid by isotope dilution mass spectrometry for patients with glutaric acidemia type I: selected ion monitoring vs. selected ion storage. *Clin. Chim. Acta.* 1999, 282, 185-195.

Hoffmann G.F, Feyh P. *Organic acid analysis. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease*, Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2003, pag 27-44.

Hoffmann G.F, Gibson K.M, Trefz F.K, Nyhan W.L, Bremer H.J, Rating D. Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr.* 1994, 153 (7 Suppl 1): S94-100.

Hommes F.A. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual.* Wiley-Liss. New York, 1991.

Inoue Y, Kuhara T. Rapid and sensitive method for prenatal diagnosis propionic acidemia using stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and urease pretreatment. *J. Chromatogr. B.* 2002, 776, 71-77.

Inoue Y, Oshe M, Shinka T, Kuhara T. Prenatal diagnosis of propionic acidemia by measuring methylcitric acid in dried amniotic fluid on filter paper using GC/MS. *J. Chromatogr. B.* 2008, 870, 160-163.

Kaluzna-Czaplinska J, Zurawicz E, Struck W, Markuszewski M. Identification of organic acids as potential biomarkers in the urine of autistic children using gas chromatography / mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2014, 966, 70-76.

Kayler L.K, Merion R.M, Lee S, Sung R.S, Punch J.D, Rudich S.M, Turcotte J.G, Campbell D.A, Holmes R, Magee J.C. Long-term survival after liver transplantation in children with metabolic disorders. *Pediatr Transplant.* 2002, 6, 295-300.

Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S. Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. *J. Exp. Med.* 1999, 188, 317-334.

Lehotay D.C, Clarke J.T.R. Organic acidurias and related abnormalities. *Crit. Rev. Lab. Sci.* 1995, 32, 377- 429.

Leonard J.V, Walter J.H, McKiernan P.J. The management of organic acidemias: the role of transplantation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001, 24, 309-311.

Liebich H. M and Forst C. Basic profiles of organic acids in urine. *J. of chromatogr. Biomedical applications*, 1990, 525, 1-14.

Liebich H.M, Gesele E. Profiling of organic acids by capillary gas chromatography-mass spectrometry after direct methylation in urine using trimethylxonium tetrafluoroborate. *J. of chromatogr. A.* 1999, 843, 237-245.

Maher A.D, Zirah S.F.M, Holmes E, Nicholson J.K. Experimental and analytical variation in human urine in ¹H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Anal. Chem.* 2007, 79, 5204-5211

Martins A.M. Inborn errors of metabolism: A clinical overview. *J.Rev. Paul Med.* 1999, 11, 251-265.

Mc Guire PJ, Lim-Melia E, Diaz GA, Raymond K, Larkin A, Wasserstein MP, Sansaricq C. Combined liver-kidney transplant for the management of methylmalonic aciduria: a case report and review of the literature. *Mol. Genet. Metab.* 2008, 93, 22-29.

Menkes J, Sarnat H, Maria B. *Child Neurology*. Sixth edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2006. Pag. 60.

Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S. simplified method for the chemical diagnosis of organic acidurie using GC/MS. *J. Chromatog. B.* 2010, 878, 942-948.

Narayanan M.P, Vaidyanathan K, Vianayan K.P, Vasudevan D.M. Diagnosis of major organic acidurias in children: Two years' experience at a tertiary care centre. *Ind. J. Clin. Biochem.* 2011, 26, 347-353.

Nicholls T.M, Hahnel R, WQilkinson S.P. Organic acids in amniotic fluid. *Clin. Chim. Acta*, 1978, 84, 11-17.

Ozand P T, Gascon G G. Organic acidurias: a review. Part I. *J Chil Neurol.* 1991, 6, 196-219.

Prieto J.A, Andrade F, Aldamiz-Echevarria L, Saniuro P. Análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Quimica Clinica.* 2007, 26, 66-72.

Ricquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. *Med. Sci.* 2005, 21, 512-516.

Rifai N, Hagen T, Bradley L, Sakamoto M. Determination of serum physiological concentration of methylmalonic acid by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. 1998, 35, 633-636.

Rowland L. P and Pedley T. A. *Merritt's Neurology*, twelfth edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010, pag. 651-653

Saudubray J.M. *Maladies métaboliques / progrès en pédiatrie. Volume 8.* Doin éditeurs - Paris 1991. Pag 15 - 27.

Saudubray J.M, Charpentier C. Clinicals phenotypes: diagnosis / algorithms: in Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherent diseases.* New York, NY : McGraw-Hill, 2001, pag 1327-1403

Saudubray J.M, Touati G, Delonlay P, Jouvét P, Schlenzig J, Narcy C, Laurent J, Rabier D, Kamoun P, Jan D, Revillon Y. Liver transplantation in propionic acidemia. *Eur. J. Pediatr.* 1999, 158 Suppl 2, S65-69.

Seashore M.R. The organic acidemias : An overview. *Gene Reviews.* Pagon R.A. Adam M.P, Ardinger H.H, et al. editors. University of Washington Seattle, 1993-2014.

Shaefer F, Straube E, Oh J, Mehls O, Mayatepek E. Dialysis in neonates with inborn errors of metabolism. *Neprol. Dial. Transplant*, 1999, 14, 910-918.

Shoemaker J. D. and Elliott W. H. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J. Chromatog. B.* 1991, 562, 125-138.

Sperl W. Diagnosis and therapy of organic acidurias. *Pediatr. Padol.* 1993, 28, 3-8.

Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple Syrup Urine Disease. [Updated 2013] 2006. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1319/> .

Sweetman L, Hoffmann G, Aramaki S. New diagnostic techniques for the detection of organic acidemias. *Enzym.* 1987, 38, 124-131.

Vaidyanathan K, Narayanan M.P, Vasudevan D.M. Organic acidurias: An Updated Review. *Ind. J. Clin. Biochem.* 2011, 26, 319-325.

Van Vliet D.V, Derks T.G.J, Van Rijn M, Groot M.J, Mc Donald A, Heiner-Fokkema R, Van Spronsen F. Single amino acid supplementation in aminoacidopathies: a systematic review. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014, 9,7

Watts R.W.E, Chalmers R.A. Abnormal organics acidurias in mentally retarded patients. *The Lancet.* 1975, 368-372.

Yannicelli S. Nutrition therapy of organic acidemias with amino acid-based formules: emphasis on methylmalonic and propionic acidemia. *J. Inherent. Metabo. Dis.* 2006, 29, 281-287.

CHAPITRE II
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES
TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE
EN PHASE GAZEUSE
UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC DES
ACIDEMIES ORGANIQUES

II.1. La chromatographie en phase gazeuse

II.1.1. Gaz vecteur

II.1.2. Système d'injection

II.1.3. Système séparatif

II.1.4. Détection

II.2. Couplage avec la spectrométrie de Masse (GC-MS)

II.2.1. Système d'introduction de l'échantillon

II.2.2. Source d'ionisation

II.2.3. Analyseur quadripolaire

II.3. Applications de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à l'analyse des acides organiques

II.3.1. Préparation d'échantillons

II.3.1.1. Echantillon urinaire

II.3.1.2. Extraction

II.3.2.3. Dérivation

II.3.2. Analyses actuelles en chromatographie en phase gazeuse

II.4. La chromatographie gazeuse bidimensionnelle

II.4.1. Principe

II.4.2. Système de chromatographie gazeuse bidimensionnelle

II.4.2.1. Modulation

II.4.2.2. Colonnes

II.4.2.3. Détection

II.4.3. Applications de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle à l'analyse des acides organiques

« La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est, malgré une étape de préparation d'échantillon contraignante, une des techniques analytiques les plus utilisées pour l'étude de composés organiques. Cette méthode d'analyse est incontournable pour les analyses de métabolites urinaires spécifiquement liés à de nombreuses erreurs innées du métabolisme, notamment l'acidémie organique. »

II.1. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (GC)

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une technique analytique séparative fréquemment utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés organiques volatils et semi-volatils.

Le principe fondamental de la séparation GC se trouve sur le partage des composés entre une phase mobile qui est un gaz vecteur inerte et une phase stationnaire solide ou liquide, qui est immobilisée à l'intérieur de la colonne chromatographique. Le mécanisme de séparation est dynamique ; les molécules passent continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier.

La séparation des composés dépend de plusieurs paramètres:

- * **La température** : Généralement, si les constituants du mélange à séparer ont des polarités voisines, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés. Lorsque l'écart entre les points d'ébullition des constituants du mélange à séparer est grand, il est préférable de faire un gradient de température.
- * **Le débit du gaz vecteur** : Il doit être tel que les différents constituants du mélange puissent s'équilibrer entre la phase mobile et la phase stationnaire. Si le débit est trop rapide, la séparation des pics est médiocre. S'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion trop importante des constituants dans le gaz vecteur.
- * **La nature de la phase stationnaire** : La polarité d'une phase stationnaire désigne sa propension à développer des interactions spécifiques par effets électroniques, stériques ou chiraux. En GC, le facteur de rétention d'un soluté est inversement proportionnel au produit de sa tension de vapeur et de son coefficient d'activité dans la phase stationnaire à dilution infinie. Donc, pour séparer des substances polaires, on utilise une phase polaire car ces substances

seront fortement retenues; dans ce cas, l'ordre de sortie des composés d'une série d'homologues est l'ordre croissant de leur point d'ébullition. Si des composés peu polaires se trouvent dans le mélange analysé, ils sont peu retenus par la phase stationnaire polaire et sont élués avant les composés polaires ayant le même point d'ébullition. Si la phase stationnaire est apolaire, c'est l'inverse qui se produit.

Les composants essentiels d'un système de GC sont : le gaz vecteur, le système d'injection, la colonne d'analyse dans un four à température contrôlée et le système de détection qui est relié à un système d'enregistrement et de traitement de données (Figure II.1).

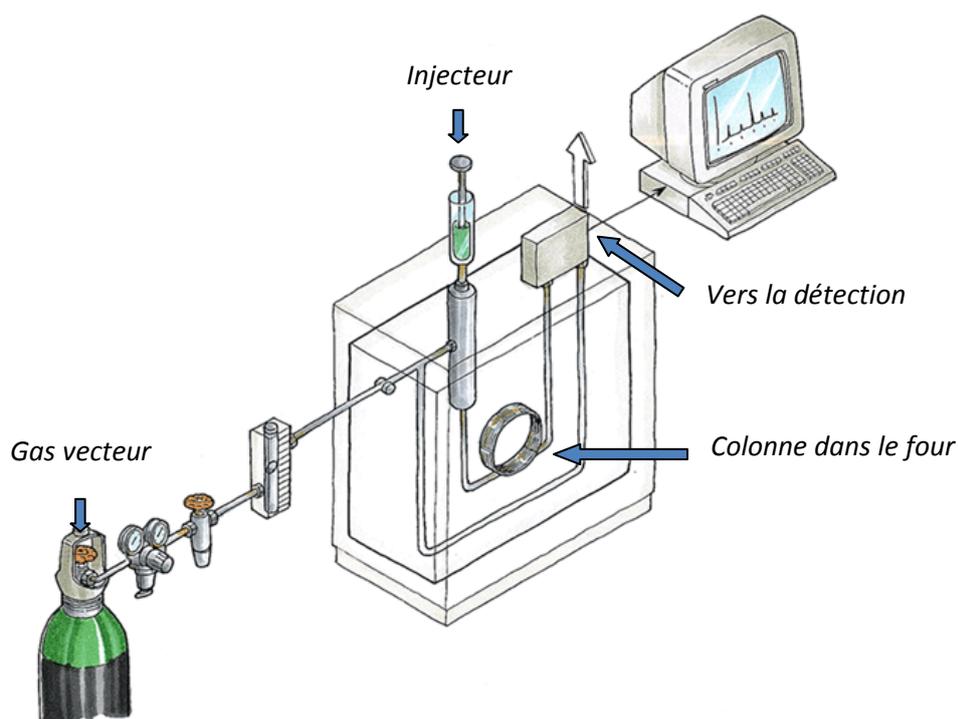


Figure II.1. Système de chromatographie en phase gazeuse (GC).

II.1.1 Le gaz vecteur

Le gaz vecteur est la phase mobile. C'est dans ce flux qu'on injecte un mélange à analyser et c'est lui qui le véhicule jusqu'à un détecteur à travers une colonne. Le gaz vecteur doit être insoluble dans la plupart de liquides, inerte vis-à-vis des solutés et des phases stationnaires et être pur, c'est-à-dire exempt d'eau et d'oxygène qui pourraient réagir avec la phase stationnaire. L'hydrogène, l'hélium, l'azote et les gazes rares répondent à ces différents critères.

La viscosité du gaz augmente quand la température croît. Le gaz vecteur doit avoir une très faible viscosité. La viscosité ou le débit de gaz ont une influence sur la dispersion dans la colonne, donc sur l'efficacité et la sensibilité de la détection.

L'optimum d'efficacité d'une colonne pour une température donnée est obtenu quand la vitesse du gaz vecteur se place au minimum de la courbe de Van Deemter. Pour avoir des analyses sans perte de résolution des pics il est souhaitable d'avoir une courbe de Van Deemter de faible pente après le point optimum. Parmi les gaz préalablement cités, l'hélium est le gaz permettant de travailler avec une vitesse de circulation relativement grande sans perdre en efficacité. Si on veut travailler à hautes températures, l'hydrogène est plus favorable aux grandes vitesses que l'hélium. Dans la pratique beaucoup de laboratoires préfèrent utiliser l'hélium plutôt que l'hydrogène pour des raisons de sécurité. L'hélium permet un bon compromis entre l'efficacité/ sécurité/ temps d'analyse.

II.1.2. Système d'injection

L'injection de l'échantillon est la première étape dans le processus chromatographique. La technique utilisée est un facteur important et doit permettre le transfert reproductible et quantitatif de l'analyte dans la colonne, de minimiser l'élargissement des pics chromatographiques, la décomposition des composés et l'adsorption au niveau de l'injecteur [Yuwono et Indrayanto, 2004]. L'échantillon, sous

forme liquide ou gazeuse, est introduit en tête de colonne via un système d'injection. Dans le cas d'un échantillon liquide, le mélange est introduit à l'entrée du système via une seringue et la température imposée au système d'injection doit prendre en compte la température d'ébullition du composé le moins volatil pour permettre la vaporisation totale de l'échantillon. Les composés analysés en GC doivent donc être volatils et stables thermiquement.

Les techniques d'injection les plus communes sont l'injection en mode « split » (avec division de flux), en mode « splitless » (sans division de flux) et l'injection « On column » [Grob, 1980].

- * En mode **split**, qu'une fraction de l'échantillon injecté, déterminée par le split ratio, pénètre dans la colonne, tandis que le reste est évacué. Ce mode d'injection est la technique de choix pour un échantillon concentré mais ne convient pas pour l'analyse de traces.
- * En mode **splitless**, la quasi-totalité de la vapeur de l'échantillon est transférée dans la colonne. Ce mode est utilisé pour l'analyse de composés à l'état de traces, quand il est nécessaire de transférer une quantité maximale d'échantillon dans la colonne, afin de maximiser la sensibilité.
- * L'injection "**on column**", consiste à introduire directement l'analyte en solution dans la colonne ou dans une pré-colonne (dont la fonction est de permettre l'injection d'un grand volume d'échantillon et/ou de protéger la colonne analytique d'éventuels polluants matriciels) à température ambiante. Ce mode d'injection est utilisé dans le cas de composés thermolabiles, qui sont directement introduits dans la colonne via un port d'injection froid puis sont vaporisés rapidement par un chauffage programmé.

II.1.3. Système séparatif

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique : la colonne analytique. Elle est le cœur du système chromatographique. Les colonnes analytiques séparent généralement les composants de l'échantillon en fonction de leur volatilité et de leur polarité. La sélectivité de séparation de composés dépend du choix de la phase stationnaire et sa polarité [Majors, 2003].

Le temps écoulé entre l'injection et l'élution (temps de rétention) est théoriquement, un unique attribut du composé, et peut être utilisé pour la détection, la potentielle identification et la quantification. L'élution des composés présents dans un échantillon, est favorisée par la température [Looser et al. 2005]. Les températures sont généralement réalisées dans un intervalle allant de 40 à 325°C en utilisant une programmation de température. Cependant, l'analyse peut également être faite en température isotherme. Si la température est suffisamment élevée, elle favorise le transport des composés [Yuwono et Indrayanto, 2004].

Le choix d'une phase stationnaire dépend des propriétés chimiques et physiques de l'échantillon. La phase stationnaire est caractérisée par ses fonctions chimiques. Le temps de rétention d'une substance à analyser est en fonction de sa température d'ébullition (volatilité) et les interactions entre les groupes fonctionnels (polarité) et ceux de la phase stationnaire [McNair et Miller, 1998]. Les différences de propriétés physicochimiques de chaque composé confèrent des vitesses d'élution différentes qui leur permettent d'être séparés en fonction du temps. Confronté à un mélange mixte, on privilégie souvent le choix d'une colonne peu polaire, les phases stationnaires peu polaires étant généralement plus robustes et thermiquement beaucoup plus stables que leurs homologues polaires [Bouchonnet, 2006; Mendham, 2006]. Dans le domaine métabolique, spécifiquement dans l'analyse des acides organiques ce type de phase stationnaire est très couramment utilisé [Fu et al, 2001 ; Kuhara, 2002 ; Kimura et al, 2003].

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par :

- * La longueur : La longueur de la colonne joue un rôle important sur l'efficacité de la séparation des composés pour l'obtention de pics fins.
- * Le diamètre interne : Le diamètre est important car il impacte le temps de rétention des composés et l'efficacité de la séparation. Il joue un rôle prépondérant sur l'élargissement de pics. Enfin, il influe sur la capacité du travail (charge) de la colonne.
- * L'épaisseur de sa phase stationnaire : joue un rôle important sur la capacité de travail de la colonne

Les phases stationnaires non-polaires, 100% méthylsiloxane et 5% phenyl méthylsiloxanes sont les plus populaires pour la séparation de composés non polaires. La phase stationnaire polaire polyéthylène glycol (WAX) est préféré pour une analyse plus détaillée des composés polaires [Majors, 2003]. Il est admis, que 90% des problèmes de séparation peuvent être résolus en utilisant une colonne polaire couplé avec une non polaire pour aider à améliorer la résolution des composés co-élués ainsi que des isomères [Wittkowski et Matissek, 1990; Chaves das Neves et Freitas, 1996].

II.1.4 Détection

Différents types de détecteurs peuvent être utilisés : le spectromètre de masse, le spectromètre infrarouge et le détecteur à ionisation de flamme qui détectent presque tout le type d'analytes. Le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie [Bouchonnet, 2006].

II.2. COUPLAGE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS)

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse destructive donnant accès à des informations utiles sur les molécules d'un échantillon. Elle permet de déterminer la masse moléculaire d'une substance et/ou d'obtenir des données structurales. Grâce à la MS, l'identification et la quantification des analytes peuvent être obtenus.

Cette technique mesure les rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules ou de fragments de molécules ionisés à l'état gazeux.

Le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes: 1- vaporiser ; 2- Ioniser ; 3- Mesurer les rapports m/z .

Classiquement, le spectromètre de masse est constitué de 3 parties principales :

- * La source d'ionisation, dont le rôle est de faire passer les molécules en phase gazeuse et de les ioniser.
- * L'analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z .
- * Le détecteur qui couplé à un système informatique assure le traitement des données et l'élaboration des spectres de masse.

II.2.1. Système d'introduction de l'échantillon

La source d'ions crée des ions gazeux à partir de l'échantillon. Ils peuvent être introduits de deux manières :

- * Directement dans la source d'ionisation : sous forme gazeuse ou solide
- * Par l'association à une méthode séparative : chromatographie en phase gazeuse ou GCxGC.

II.2.2. Source d'ionisation

Il existe de nombreux types de sources d'ions. Chacun repose sur un principe physique différent. L'opérateur choisit le principe physique capable de vaporiser et d'ioniser le composé étudié en fonction de ses caractéristiques. Les étapes de vaporisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source.

L'étape d'ionisation est cruciale : elle assure non seulement la vaporisation, l'ionisation proprement dite et le guidage vers l'analyseur, elle aussi détermine l'énergie apportée aux ions parents. Un apport très important conduit à la fragmentation de ces derniers.

En couplage avec un chromatographe en phase gazeuse, les sources utilisées sont dites à ionisation électronique « EI » (Electron Ionization) ou à ionisation chimique « CI » (Chemical Ionization). Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou facilement vaporisables (point d'ébullition n'excédant pas 400°C). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des analytes.

* Ionisation électronique (EI)

L'EI consiste à "bombarder" les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. L'impact d'un électron sur la molécule « M » a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire M^{\bullet} . L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion M^{\bullet} acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés "ions-fils" ou "ions-fragments". Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique (tungstène ou rhénium, le plus souvent) et accélérés par une différence de potentiel de 70 V, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70

eV. Le fait de disposer d'un standard mondial pour l'énergie des électrons ionisants permet de comparer des spectres de masse réalisés sur différents appareils et d'avoir recours à des bases de données, dispensant dans la plupart de cas d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les analytes. Les algorithmes de recherche extraient des bases de données les composés dont les spectres de masse ressemblent le plus au spectre étudié, mais il est parfois difficile de trancher entre les solutions proposées. Les bases de données ne sont évidemment efficaces que si les spectres des composés étudiés y sont répertoriés. Lorsque ça n'est pas le cas, l'analyste doit tenter « d'interpréter » le spectre de masse. L'universalité de l'ionisation électronique (la quasi-totalité des molécules sont ionisables), justifie l'immense succès de cette technique [De Hoffmann, 2005].

* Ionisation chimique

L'ionisation chimique (CI) est également largement employée en complément de l'EI. La CI est plus sélective et toutes les molécules élues ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes. Comparée à l'EI, la CI est un mode d'ionisation "doux" : les ions MH^{+} obtenus en CI ont beaucoup moins d'énergie interne que les ions M^{+} produits par EI et se fragmentent donc beaucoup moins que ces derniers [Longevialle P, 1981]. Le spectre d'IC informe presque toujours sur le poids moléculaire de l'analyte alors que celui d'EI fournit plus d'informations structurales mais pas de certitude sur le poids moléculaire.

D'une façon générale, l'analyste n'a jamais la certitude que l'ion de rapport m/z le plus élevé est l'ion moléculaire dans un spectre d'EI, ce qui complique infiniment l'interprétation spectrale. En CI, l'analyte n'est pas directement ionisé par les électrons. C'est un gaz G , dit « gaz réactant » qui, introduit dans la source, subit l'ionisation électronique. Ce gaz est à une pression

telle que les ions G^{**} formés réagissent immédiatement avec les molécules G non ionisées pour former des ions $(G+H)^+$ à nombre pair d'électrons. Ce sont ces derniers qui, dans un deuxième temps, vont réagir avec l'analyte M en lui transférant un proton pour former des ions $(M+H)^+$. Le transfert n'est évidemment possible que si l'affinité protonique de l'analyte se trouve supérieure à celle du gaz réactant. Le choix du gaz réactant obéit à des critères chimiques précis [Harrison, 1992]. Plus l'affinité protonique du gaz est élevée, plus le transfert de proton vers les analytes est difficile et, par conséquent, moins l'énergie interne des ions $(M+H)^+$ est élevée et moins ces derniers se fragmentent. En d'autres termes, on choisit un réactant à forte affinité protonique (NH_3) si l'on ne souhaite pas fragmenter l'ion $(M+H)^+$. On a recours, au contraire, à un réactant de faible affinité protonique (CH_4) si l'on veut dissocier cet ion pour obtenir un spectre de masse plus riche en informations structurales. La formation d'ions $(M+H)^+$ est souvent en compétition avec celles d'adduits. Ces adduits sont d'autant mieux observés que l'analyte est polaire et peu basique. Avec le méthane, un seul l'adduit $(M+H)^+$ est généralement observé. L'ammoniac fournit quant à lui, un adduit $(M+NH_4)^+$ souvent très abondant, parfois même plus abondant que $(M+H)^+$.

II.2.3. Analyseur quadripolaire

L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Les ions produits sont séparés d'après leur masse et celle-ci est simultanément déterminée au moyen de l'analyseur. De nombreux analyseurs sont disponibles. Toutefois comme pour les sources d'ionisation, l'analyseur parfait n'existe pas. Chaque analyseur a ses

avantages et ses inconvénients. En fonction du type d'analyse à réaliser et du type de source utilisée, le choix de l'analyseur va dépendre principalement :

- * De sa gamme de masse (valeur limite du rapport m/z mesurable et gamme dynamique), de sa précision dans la mesure de la masse
- * De sa résolution, qui correspond à sa capacité à différencier des ions de rapport m/z voisins
- * De sa capacité à focaliser les ions, même après collision.

L'analyseur de masse doit toujours être sous vide car il est nécessaire pour optimiser la transmission des ions jusqu'au détecteur sans qu'ils subissent de collisions avec d'autres particules : en effet, les collisions peuvent entraîner une déviation de la trajectoire des ions, qui iraient se décharger sur la paroi de l'appareil. Les collisions peuvent également être à l'origine de réactions de fragmentation qui, si elles ne sont pas désirées, compliquent le spectre [De Hoffmann et Stroobant, 2005].

Le Quadripôle (q) est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. Ces électrodes sont cylindriques et longues de douze à vingt centimètres selon les modèles (Figure II.2).

Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel de type $U + V \cos \omega t$, et les deux autres, au même potentiel mais de signe opposé ($-U - V \cos \omega t$). U et $V \cos \omega t$ sont, respectivement, les composantes de tension continue et de tension alternative du potentiel de radiofréquence. V et ω sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. La valeur de ω est fixée par le constructeur. Les polarités des électrodes sont rapidement inversées, ce qui confère aux ions un mouvement "en tire-bouchon" dont l'amplitude radiale dépend des paramètres U et V . Pour qu'un ion de rapport m/z donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres U et V soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la

distance séparant les électrodes. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de U et de V de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant t donné, ne sont détectés que les ions d'un m/z donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage [Dawson, 1976]. Comme la vitesse de balayage peut être facilement très élevée, ce détecteur est bien adapté aux couplages chromatographiques. [De Hoffmann E. and Stroobant V., 2005].

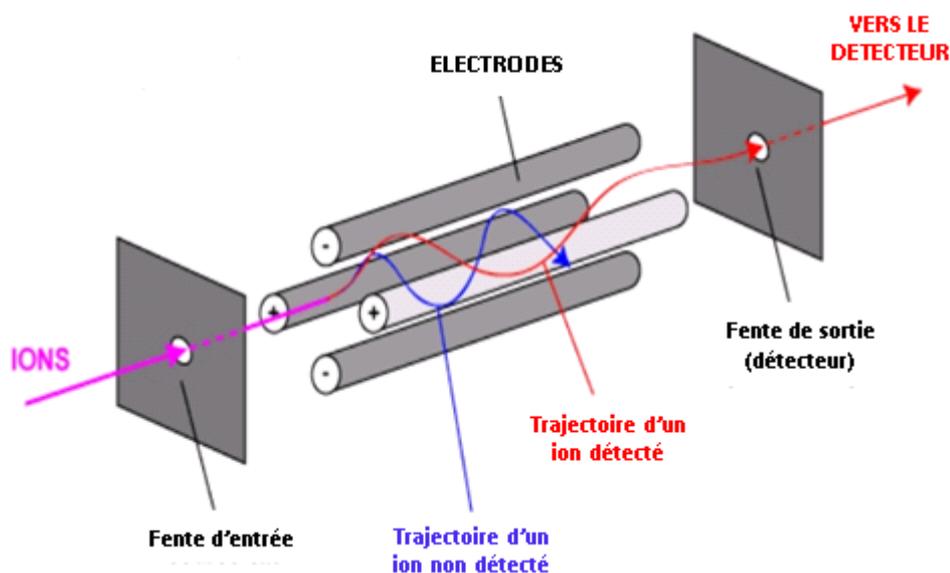


Figure II.2. Schéma du quadripôle

II.3. APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'ANALYSE DES ACIDES ORGANIQUES

Actuellement, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est la technique analytique la plus utilisée pour l'analyse des acides organiques urinaires.

II.3.1. Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon urinaire consiste à l'extraction et dérivation des acides organiques pour un postérieur analyse en GC-MS.

II.3.1.1. Echantillon urinaire

L'urine a depuis longtemps été le fluide biologique préféré pour les recherches métaboliques. Elle est stérile et facile à obtenir en grandes quantités par méthodes non invasives. L'urine est un milieu très complexe, toutefois, cette complexité chimique a fait également d'elle un substrat particulièrement difficile à comprendre. Comme c'est l'un des déchets biologiques, l'urine contient des produits de dégradation métabolique, typiquement produit à partir d'un large éventail d'aliments, de boissons, de médicaments, de contaminants environnementaux, de métabolites endogènes et de sous-produits de déchets bactériens .

L'échantillon urinaire recueilli près des patients doit correspondre, soit à l'urine de la nuit (première urine du matin), soit à une accumulation d'urines sur 24h (échantillon conservé à 4°C après chaque miction) [Moussa et al, 2011]. Dans le cas où l'échantillon n'est pas analysé immédiatement, l'urine doit être congelée.

La conservation des échantillons avant l'analyse est une étape clé ; les échantillons doivent être stockés à -20°C. En effet, avec le temps et à température ambiante, quelques composés hautement solubles comme les acides organiques à chaîne courte voient leur concentration augmenter et cela peut générer de faux positifs lors des analyses [Fernandez et Luque, 2012].

Bouatra et son équipe [Bouatra et al, 2013] ont réalisé l'analyse quantitative et la caractérisation du métabolome de l'urine. Pour cela, ils ont utilisé plusieurs techniques: la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), l'injection directe de flux - spectrométrie de masse (DFI / LC-MS / MS), plasma à couplage inductif - spectrométrie de masse (ICP-MS) et la chromatographie liquide à haute performance

(HPLC). Ces expériences ont été effectuées sur plusieurs échantillons d'urine. Cette multiplateforme d'analyse métabolique leur a permis d'identifier 445 métabolites urinaires, dont 378 ont été quantifiés. Avec les données obtenues dans la littérature, ils ont pu élargir l'identification des composés urinaires et créer une grande base de données en ligne, où sont renseignés 2651 métabolites urinaires confirmés (<http://www.urinemetabolome.ca>).

Comme les acides organiques sont des métabolites clés dans presque toutes les voies du métabolisme intermédiaire, leur analyse est importante pour connaître l'état de ces voies [Prieto, 2007].

II.3.1.2. Extraction

La technique idéale pour l'analyse des acides organiques doit être simple, rapide, aussi quantitative que possible et s'appliquer à l'ensemble des divers acides organiques qui ont des polarités très différentes. C'est pour cette raison que l'étape d'extraction est primordiale. Deux types de méthodes d'extraction ont été décrites dans la littérature : la méthode par fixation des acides sur un échangeur d'ions, suivi d'une élution [Jellum, 1977; Thompsom et Markey, 1975 ; Mardens et al, 1992] ; et la méthode d'extraction par solvant organique [Hori et al, 2005 ; Wajner et al, 2009].

Les études avec la méthode d'extraction par échangeur d'anions ont donné des rendements très acceptables, mais, le temps d'élution est long et tous les acides ne sont pas extraits, ce qui représente un inconvénient. Cette technique ne semble donc pas bien appropriée pour un profilage complet des acides organiques urinaires.

L'extraction par solvants organiques semble plus adaptée au dépistage de routine et est assez efficace, cependant le pouvoir solubilisant des solvants n'est pas égal pour tous les acides. Cette méthode emploie des manipulations aisées et rapides. Cette technique d'extraction par solvant organique a été étudiée par Boujet et collaborateurs [Boujet et al, 1982] avec cinq solvants différents: l'oxyde de diéthyle, l'acétate d'éthyle, le chlorure d'isopropyle, l'éther de pétrole et le tetrahydrofurane (THF). Ils ont

déterminé trois solvants avec lesquels ils obtiennent de bons rendements d'extraction : le THF, l'acétate d'éthyle et l'oxyde de diéthyle et ont retenu l'acétate d'éthyle.

Ces derniers temps, l'acétate d'éthyle est le solvant organique le plus couramment utilisé pour l'extraction des acides organiques. Il est employé dans les laboratoires cliniques pour l'analyse quotidienne

Lors de l'extraction des acides organiques, une attention particulière doit être apportée à la séparation des phases aqueuse et organique. La quantité de phase aqueuse restante doit être limitée car elle peut entraîner des molécules hydrosolubles. De plus, cela retarde le temps d'évaporation du solvant et de concentration des solutions.

De même, l'acidification du milieu est un autre point important parce qu'il conditionne l'extraction des composés de l'urine. Il faut généralement assurer un pH inférieur à 2 pour que les acides organiques soient bien extraits [*Prieto et al, 2007*].

II.3.1.3. Dérivation

Dans l'urine, les acides organiques se présentent avec une grande variété de structure et de polarité. L'analyse de ces acides requière une étape de préparation d'échantillon, en particulier la dérivation des groupes carboxyles [*Mardens, 1992*]. Le but de cette transformation est l'augmentation de la volatilité des constituants de l'échantillon, tout en ayant une plus grande stabilité thermique.

Deux grands types de dérivés volatils sont utilisés : les dérivés méthylés ou ester méthyliques et les dérivés silylés ou dérivés trimethylsilylés (TMS) [*Liebich, 1990*].

- * Les dérivés silylés ou dérivés TMS sont les plus « populaires » et les plus utilisés. La silylation se réalise par la substitution d'atomes d'hydrogène actifs par un groupement trimethylsilyle (TMS). Les produits qu'on obtient, sont généralement moins polaires, plus volatiles et plus stables thermiquement. Le plus souvent employé est le BSTFA (bistrimethylsilylacétamide) avec ou sans

adjonction de pyridine. Il permet l'estérification des groupements carboxyles, hydroxyles, amines, thiols et phénoliques des acides organiques. Il est recommandé d'utiliser un mélange de BSTFA avec 1% de trimethylchlorosilane (TMCS). La TMCS est souvent utilisée en quantité catalytiques avec d'autres réactifs de trimethylsilylation. Seul, il peut être utilisé pour dériver des acides organiques. Sur le plan analytique, ce type de dérivation peut donner lieu à plusieurs dérivés TMS comme par exemple c'est le cas des acylglycines.

- * Les dérivés méthylés ou ester méthyliques, ont d'excellentes propriétés chromatographiques puisqu'ils sont très volatiles. Ils sont un peu sensibles à l'humidité, ils peuvent se conserver congelés pendant une longue période sans avoir de modifications. Sur le plan analytique, certains métabolites insaturés donnent des dérivés très instables qui ne seront pas détectés, tel que l'acide fumarique. En revanche, la méthylation, est mieux adapté pour la détection la méthode de détection de traces d'acylglycines, métabolites d'intérêt majeur pour le diagnostic de désordres de β -oxydation des acides gras [Costa et al, 2000; Sim et al, 2002].

Dans la plupart des études précédentes, la silylation est la méthode de dérivation la plus fréquemment utilisé [Xu et al, 2001; Nakagawa et al, 2010]. Il va permettre de détecter les métabolites urinaires avec une gamme de masse élargie et faciliter l'identification par comparaison avec les bases de données riches en information de dérivés TMS.

II.3.2. Analyses actuelles en chromatographie en phase gazeuse

Les laboratoires cliniques utilisent la GC-MS comme une technique de routine pour l'analyse des acides organiques. Notre partenaire, le laboratoire de biochimie de l'hôpital pédiatrique Armand Trousseau à Paris, travaille depuis plusieurs années sur cette technique.

Le protocole de préparation des échantillons utilisé au sein du service de biochimie est réalisé sur la base des études de Greter et Jacobson [Greter et Jacobson, 1987] et Divri et al. [Divri et al, 1987]. Il consiste, dans un premier temps, à extraire les acides organiques de l'échantillon urinaire. Ensuite, l'urine est acidifiée avant de procéder à une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle. Afin d'avoir un meilleur rendement d'extraction des métabolites, cette opération est répétée trois fois au total. Une fois que les acides organiques sont séparés du reste de l'échantillon urinaire, ils sont concentrés par évaporation du solvant organique. La deuxième étape se déroule après l'obtention de l'extrait sec suite à l'évaporation. Les métabolites extraits sont soumis à une réaction de dérivation afin d'obtenir des métabolites trimethylsilylés. Cette solution finale est injectée en GC-MS pour analyse.

Le chromatogramme obtenu (Figure II.3) fournit l'information sur la composition de l'échantillon. L'analyse en screening utilisant une large gamme de masse permet d'obtenir des informations importantes et nécessaires pour l'établissement d'un bon diagnostic. Les molécules sont identifiées par leur spectres de masse et sont comparées aux bases de données préétablies comme: *Mainlib* et *Replib*. Comme elles ne sont pas complètes pour l'identification des métabolites d'intérêts, une autre bibliothèque a été créée par le laboratoire de biochimie. Elle est appelée *CAOLIB* et a été élaborée à partir d'urines de patients ainsi qu'avec des produits purs commercialisés. De plus, ils ont été étalonnés et analysés afin d'obtenir des informations sur leurs spectres de masse et leurs temps de rétention.

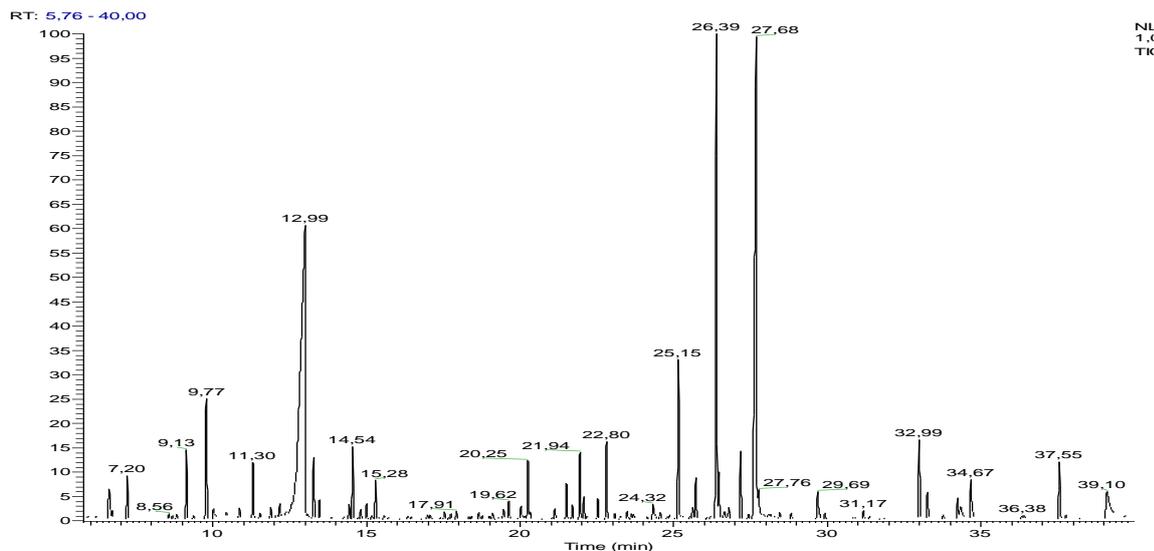


Figure II.3. Exemple de chromatogramme des acides organiques obtenu avec la méthode de GC-MS.

Les profils correspondant aux aciduries organiques montrent une augmentation anormale de certains composés étant facilement détectables. Les métabolites des médicaments qui ont des fonctions carboxyliques peuvent être détectés (ex : acide salicylique, acide valproïque, etc) chez les enfants qui ont reçu un traitement récent, ainsi les enfants qui ont reçu un traitement avec un régime alimentaire spécial (ex: ajout en triglycérides à chaîne modérée dans le lait) peuvent présenter des concentrations élevées pour certains acides organiques. Donc, ils peuvent être sources d'interférences dans les analyses et gêner la détection des métabolites importants. Pour cette raison, il est indispensable d'avoir le renseignement clinique le plus complet qui pourra ensuite aider à l'orientation du diagnostic.

Le résultat du dosage des acides organiques est donné en fonction de la concentration de créatinine urinaire (μmol de l'acide/ mmol de créatinine). La mesure de l'aire du pic de chaque métabolite permet d'obtenir sa concentration. Une courbe d'étalonnage est faite pour chaque composé. Le dosage est fait en rapport de l'aire du pic du composé sur l'aire du pic de l'étalon interne (aire métabolite/aire EI).

Les résultats obtenus sont interprétés par des spécialistes et sont ensuite, dans le cas d'un résultat positif, transmis aux médecins pour établir un diagnostic et donner une thérapie spécifique.

Le service de biochimie ne recherche que les acides organiques d'une liste spécifique de métabolites accessibles sur le marché. La liste des acides organiques d'intérêt est présentée ci-dessous:

ACIDE ORGANIQUE	Unité	Valeur de référence
Acide lactique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide glycolique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 150
Acide 3-hydroxypropionique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 20
Acide 3-hydroxybutyrique/créatinines	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide 3-hydroxyisovalérique/créatinines	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 40
Acide méthylmalonique/créatinines	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 10
Acide 2-éthylhydracrylique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 10
Acide éthylmalonique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	< 20
Acide succinique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide fumarique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 10
Acide glutarique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 25
Acide adipique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 20
Acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique/creat.	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 50
Acide 2-cetoglutarique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide 4-hydroxyphénylacétique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide subérique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 10
Acide cis-acotinique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 100
Acide sébacique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 5
Acide 4-hydroxyphényllactique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 5
Acide 4-hydroxyphénylpyruvique/creat.	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 5
Acide 3-hydroxyglutarique	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	0 - 15

Acide 3-hydroxysébacique/créatinine	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	pas
déterminé		

D'autres métabolites qui ne sont pas dans cette liste peuvent aussi être détectés et signalés s'ils sont abondants.

II.4. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE BIDIMENSIONNELLE (GCxGC)

Depuis la première description en 1991 [Liu et Phillips, 1991], la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle ou compréhensive (CGxCG) a été reconnue comme une technique capable de fournir de manière significative un plus grand pouvoir de séparation pour l'analyse d'échantillons complexes dans une seule analyse [Marriott et Shelie, 2002, Ong et Marriott, 2002; Song et al, 2004]. Durant ces dernières années, de grands progrès ont été réalisés pour améliorer la technique. Actuellement, cette technique permet la caractérisation de mélanges complexes dans différents domaines : l'analyse des drogues [Song et al, 2004, Guthery et al, 2010], les huiles essentielles [Dimandja et al, 2000], les pesticides [Liu et al, 1994; Wang et al, 2012], le milieu environnemental [Hoh et al, 2012], le métabolisme [Koek et al, 2011], les produits pétroliers [Dutriez et al, 2011; Ventura et al, 2012].

II.4.1. Principe

La chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle est une technique de séparation en phase gazeuse dans laquelle tous les composés élués d'une première colonne sont successivement soumis à une séparation dans une deuxième colonne de sélectivité différente à la première [Liu et al, 1991]. Les deux colonnes sont connectées en série au moyen d'un « *press-fit* ». En tête de la seconde colonne, est positionné un modulateur, qui a pour principale fonction de couper en fractions étroites les composés

élués de la première colonne et les libérer rapidement dans la deuxième colonne [Adahchour, 2006]. Le modulateur échantillonne l'effluent sous forme d'impulsions chimiques avec un transfert en continu. La durée requise pour effectuer cette opération de fractionnement, appelée période de modulation, impose une séparation très rapide (quelques secondes) sur la deuxième colonne. Afin que les composés de chaque impulsion soient séparés sur la deuxième colonne dans un temps inférieur à la période de modulation, on choisit une colonne courte et de faible diamètre interne [Bertoncini et al, 2005].

Dans la figure II.4, le principe de la méthode GCxGC est illustré en trois étapes :

- * **La modulation:** Etape durant laquelle le modulateur produit une collection d'une série de pics à grande vitesse (en fraction de secondes).
- * **La transformation:** Un logiciel réorganise le chromatogramme brut en chromatogramme 2D qui représente la rétention des composés sur la première et deuxième colonne.
- * **La visualisation:** Représentation/projection sous forme d'un chromatogramme en « color plot » sur laquelle chaque tache représente un composé avec une graduation de couleurs. La couleur associée à chacune de ces tâches informe sur l'intensité relative du signal. Une carte 3D sur laquelle on peut directement observer l'intensité du signal peut également être obtenue.

L'intérêt de la CGxCG réside dans son pouvoir résolutif accru à condition que les critères énoncés par Giddings soient respectés [Giddings, 1987; Bertoncini et al, 2005]:

1. Les constituants d'un mélange sont séparés dans des dimensions indépendantes, dites orthogonales
2. La résolution obtenue dans chaque dimension est préservée tout au long de la séparation.

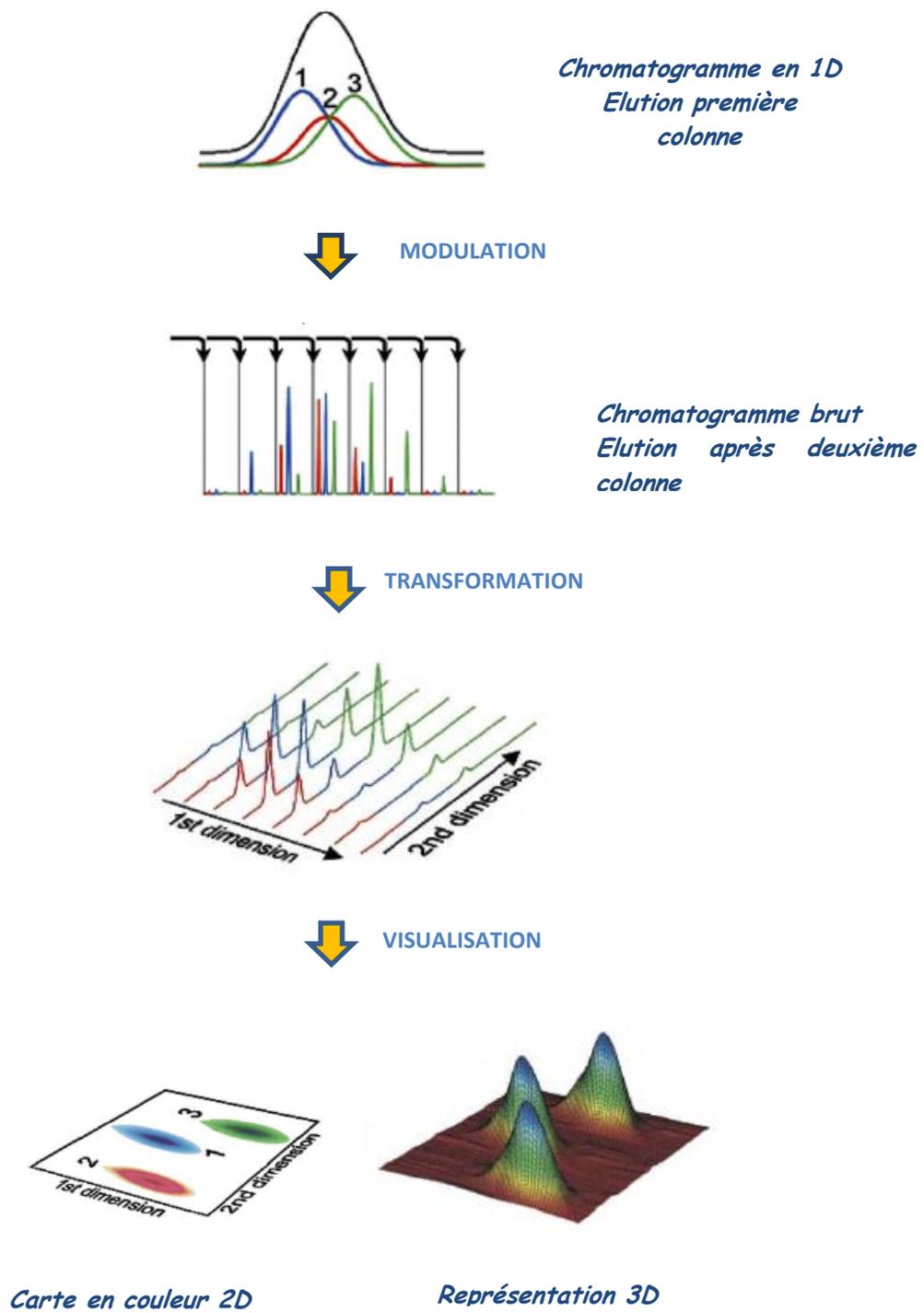


Figure II.4. Principe de la GCxGC. [Adahchour, 2006]

II.4.2. Système de chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle

Fondamentalement, la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle exploite le même type d'instrument qu'en GC monodimensionnelle à l'exception près de l'insertion d'un modulateur dans l'appareillage.

La figure II.5 représente le schéma du système. L'appareil est composé d'un injecteur, de colonnes chromatographiques en série, d'un modulateur et d'un détecteur.

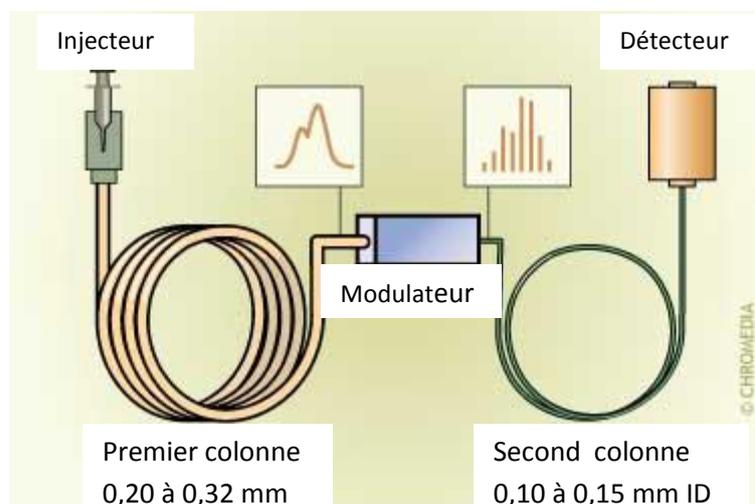


Figure II.5. Représentation schématique du système de chromatographie gazeuse bidimensionnelle.

II.4.2.1. Modulation

Un des critères essentiels pour réaliser une séparation bidimensionnelle est le transfert en continu de la totalité de l'échantillon de la première vers la deuxième colonne. Le modulateur, élément clé du dispositif de $CG \times CG$, est l'interface entre les deux colonnes et a trois fonctions principales [Khummueng et al, 2006]. Il doit :

1. Fractionner et piéger l'effluent de la première séparation
2. Recentrer et focaliser

3. Transférer rapidement les fractions en vue de la deuxième séparation

Différents types de modulateurs ont été développés accompagnant l'essor de la GCxGC : modulateurs à vanne, modulateurs chauffants et modulateurs cryogéniques (Tableau II.1).

Tableau II.1. Différents types de modulateur de chromatographie gazeuse bidimensionnelle

Type de modulateur	Thermique		Vanne
	Chauffant	Cryogénique	
Modulateur de désorption thermal	x		
Modulateur thermal de rotation (Sweeper)	x		
Semi-rotation (CO ₂)		x	
LMCS (CO ₂)		x	
Quatre jets (N ₂)		x	
Double jets (CO ₂)		x	
Simple jet (N ₂ , CO ₂)		x	
Vanne à diaphragme			x
Débit différentiel			x

Le premier modulateur utilisé en GCxGC était de type chauffant, il a été créé par Liu et Phillips [Liu et Phillips, 1991]. Le modulateur représentait un segment de colonne revêtu d'un métal positionné entre deux colonnes et placé à l'extérieur du four. La modulation était obtenue par chauffage périodique du segment en métal. Ce modulateur n'était pas fiable car son revêtement pouvait se rompre [Ong et Marriott, 2002].

Le Sweeper, second modulateur thermal [Phillips et Xu, 1995; Venkatramani et al, 1996], utilisait un système rotatif de chauffage pour balayer le tube modulateur et pousser les analytes vers la deuxième colonne. Au début de son développement, ce modulateur présentait aussi des problèmes de fiabilité et il était très compliqué à mettre en place.

Ces modulateurs chauffants ont montré une faible robustesse, c'est pourquoi ils ont été remplacés par d'autres mécanismes de modulation à basses températures.

Marriott et ses collègues ont conçu le premier modulateur cryogénique [Kinghorn et Marriott., 1999; Marriott et Kinghorn 2000]. Le système cryogénique de modulation longitudinale (LMCS : "Longitudinal modulating cryogenic system"). Ce modulateur utilise le CO₂ liquide qui piège et focalise les analytes dans les premiers centimètres de la seconde colonne avec une température autour de -50°C. Les analytes sont ensuite rapidement re-vaporisés et injectés en fractions étroites.

La modulation cryogénique LMCS présente des avantages par rapport à la modulation chauffée : [Marriott et Kinghorn, 1999]

- * Le segment de la colonne utilisé pour le piégeage de l'analyte a besoin seulement de l'augmentation de la température de four de GC pour la désorption des composés piégés.
- * Le modulateur est capable de piéger des substances volatiles beaucoup plus efficacement que les modulateurs chauffés, en raison de sa basse température de piégeage.

Mais, il y a aussi des limites à cette approche :

- * L'utilisation du piège en mouvement peut endommager la colonne ou causer d'autres problèmes.
- * Le modulateur n'atteint pas une température suffisamment basse pour piéger les analytes très volatils (température de -50°C obtenue avec le CO₂ liquide).

Le refroidissement par un fluide cryogénique (dioxyde de carbone ou l'azote liquide) est utilisé presque exclusivement pour créer la différence de température nécessaire pour la rétention/libération des analytes [Harynuk et Górecki, 2002]. Un minimum de 100°C en-dessous de la température du four, entraîne le piégeage des

solutés au début de la seconde colonne; puis l'exposition à la température du four assure la désorption et le transfert des solutés en vue de la deuxième séparation. [Bertoncini et al, 2005].

Selon les expériences et une étude comparative, M. Adahchour et collaborateurs [Adahchour et al, 2008] affirment que le modulateur de dioxyde de carbone liquide à double jet est une interface entièrement satisfaisante et robuste pour la majorité des applications.

La figure II.6 suivante schématise le fonctionnement du système cryo-modulateur à deux jets de CO_2 , en différentes étapes :

- * L'étape 0 représente le schéma du montage général du modulateur cryogénique à double jet.
- * L'étape 1 montre le premier jet froid du côté droit qui piège les analytes élués de la première colonne
- * L'étape 2 laisse voir le deuxième jet du côté droit éteint, le point froid se réchauffe rapidement et l'impulsion d'analytes est libérée dans la colonne de la deuxième dimension. Simultanément, le jet de gauche immobilise les composés issus de la première colonne.
- * A l'étape 3, le cycle de modulation redémarre comme dans l'étape 1.

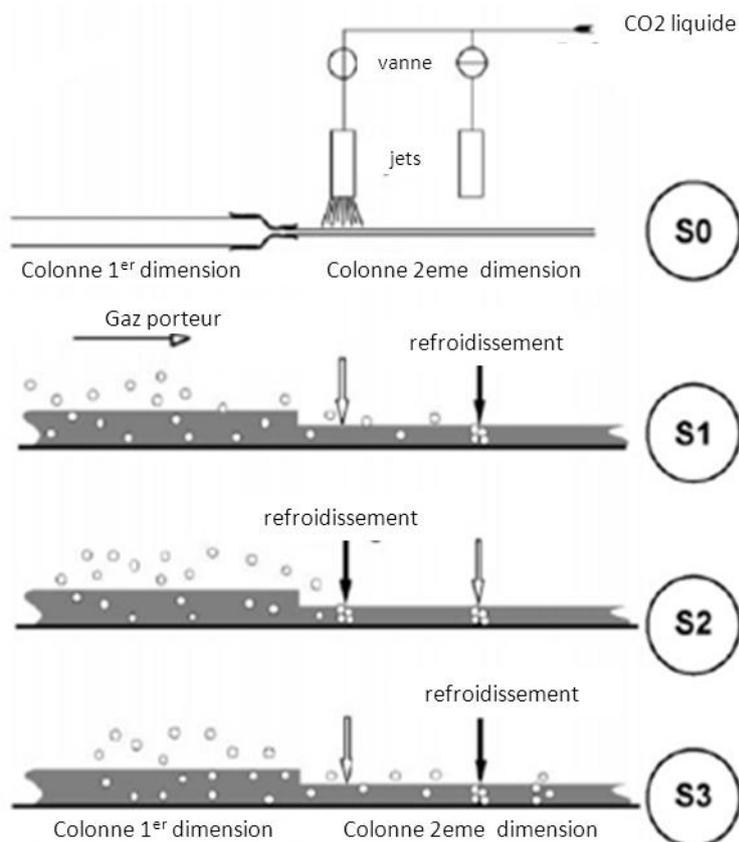


Figure II.6. Modulation cryogénique à deux jets de CO_2 [Adahchour et al, 2008]

Le temps de modulation doit être choisi de telle sorte que tous les analytes contenus dans une première impulsion soient, en principe, élués avant la prochaine impulsion, afin d'éviter des recouvrements.

Il est à noter qu'avec ce type de modulateur, la rampe de programmation de température du système $\text{CG} \times \text{CG}$ est généralement inférieure à celle qui est employée en chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle, c'est à dire qu'elle est de l'ordre de $2\text{-}3^\circ\text{C}/\text{min}$ [Lu, 2005].

II.4.2.2. Colonnes

En théorie, tous les types de phases stationnaires peuvent être utilisés dans la première dimension d'un système $GC \times GC$. Cependant, pour beaucoup d'applications, on utilise des phases non polaires [Venkatramani et al, 1996]; par conséquent, la séparation est obtenue en fonction du point d'ébullition croissant. Avec tous les autres types de colonne, soit moyennement polaire ou sélective, la séparation sera principalement gouvernée par les interactions spécifiques entre les composés et la phase stationnaire sélectionnée, mais dans une certaine mesure également par la volatilité [Marriott, 2002].

Pour la deuxième dimension, une variété de phases peut être choisie en fonction de la substance que l'on souhaite analyser [Adahchour et al, 2008 ; Ong et al, 2002]. Comme la séparation est très rapide (entre 2 et 8 secondes) les analytes ne sont pas influencés par la température et leur séparation se fait en isotherme. Dans cette dimension, seules les interactions spécifiques avec la phase stationnaire régissent la rétention et la séparation.

Si les mécanismes de rétention de deux dimensions fonctionnent indépendamment, la séparation est orthogonale [Marriot et Shellie, 2002] et a, théoriquement, une plus grande capacité de séparation. Des outils mathématiques existent pour évaluer cette orthogonalité dont, notamment, un développé récemment par des membres du laboratoire LETIAM [Nowik et al, 2013].

Un des principaux avantages des séparations en $CG \times CG$, est l'organisation des homologues, congénères et isomères de manière structurée sous forme de bandes ou des groupes continus [Giddings, 1995 ; Marriot et Shellie, 2002] comme le montre l'exemple de séparation d'acides gras dans l'huile de poisson en figure II.7. Cette organisation spécifique facilite l'identification des composés [Bertoncini et al, 2005]. Les représentations des chromatogrammes sous forme de cartes 2D donnent donc une information plus complète sur la composition chimique de l'échantillon que ce qui est possible avec la GC.

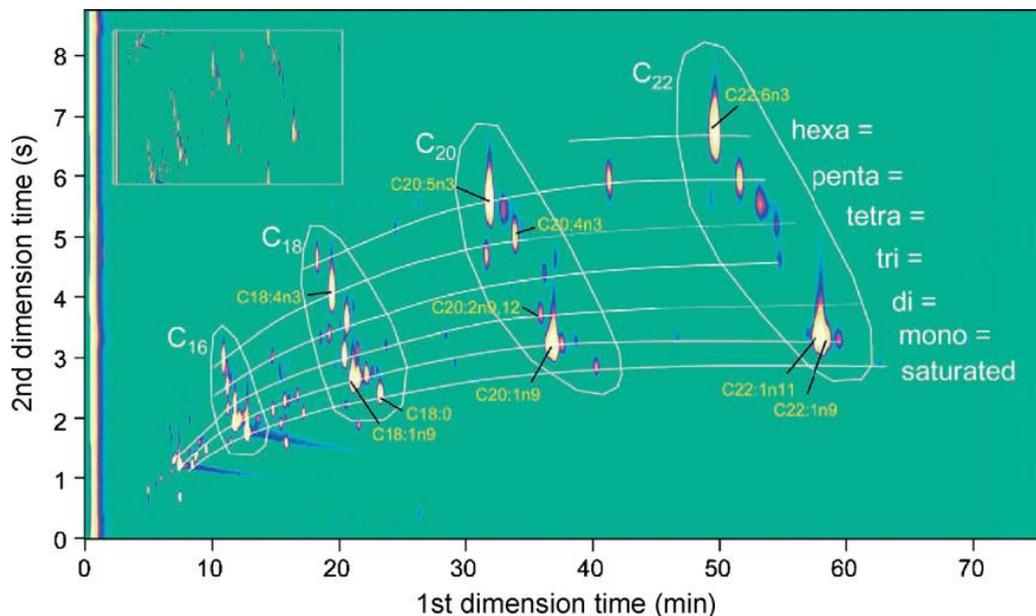


Figure II.7. Organisation d'acides gras dans l'huile de poisson, regroupés par le nombre de carbones, sur le chromatogramme en 2D [Geus et al, 2001].

Dans la plupart des applications, les échantillons sont, d'abord, séparés sur une colonne de dimensions (15 à 30) m x (0,25 à 0,32) mm x (0,1 à 1) μm , contenant une phase stationnaire non polaire et ensuite sur une colonne étroite, beaucoup plus courte (0,5 à 2) m x 0,1 mm x 0,1 μm) contenant une phase stationnaire sélective, de moyennement à très polaire [Adahchour, 2006].

Les séparations les plus satisfaisantes sont obtenues lorsque des composés polaires et/ou ioniques sont étudiés. Les aldéhydes, cétones, alcools et plus particulièrement les acides carboxyliques sont souvent séparés et donc détectés avec une combinaison de colonnes non polaire puis polaire. Cependant, lorsqu'il y a une inversion d'ordre des colonnes (polaire puis non polaire), la séparation chromatographique est parfois améliorée. [Adahchour et al, 2004; Adahchour et al, 2006].

II.4.2.3. Détection

Le système de séparation en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle génère des pics très fins avec une largeur à la base de 100 à 500 ms [Ong et Marriott, 2002; Beens et al, 2001, Oldridge et al, 2008]. Par conséquent, cette technique requiert un détecteur capable de collecter les données avec une grande rapidité. Le détecteur utilisé pour ce type de séparations doit donc avoir une grande vitesse d'acquisition. Cette caractéristique est importante pour obtenir un minimum de points nécessaire à la définition d'un pic chromatographique.

Les détecteurs les plus utilisés sont : le détecteur à ionisation de flamme (FID) [Fonseca et al, 2011; Costa et al, 2015], les détecteurs spécifiques [Blomberg et al, 2004] et les spectromètres de masse.

- * Le détecteur à ionisation de flamme (FID) est le premier à avoir été associé à la GCxGC. Ce détecteur offrant une fréquence d'acquisition jusqu'à 500 Hz [Marriott, 2011] est assez rapide pour détecter les pics étroits élués de la deuxième colonne. Le FID est robuste, fiable, stable et facile à utiliser [Adam et al, 2006]. Le principal inconvénient de ce détecteur est son manque de sélectivité et d'informations structurales concernant les analytes.

- * Les détecteurs spécifiques ont été utilisés en couplage avec la GCxGC avec plus ou moins de succès :
 - Le détecteur à capture d'électron (ECD) est spécialement désigné pour la détection des composés halogénés. Sa vitesse d'acquisition lente est un inconvénient, toutefois un ECD miniaturisé a été développé pour obtenir des vitesses d'acquisition plus élevées (50Hz).

- Le détecteur à émission atomique (AED) détecte 23 éléments (ex : S, Pb, N, C, etc) mais il a l'inconvénient d'avoir une faible vitesse acquisition (10Hz) [*Van Stee et al, 2003*].
 - Le détecteur de soufre à chimiluminescence (SCD), qui comparé au AED a une vitesse d'acquisition plus grande (100 Hz), a l'inconvénient de produire des déformations de pics [*Blomberg et al, 2004*].
 - Le détecteur d'azote à chimiluminescence (NCD) et le détecteur thermoionique (TID) sont très appréciés en GCxGC car ils sont les seuls à avoir une vitesse d'acquisition comparable à celle du FID (200 Hz) [*Adam et al, 2007*].
- ✱ Le spectromètre de masse est un de plus puissants détecteurs pour la GCxGC. La capacité d'identification des structures ajoute une autre dimension au système. Les spectromètres quadripolaires (qMS) et à temps de vol (TOF-MS) sont les plus couramment utilisés avec la GCxGC.
- Le spectromètre de masse à analyseur quadripolaire offre une vitesse d'acquisition modérée par rapport à la TOF-MS [*Goncalves et al, 2012 ; Gorovenko et al, 2014*]. Malgré cette caractéristique défavorable, l'identification et la quantification des analytes est possible. Le travail de Frysinger et Gaines [*Frysinger and Gaines, 1999*], qui analysent le diesel marin en utilisant une vitesse de scan à 2,43 spectres/s avec une reconstruction de pics convenable, en est un bon exemple. Actuellement, les qMS les plus récents sont caractérisés par une vitesse de scan allant jusqu'à 20,000 amu (unités de masse) par seconde, mais l'étendue de la gamme de masse utilisée doit être limitée en fonction des composés à analyser pour obtenir une vitesse de scan allant jusqu'à 50Hz [*Fernandez et al, 2011*]. Cette vitesse permet d'optimiser la production tout en améliorant l'exactitude des spectres de masse.

Le spectromètre de masse à temps de vol (TOF-MS) est caractérisé pour sa grande vitesse d'acquisition qui peut aller jusqu'à 500 spectres de masses par seconde [Leclercq et Cramers, 1998], ce qui est plus que suffisant pour une reconstruction et quantification fiable des pics. Le premier couplage de la GCxGC avec le TOF-MS a été réalisé en l'an 2000 [Van Deursen et al, 2000]. En 2003, la compagnie LECO a proposé un système GCxGC-TOF-MS performant, depuis lors, ce système a gagné en popularité et est considéré par beaucoup comme le meilleur système pour l'identification des analytes au sein des mélanges complexes. Dans ces derniers systèmes comme le type multi-rélecteur [Wollnik et Casares, 2003] et le type multi-tours [Okumura et al, 2003 ; Toyoda et al, 2000], les ions ont une longue trajectoire de vol dans un espace compact, ce qui améliore la résolution de masse. Cependant la limitation du système réside dans le fait que les ions avec une grande vitesse (ions avec petite m/z) ont un tour d'avance sur les ions avec une petite vitesse (ions avec grande m/z) lorsque les ions volent sur la même trajectoire plusieurs fois.

Pour surmonter ce problème, JEOL a récemment développé un système optique ionique qui utilise une trajectoire d'ions en spirale. Avec la trajectoire en spirale, il est possible de parvenir à une résolution et une exactitude de masse supérieures à celles des systèmes à réflectron d'optique ionique [Sato, 2010].

Toutefois, le coût élevé du TOF-MS et la plus grande disponibilité de la qMS dans les laboratoires ont, d'une certaine manière, restreint l'utilisation du TOF-MS.

II.4.3. Applications de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle à l'analyse des acides organiques

La chromatographie multidimensionnelle peut apporter des informations supplémentaires, par rapport à la classique GC-MS, dans la recherche des nouveaux biomarqueurs et ainsi améliorer le profilage dans les études du métabolome urinaire.

En 1998, une méthode de chromatographie multidimensionnelle dite énantiomère-DGC-MS permettant la séparation des énantiomères D/L de l'acide lactique et des dérivés de l'acide alpha-hydroxycarboxylique a été proposée, dans le cadre de l'analyse des acides organiques urinaires [Heil et al, 1998].

La GCxGC a aussi été utilisée pour l'analyse quantitative d'énantiomères d'acides aminés dans le sérum et l'urine. Cette étude a réussi à séparer 20 énantiomères d'acides aminés incluant « L-Leucine » et « D-Alanine » qui ne pouvaient pas être séparés sur une colonne chirale en GC-MS [Waldhier et al, 2011].

Par ailleurs, au fil des années, des stratégies de traitement automatisé en GCxGC se développent: l'algorithme « DotMap », qui indique la localisation de la similarité la plus probante envers le spectre de masse de l'analyte recherché, a été utilisé pour localiser des métabolites urinaires d'intérêts [Sinha et al, 2004]. Cet algorithme « DotMap » a permis de localiser, avec succès, 12 acides organiques ciblés dans l'urine d'un enfant. Une autre stratégie de traitement automatisé de données, fondée sur l'utilisation des spectres de masse et des temps de rétention, pour la recherche ciblée et le dosage de métabolites pathologiques a été développée. Cette méthode a été appliquée pour la détermination de biomarqueurs de cinq erreurs innées du métabolisme [Wojtowicz et al, 2010]. Mais ces traitements restent encore peu diffusés.

Kouremenos et al. ont étudié le profil anormal de cinq patients en utilisant une méthode de dérivation assistée par un four à micro-ondes développé antérieurement [Kouremenos et al, 2010a]. Ils ont trouvé que les défaillances des longues chaînes acyl-CoA déshydrogénase et du mitochondrial 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA synthases

augmentent significativement la concentration des acides dicarboxyliques. Grâce à la sensibilité et au pouvoir résolutif de la GCxGC, la crotonyl-glycine a été identifiée comme un nouveau biomarqueur spécifique de la défaillance 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase [Kouremenos et al, 2010b].

Ces résultats témoignent des atouts de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la recherche de biomarqueurs urinaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adahchour M, Beens J, Brinkman U.A.Th. Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1186 67-108.

Adahchour M, Beens J, Vreuls R.J, Batenburg A.M, Brinkman U.A. Comprehensive two-dimensional gas chromatography of complex samples by using a reversed-type column combination: application to food analysis. *J. Chromatogr. A*. 2004,1054, 47-55

Adahchour M, Beens J, Vreuls R.J.J, Brinkman U.A.Th. Recent development in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). I. Introduction and instrumental. *Trends Anal. Chem.* 2006, 25,438-454.

Adam F, Bertoncini F, Brodusch N, Durand E, Thiebaut D, Espinat D, Hennion M.C. New benchmark for basic and neutral nitrogen compounds speciation in middle distillates using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2007, 1148, 55-64.

Adam F, Bertoncini F, Coupard V, Charon N, Thiebaut D, Espinat D, Hennion M.C. Using comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of oxygenates in middle distillates: I. Determination of the nature of biodiesels blend in diesel fuel. *J. Chromatogr. A.*, 2006, 1186, Issues 1-2, 236-244.

Beens J, Adahchour M, Vreuls R.J.J, van Altena K, Brinkman U.A.Th. Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J.Chromatogr. A*. 2001, 919, 127-132.

Bertoncini F, Vendeuvre C, Espinat D, Thiébaud D. Apport de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la caractérisation de matrices. *Spectra Analyse*. 2005, 247, 26-31.

Blomberg J, Riemersma T, van Zuijlen M, Chaabani H. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with fast sulphur-chemiluminescence detection: implications of detector electronics. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1050, 77-84.

Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart DS. The human urine metabolome. *PLoS One*. 2013, 8(9):e73076.

Bouchonnet S. La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse, Ed. TEC&DOC, 2006.

Boujet C, Drouet C, Decoux G, Favier A. Etude d'extraction des acides organiques urinaires. Etude préalable à leur séparation en chromatographie en phase gazeuse. J. Chromatogr. 1982, 228, 67-74.

Costa C.G, Guérand W.S, Struys E.A, Holweda U, ten Brink H.J, Tabares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of β -oxidation defects using GC-NCI-MS. J. Pharm. Biochim. Anal. 2000, 21, 1215-1224.

Costa R, Fanali C, Pennazza G, Tedone L, Dugo L, Santonico M, Sciarrone D, Cacciola F, Cucchiarini L, Dachà M, Mondello L. Screening compounds composition of white truffle during storage by GCxGC (FID/MS) and gas sensor array analyses. Food Sci. Techn. 2015, 60, 905-913.

Chaves das Neves H.J, Freitas A.M. Introdução à cromatografia gas-liquido de alta resolução. Dias de Sousa.Ltda. Primeira edição. 1996.

Dawson P.H., Quadrupole mass spectrometry and its applications, 1976, Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.

De Hoffmann E. Stroobant V. Spectrometrie de masse. Cours et exercices corrigés. Dunod, 2005, Troisième édition, Paris, pag. 425.

Dimandja J.M.D, Stephen B.S, Grainger J, Patterson D.G. Application of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC6GC) to the Qualitative Analysis of Essential Oils. J. High Resol. Chromatogr. 2000, 23, 208-214.

Divry P, Vianey-Liaud C, Cotte J. Routine gas chromatographic/mass spectrometric analysis of urinary organic acids. Results over a three year period. Biomed. Environ. Mass Spectr. 1987, 14, 663-668.

Dutriez Th, Courtiade M, Thiébaud D, Dulot H, Hennion M. Improved hydrocarbons analysis of heavy petroleum fractions by high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography. Fuel, 2010, 89, 2338-2345.

Fernandez X, Filippi J.J, Jeanville M. Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions: GC-GC et GCxGC. Techniques de l'ingénieur. 2011, p1489.

Fernandez-Peralbo M.A, Luque de Castro M.D. Preparation of urine sample prior to targeted or untargeted metabolomics mass spectrometry analysis. *Trends Anal. Chem.* 2012, 41, 75-85.

Fonseca de Godoy L.A, Wang Hantao L, Pozzobon Pedroso M, Poppi R.J. Augusto F. Quantitative analysis of essential oils in perfume using multivariate curve resolution combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 2011, 699, 120-125.

Frysjnger G.S, Gaines R.B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection (GCxGC/MS). Applied to the analysis of petroleum. *J. Sep. Sci.* 1999, 22, 251-255.

Fu X, Kuhara M, Iga M, Yamaguchi S. Gas chromatographic - mass spectrometric screening for acidemias using dried urine filter paper: determination of ketoacids. *J. Chromatogr. B.* 2001, 758, 87-94.

Geus H.J, Aidos I, Boer J, Luten J.B, Brinkman U. A. Th. Characterisation of fatty acids in biological oil samples using comprehensive multidimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2001, 910, 95-103

Giddings J.C. Concepts and comparison in multidimensional separation. *J. High Resol. Chromatogr.* 1987, 10, 319-323.

Giddings J.C. Sample dimensionality: A predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. *J. Chromatogr. A.* 1995, 703, 3-15.

Goncalves Silva B.J, Quinto Tranchida P, Pucardo G, Costa Queiroz M.E, Mondello L, Mauro Lancas F. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to rapid scanning quadrupole mass spectrometry for quantitative analysis. *J. Chromatogr. A.* 2012, 1255, 177-183.

Gorovenko R, Krupcik J, Spanik I, Bockova I, Sandra P, Armstrong D. On use of quadrupole mass spectrometric detection for flow modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2014, 1330, 51-60.

Greter J, Jacobson C.E, Urinary organics acids: isolation and quantification for routine metabolic screening. *Clin Chem* 1987, 33(4), 473 - 480.

Grob K, Neukom H. Factors affecting the accuracy and precision of cold on column injections in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1980, 189, 109-117.

Guthery B, Bassindale T, Bassindale A, Pillinger C.T, Morgan G.H. Qualitative drug analysis on hair by comprehensive two-dimensional gas chromatography / time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 2010, 1217, 4402-4410.

Harrison A.G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry.* CRC Press Boca Raton, Florida, 1992.

Harynuk J, Górecki T. Design considerations for a GC×GC system. *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 304-310.

Heil M, Podebrad F, Beck T, Mosandl A, Sewell A. C, Böhles H. Enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of urinary organic acids. *J. of Chromatogr. B.* 1998, 174, 119-126.

Hoh E, Dooder N.G, Lehotay S.J, Pangallo K.C, Reddy C.M, Maruya K.A. Non target Comprehensive two-dimensional gas chromatography / Time-of-flight mass spectrometry method and software for inventorying persistent and bioaccumulative contaminants in marine environments. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 8001-8008.

Hori D, Hasegawa Y, Kimura M, Yang Y, Verma I.C, Yamaguchi S. Clinical onset and prognosis of Asian children with organic acidemias, as detected by analysis of urinary organic acids using GC/MS, instead of mass screening. *Brain Develop.* 2005, 27, 39-45.

Jellum E. Profiling of human body fluid in healthy and diseased states using gas chromatography and mass spectrometry with special references to organics acids. *J chromatogr* 1977, 143, 427-462

Khummueng W, Harynuk J, Marriott P.J. Modulation ratio in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chem.* 2006, 78, 4578-4587.

Kimura M, Hasegawa Y, Nakagawa K, Kajita M, Watanabe K, Yamaguchi S. A sensitive method for 4-hydroxybutyric acid in urine using gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003, 792, 141-144

Kinghorn R.M, Marriott P.J. High Speed Cryogenic Modulation - A Technology Enabling Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 1999, 22, 235-238.

Koek M.M, van der Kloet F.M, Kleeman R, Kooistra T, Verheij E.R, Hankemeier Th. Semi-automated non-target processing in GCxGC-MS metabolomics analysis: applicability for medical studies. *Metabol.* 2011, 7, 1-14.

Kouremenos K.A, Harynuk J.J, Winniford W.L, Morrison P.D, Marriot P.J. One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2010a, 878 1761-1770.

Kouremenos K. A, Pitt J, Marriott P. J. Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography: Application to the diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery. *J. Chromatogr. A.* 2010b, 1217, 104-111.

Kuhara T. Diagnosis of inborn errors metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B,* 781, 2002, 497-517.

Leclerq P.A and Cramers C.A. High-speed GC-MS. *Mass Spectr. Rev.* 1998, 17, 37-49.

Liebich H.M. Basic profiles of organic acids in urine. *J. of Chrom B,* 1990, 525, 1-14.

Liu Z., Phillips J.B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface *J. Chromatogr. Sci.* 1991, 29, 227-231.

Liu Z, Sirimanne S.R, Patterson D.G.Jr, Needham L.L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the fast separation and determination of pesticides extracted from human serum. *Anal Chem.* 1994 Oct 1;66(19):3086-92

Longevialle P. Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques, 1981, Masson.

Looser R, Krotzky A.J, Trethewey R.N. Metabolite profiling with GC-MS and LCMS. A key tool for contemporary biology. *Metabolome Analyses: Strategies for Systems Biology,* 2005.

Lu X, Kong H, Li H, Ma C, Tian J, Xu G. Resolution prediction and optimization of temperature programme in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2005, 1086, 175-84.

Majors R.E. Response to the 2003 gas chromatography. User study - trends in column use and techniques. *LCGC North America*, 2003, 21, 960.

Mardens Y., Kumps A., Planchon and Wurth C. Comparison of two extraction procedures for urinary organics acids prior to gas chromatography-mass spectrometry. *J. of chrom. B*, 1992, 577, 341-346.

Marriott P.J. in Mondello (Ed). Detection technologies and application in comprehensive two-dimensional Gas Chromatography. *Comprehensive Chromatography in combination with Masse Spectrometry* . JhonWiley & Sons Inc Hoboken, NJ, USA. 2011, pag 243.

Marriott P, Kinghorn R. Cryogenic solute manipulation in gas chromatography - the longitudinal modulation approach. *Trends Anal. Chem*. 1999, 18, 114-125.

Marriott P.J, Kinghorn R.M. New operational modes for multidimensional and comprehensive gas chromatography by using cryogenic modulation .*J. Chromatogr. A*. 2000, 203-212

Marriot P, Shellie R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends Anal. Chem*. 2002, 21, 573-583.

McNair H.M, Miller J.M. *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons.Inc. New York, USA. 1998.

Mendham, Denney, Barnes, Thomas. *Analyse chimique quantitative de Vogel*. Ed. De Boeck&Lacrier S.A., Belgique. 2006.

Moussa F. Benoit J.F, Thiolouse E. Berthe M.C, Courderc R. Spectrometrie de masses et maladies metabolomiques héréditaires. *Revue Francophone des laboratoires*. 2011, 437, 65-72.

Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S. Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *J. Chromatogr. B*. 2010, 878, 942-948.

Nowik W., Bonose M., Héron S., Nowik M., Tchapla A. Assessment of Two-Dimensional Separative Systems Using the Nearest Neighbor Distances Approach. Part II: Separation Quality Aspects. *Anal. Chem.*, Volume 85, Issue: 20, 2013, 9459-9468

Nowik W., Héron S., Bonose M., Nowik M., Tchapla A. Assessment of Two-Dimensional Separative Systems Using the Nearest Neighbor Distances Approach. Part I: Orthogonality Aspects. *Anal. Chem.*, Volume 85, Issue: 20, 2013, 9449-9458

Okumura D, Toyoda M, Ishihara M and Katakuse I. A simple Multi-Turn Time of Flight Mass Spectrometer 'MULTUM II'. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2003, 51, 349-353.

Oldridge N, Panic O, Gorecki T. Stop-flow comprehensive two-dimensional gas chromatography with pneumatic switching. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3375-3384.

Ong R.C.Y and Marriott P.J. A review of basic concepts in comprehensive two dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 2002, 40, 276-291.

Ong R, Marriott P, Morrison P, Haglund P. Influence of chromatographic conditions on separation in comprehensive gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2002, 962, 135-162.

Phillips J.B, Xu J. Comprehensive multi-dimensional gas chromatography. *J. Chromatography A*, 1995, 703, 327-334.

Prieto J.A, Andrade F, Aldamiz-Echevarria L, Sanjurjo P. Analisis de acidos organicos en orina mediante cromatografia de gases-espectrometria de masas. *Quim. Anal.* 2007, 26, 66-72.

Satoh T. Development of JMS-S3000: MALDI-TOF/TOF Utilizing a Spiral Ion Trajectory. *JEOL News.* 2010, 45, 34-37.

Sim K.G, Hammond J, Wilcken B. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid β -oxidation disorders. *Clin. Chim. Acta.* 2002, 323, 37-58.

Sinha A.E, Hope J.L, Prazen B.J, Nilsson J, Jack R.M, Synovec R.E. Algorithm for locating analytes of interest based on spectral similarity in GCxGC-TOF-MS data: analysis of metabolites in human infant urine. *J. Chromatogr. A.* 2004, 26, 209-215.

Song S.M, Marriott P, Kotsos A, Dummer O.H, Wynne P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Forensic Sci. Int.* 2004, 143, 87-101.

Thompson J.A. Markey S.P. Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas chromatography-mass spectrometry: comparison of isolation methods. *Anal Chem* 1975, 47, 1313-1321.

Toyoda M, Ishihara M, Yamaguchi S, Ito H, Matsuo T, Reinhard R and Rosenbauer H. Construction of a New Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 163-167.

Van Deursen M, Beens J, Reijenga J, Lipman P, Cramers C, Blomberg J. Group-type identification of oil samples using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a time-of-flight mass spectrometer (GCxGC-TOF). *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000, 23, 507-510.

Van Stee L.L.P, Beens J, Vreuls R.J.J, Brinkman U.A.Th. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with atomic emission detection and correlation with mass spectrometric detection: principles and application in petrochemical analysis. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1019, 89-99.

Venkatramani C.J, Xu J, Phillips J.B. Separation orthogonality in temperature programmed comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1486-1492.

Ventura G.T, Simoneit B.R.T, Nelson R.K, Reddy C.M. The composition, origin and fate of complex mixtures in the maltene fractions of hydrothermal petroleum assessed by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Organic Geochemistry*, Volume 45, April 2012, Pages 48-65.

Wajner M, Moura Coelho D, Ingrasia R, Buker de Oliveira A, Brandt Busanello E.N, Raymond K, Flores Pires R, Moura de Souza C.F, Giugliani R, Regla Vargas C. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clin. Chim. Acta.* 2009, 400, 77-81.

Waldhier M.C, Dettmer K, Gruber M, Oefner P.J. Improved enantiomer resolution and quantification of free D-amino acids in serum and urine by comprehensive two-

dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2011, 1218, 4537-4534.

Wang X, Li P, Zhang W, Zhang Q, Ma F, Yu L, Wang L. Screening for pesticide residues in oil seeds using solid-phase dispersion extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 1634-1643.

Wittkowski, R.; Matissek, R. *Capillary Gas Chromatography in Food Control Research.* (Eds). Technomic Publishing Co, Inc, Lancaster, U.K. 1990

Wojtowicz P, Zrostlikova J, Kovalczuck T, Schurek J, Adam T. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *J. Chromatogr A.* 2010, 1217, 8054-8061.

Wollnik H. and Casares A. An energy-isochronous multi-pass time-of-flight mass spectrometer consisting of two coaxial electrostatic mirrors. *Int. J. Mass Spectrom.* 2003, 227, 217-222.

Xu K, Wang L, Cai H, Zhang T, Zhang Ch, Matsumoto I. Screening for inborn errors of metabolism using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2001, 758, 75-80.

Yuwono, M.; Indrayanto, G. *Gas Chromatography system instrumentation.* Encyclopedia of Chromatography. Cazes, J. (Ed.). Marcel Dekk



CHAPITRE III
MATERIELS ET METHODES

«L'urine constitue une source particulière et très attractive pour la recherche de biomarqueurs, car c'est le milieu biologique où sont éliminés tous les composés provenant du métabolisme. Elle est facilement accessible et disponible grâce à son échantillonnage non-invasif, surtout lorsqu'on travaille face aux populations infantiles.

De nos jours, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est la technique la plus utilisée pour la détection et la quantification des acides organiques urinaires. Au sein du laboratoire de biochimie de l'hôpital pédiatrique Armand Trousseau- Roche Guyon, l'analyse des acides organiques est très souvent effectuée, par cette technique, sur les échantillons urinaires d'enfants présentant des troubles neurologiques mais les aciduries organiques sont détectées dans très peu de cas (sur 1000 échantillons seulement 0,5 % positifs).

L'utilisation des techniques classiques de séparation comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour rechercher de nouveaux biomarqueurs des troubles métaboliques est une tâche difficile, car le milieu urinaire est un mélange très complexe. Dès lors, l'utilisation d'une méthode de séparation plus efficace telle que la chromatographie gazeuse bidimensionnelle devrait aider dans cette quête.

Après une étape de préparation d'échantillon, les extraits urinaires seront analysés en chromatographie gazeuse mono ou bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse »

III.1. Echantillon urinaire

III.2. Protocole de préparation de l'échantillon

III.2.1. Dilution urinaire

III.2.2. Extraction des acides organiques

III.2.3. Dérivation

III.3. Méthodes d'analyses

III.3.1 Chromatographie en phase gazeuse

III.3.2 Chromatographie gazeuse bidimensionnelle

III.3.3 Spectrométrie de masse

III.4. Acquisition et traitements des données

III.5. Procédure de validation de méthode

III.1. ECHANTILLON URINAIRE

Pour notre étude, le prélèvement a été effectué préférentiellement sur la première urine du matin, car pendant la nuit l'urine s'accumule dans la vessie et les métabolites se trouvent plus concentrés. Dans cette situation, il est plus facile de mettre en évidence les troubles du métabolisme. Le patient doit être de préférence à jeun (sauf en cas d'urgence) pour éviter des interférences avec d'autres aliments et ne pas avoir pris de médicaments. Dans le cas contraire, cela doit être signalé.

Les échantillons d'urine ont été recueillis auprès d'enfants et de patients (âgés de 1 à 10 ans) souffrant de troubles neurologiques avec étiologie inconnue. Les enfants sains qui ont participé à l'étude suivaient un régime libre et sans aucune restriction. Ils étaient en bonne santé, sans symptômes de maladies et sans aucune prise de suppléments vitaminiques ou de médicaments. Les échantillons d'urine ont été prélevés au département de neurologie pédiatrique de l'hôpital Trousseau dans le cadre de la gestion clinique normale, avec le consentement éclairé écrit des parents ou des représentants légaux de chaque patient. Cette étude a été réalisée conformément à la réglementation en matière de la santé publique française (code de la santé Publique - Article L1121-3, modifié par la loi n° 2011-2012, 29 Décembre 2011 - article 5).

Une fois l'échantillon obtenu, l'urine est soumise à centrifugation pour la précipitation de son sédiment urinaire qui contient des hématies, des leucocytes, des cylindres (constitué de protéines) et cristaux. Ensuite, une mesure de créatinine est effectuée par un test colorimétrique enzymatique (CREA Plus, Roche), afin de l'utiliser comme facteur de dilution urinaire.

Après cette mesure, les échantillons ont été stockés dans des récipients en verre et ont été congelés à -20°C dans les délais les plus courts possibles. Avant chaque analyse, l'échantillon urinaire a été décongelé à température ambiante pendant quelques minutes.

III.2. PROTOCOLE DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Avant analyse, l'échantillon urinaire est dilué de façon à ce que la concentration de créatinine soit égale à 1mmol/L, puis il suit deux étapes de préparation : l'extraction et la dérivation.

III.2.1. Dilution urinaire

Les valeurs normales de la créatinine en urine sont déterminées par sexe :

- Homme : 3,5 - 25 mmol/L
- Femme : 2,6 - 20 mmol/L

Pour l'analyse des AO, la concentration de créatinine urinaire doit être diluée à 1 mmol/L. Le volume d'urine à utiliser pour l'extraction des acides organiques est donc compris entre 200 et 1000 μL .

Le volume maximum de l'échantillon à utiliser correspond à 1000 μL . Dans le cas que l'urine a une concentration égale ou inférieure à 1mmol/L, on doit utiliser un volume constant de 1mL. On utilise également un volume constant de 200 μl pour les urines ayant une concentration supérieure ou égale à 5 mmol/L. Ce volume ne peut jamais être inférieur sinon les rendements d'extraction deviennent mauvais. Le volume des urines dont la concentration de créatinine est comprise entre 1 et 5 mmol/L est calculé par la formule suivante :

$$V_u = \frac{1}{[\text{créat}]} \times 1000 \quad \text{Eq.1}$$

V_u = volume urinaire, $[\text{créat}]$ = concentration de créatinine

III.2.2. Extraction des acides organiques

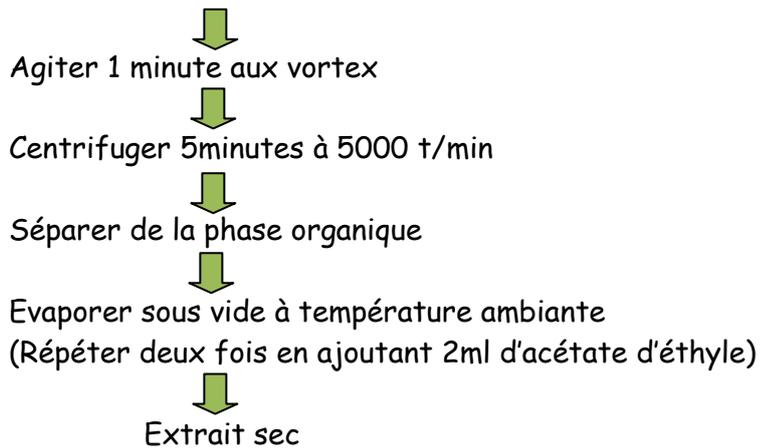
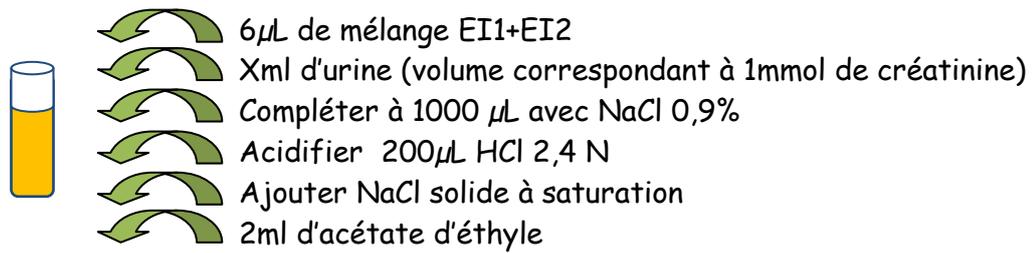
Le protocole d'extraction des acides organiques employé dans cette étude a comme base la méthode qui est couramment utilisée dans le laboratoire de biochimie à l'hôpital Armand Trousseau:

6 μ L d'un mélange de deux composés : l'acide 4-phenylbutyrique et l'acide heptadécanoïque (correspondant aux étalons internes) est inséré tout d'abord au fond d'un tube en verre. Une quantité d'urine (entre 200 et 1000 μ L) est ajoutée puis mélangée avec une solution de chlorure de sodium NaCl 0,9% pour un volume total de 1000 μ L, correspondant à une dilution de 1mmol de créatinine. Ainsi, la concentration de métabolites (exprimés en μ mol/L) est équivalente à de μ mol/mmol de créatinine. Ensuite, la solution est acidifiée avec 200 μ L d'acide chlorhydrique HCl à 2,4N, pour favoriser l'extraction des acides organiques. Après, du NaCl à l'état solide est additionné à saturation pour éliminer les traces d'eau. Puis, 2mL d'acétate d'éthyle sont insérés. Toute la solution est par la suite, mélangée dans un vortex pendant 1 minute et amenée à centrifugation pendant 5 minutes à 5000 rpm. Enfin, la phase organique est introduite dans un évaporateur à température ambiante Speedvac (Savant SPD 1010, Thermo Fisher Scientific, USA). Le processus d'extraction avec l'acétate d'éthyle est répété deux fois pour extraire le maximum de composés. Ce procédé est schématisé en figure III.1.

III.2.3. La dérivation

Dans cette étude, le N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) a été utilisé pour obtenir des dérivés triméthylsilylés (TMS). Nous mélangeons 50 μ L de pyridine avec 50 μ L de BSTFA + 1% TMCS qui sont ajoutés à l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant organique à température ambiante. Après 45 min de réaction à 80°C, la solution est prête à être injectée. Ce procédé est aussi schématisé en figure III.1.

Protocole d'extraction des acides organiques



Protocole de dérivation de l'échantillon

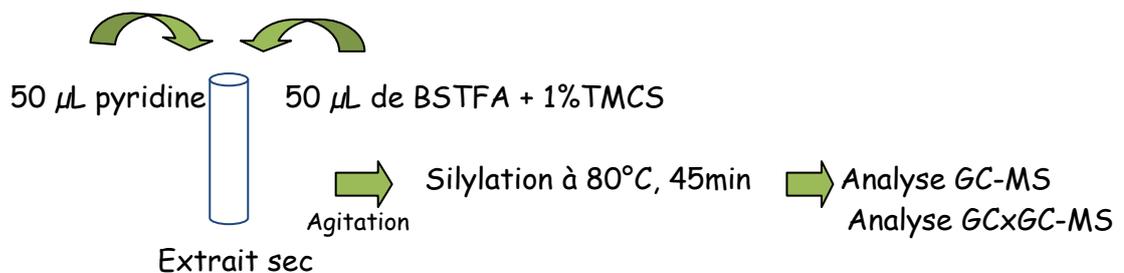


Figure III.1. Schéma du protocole extraction et de dérivation des acides organiques utilisé dans l'étude.

III.3. METHODES D'ANALYSE

III.3.1. Chromatographie en phase gazeuse

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse (GC) ont été effectuées dans le laboratoire de biochimie à l'hôpital Armand Trousseau sur le chromatographe Focus GC (Thermo Electron Corporation, USA). Les conditions opératoires sont les suivantes:

Four:

Température initial (C°)	80
Temps initial (min)	5
Pente (°C/min)	5
Température final	280
Temps final (min)	10
Température max (C°)	350

Injecteur:

Température de base (C°)	250
Mode	split
Flux split (mL/min)	20
Temps de split (min)	0,50
Split ratio	17
Purge constant	oui

Gaz vecteur:

Mode	flux constant
Valeur initiale (mL/min)	1,2
Flux de gaz (mL/min)	10
Compensation de vide	oui

La colonne chromatographique utilisée avec cette technique est :

- TR 5MS de longueur 30m x 0,25mm de diamètre interne x 0,25 μ m d'épaisseur de film.

5% Phényl diméthyl polysiloxane: C'est une phase stationnaire universelle, de nature non polaire, utilisée dans divers domaines d'applications (environnement, alimentaire, biologiques et parfums). Cette phase supporte des températures et son exploitation maximale pouvant aller jusqu'à 370 °C.

III.3.2. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) ont été réalisées sur un chromatographe Trace GCxGC, fourni par Thermo Electron Corporation, France. Cet appareil a les mêmes fonctionnalités que celui utilisé en GC. Il comporte un système de modulation cryogénique à double jet, qu'on va l'utiliser avec un temps de modulation variable, allant de 4 à 9 secondes.

Pour le début de notre étude les conditions opératoires sont presque identiques à celles de la méthode de GC développée précédemment.

Les colonnes utilisées avec cette méthode sont les suivantes :

* **Colonnes avec une phase stationnaire de type 5% Phényl diméthyl polysiloxane:**

- DB-5 de 30m de longueur x 0,25mm de diamètre interne et 0,25 μ m d'épaisseur de film fournie par Agilent technologies J&W.
- TR-5MS de 1m de longueur x 0,1mm de diamètre interne et 0,1 μ m d'épaisseur de film fournie par Thermo Electron corporation.

* **Colonne avec une phase stationnaire en Polyéthylène Glycol**

- TRACE TR-WaxMS de 1m de longueur x 0,1mm de diamètre interne et 0,1 μ m d'épaisseur de film fournie par Thermo Scientific.

Cette colonne capillaire est de nature polaire et sa température maximale d'utilisation est de 280 °C.

* **Colonnes avec une phase stationnaire 50% phenyl-polysilphenylene-siloxane :
BPX 50**

- BPX 50 de 30m de longueur x 0,25mm de diamètre interne et 0,25 μ m d'épaisseur de film fournie par SGE Analytical Science.
- BPX 50 de 1m de longueur x 0,1mm de diamètre interne et 0,1 μ m d'épaisseur de film fournie par SGE Analytical Science.

La phase stationnaire en 50% polysilphenylène est de polarité moyenne utilisable jusqu'à 350°C.

Les combinaisons de colonnes utilisées en GCxGC sont indiquées dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Combinaison de colonnes utilisées dans la GCxGC-MS

Jeu de colonnes	Première dimension	Deuxième dimension
Non polaire/Polair	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	TRACE TR-WaxMS (1m x 0,1mm x 0,1µm)
Non polaire/ moyennement polaire	DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	BPX50 (1m x 0,1mm x 0,1µm)
moyennement polaire/ non polaire	BPX50 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	TR-5MS (1m x 0,1mm x 0,1µm)

III.3.3. Spectrométrie de Masse

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse DSQ II fourni par Thermo Scientific (USA) avec les paramètres d'acquisition suivants:

Température de source (C°)	200
Temps de délais avant acquisition (min)	5
Mode de scan	full scan
Range de scan	2984,11
Gamme de masse (m/z)	70-600
Mode d'ionisation	Ionisation électronique
Energie d'ionisation	70eV
Température de la ligne de transfert	200°C

III.4. ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES

Le logiciel utilisé pour l'acquisition des données en GC-MS et GCxGC-MS est Xcalibur 20.7 (Thermo Scientific).

Le logiciel Chrom-Card (Thermo Scientific) a été utilisé pour l'acquisition et la visualisation des cartes graphiques en double dimension (2D) dans le cas des analyses en GCxGC-MS.

Les quantifications se font par mesure de l'aire du ou des pic(s) chromatographique(s) de chaque composé, sachant qu'en GCxGC-MS, un composé peut être représenté par plusieurs pics (modulation) sur le chromatogramme brut.

Les données sont ensuite traitées suivant deux approches :

- soit grâce à un logiciel LC-GC CONCORDANCE basé sur la comparaison de chromatogrammes bruts
- soit par la comparaison d'images comme les cartes chromatographiques 2D grâce à nos collaborateurs de l'ESPCI.

III.5. PROCEDURE DE VALIDATION DE METHODE

La validation de méthode est menée en employant l'urine d'un enfant sain avec une alimentation variée et sans aucune prise de médicaments. Cette urine est dopée avec des acides organiques représentant les métabolites d'intérêt dans le diagnostic de maladies neurodégénératives. Il s'agit de:

- ❖ L'acide méthylmalonique (MMA): biomarqueur de l'acidurie méthylmalonique,
- ❖ L'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique (3-OHMGA): biomarqueur de l'acidurie 3-hydroxy-3-méthylglutarique,
- ❖ L'acide phénylpiruvique (PHPA): biomarqueur de la phénylcétonurie et
- ❖ L'acide quinolinique (QUIN), biomarqueur de la neuro-toxicité.

La linéarité de la méthode a été déterminée à partir de l'étude des courbes d'étalonnage des quatre acides organiques aux concentrations: 7, 15, 25 et 50 $\mu\text{mol/L}$.

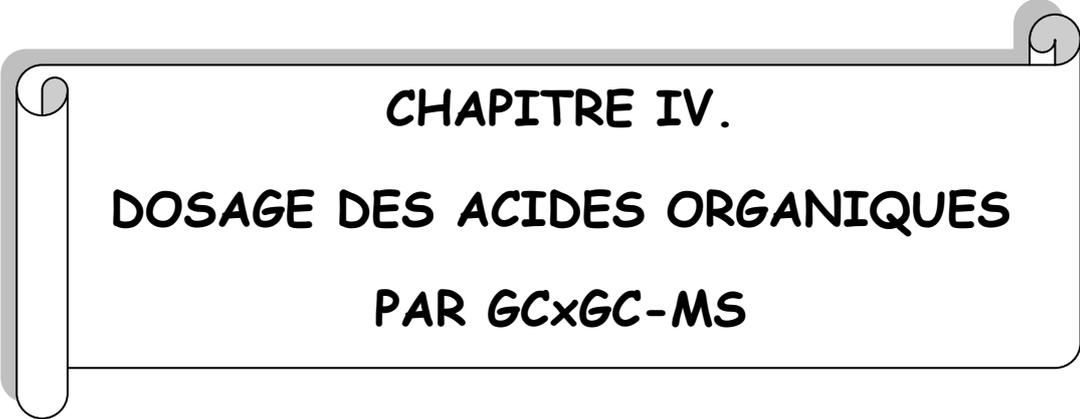
L'estimation de la répétabilité et de la précision intra-laboratoire ont été déterminées avec trois injections par jour, pendant 5 jours. L'échantillon urinaire a été surchargé avec 5 acides organiques (MMA, 3 OHMGA, PHPA, QUIN, et l'acide cis-cotinique (CAA)) à trois concentrations différentes : 7, 25 et 50 $\mu\text{mol/L}$.

Les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ) ont été définies à partir des données provenant des courbes d'étalonnage. La limite de quantification

basée sur le rapport signal/bruit (S/N) doit être égale à $10 \times S/N$ et la limite de détection considérée par le rapport signal/bruit (S/N) doit être égale à $3 \times S/N$.

Les rendements d'extraction ont été déterminés pour les 5 acides organiques nommés précédemment. Les solutions des composés standards et de l'urine surchargée ont été analysées avec les mêmes concentrations.

Les résultats sont donnés par rapport à un étalon interne : l'acide 4-phenylbutyrique.



CHAPITRE IV.
DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES
PAR GCxGC-MS

- IV.1. Développement d'une voie de dosage des acides organiques par CGxGC-MS.
 - IV.1.1. De la GC-MS vers la CGxGC-MS
 - IV.1.2. Développement de la méthode CGxGC
 - IV.1.2.1. Modulation
 - IV.1.2.2. Programmation de température
 - IV.1.2.3. Combinaison de colonnes
 - IV.1.2.4. Développement de la procédure de préparation d'échantillon
 - IV.1.3. Détection par spectrométrie de masse
 - IV.1.4. Stabilité de l'échantillon
- IV.2. Comparaison qualitative de la méthode CGxGC-MS à une méthode GC-MS classique
 - IV.2.1. Comparaison des profils urinaires: GC-MS Vs CGxGC-MS
 - IV.2.2. Les métabolites urinaires détectés
- IV.3. Quantification
 - IV.3.1. Essais préliminaires
 - IV.3.2. Développement de la méthode de préparation d'échantillon
 - IV.3.3. Validation de la méthode CGxGC-MS
 - IV.3.3.1. Linéarité
 - IV.3.3.2. Fidélité intermédiaire
 - IV.3.3.3. Limite de détection et quantification
 - IV.3.4. Application à l'acide quinolinique
 - IV.3.4.1. L'acide quinolinique et la neuro-dégénérescence
 - IV.3.4.2. Quantification de l'acide quinolinique chez l'enfant
- IV.4. Comparaison de profils: résultats préliminaires
 - IV.4.1. Comparaison de chromatogrammes: Logiciel GC-LC Concordance
 - IV.4.2. Comparaison de cartes graphiques: collaboration ESPCI

« L'objectif principal de ce travail est d'évaluer la récente technique de GCxGC-MS pour le profilage métabolique qualitatif et quantitatif des urines d'enfants avec, pour perspectives, la découverte de nouveaux candidats biomarqueurs d'erreurs métaboliques associés à des troubles neurologiques.

Dans un premier temps, grâce à l'étude systématique des différentes conditions de séparation en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) couplée à un spectromètre de masse simple quadripolaire, nous développerons une méthode de dosage des acides organiques urinaires.

Dans un second temps, l'apport de la méthode GCxGC-MS dans le profilage des composés organiques urinaires sera évalué tant qualitativement que quantitativement. Une attention particulière sera consacrée à la préparation d'échantillon.

Cette méthode validée, sera appliquée à des échantillons urinaires recueillis d'une part chez des enfants sains et d'autre part chez des enfants présentant des troubles neurologiques. »

IV.1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES PAR GCxGC-MS.

IV.1.1. De la GC-MS vers la GCxGC-MS : ajout d'une colonne

Comme indiqué dans le chapitre précédent, une des principales différences de la chromatographie bidimensionnelle (GCxGC) par rapport à la chromatographie monodimensionnelle (GC), est l'ajout, en série, d'une colonne plus courte et de sélectivité différente. Pour l'analyse des acides organiques en GC-MS, la colonne couramment utilisée est de nature non polaire (5% phenyl dimethyl polysiloxane). L'analyse d'une matrice urinaire surchargée de plusieurs métabolites standards en GC-MS avec la programmation de température classique de 80°C - 5°C/min - 280°C donne un chromatogramme type présenté en Figure IV.1.

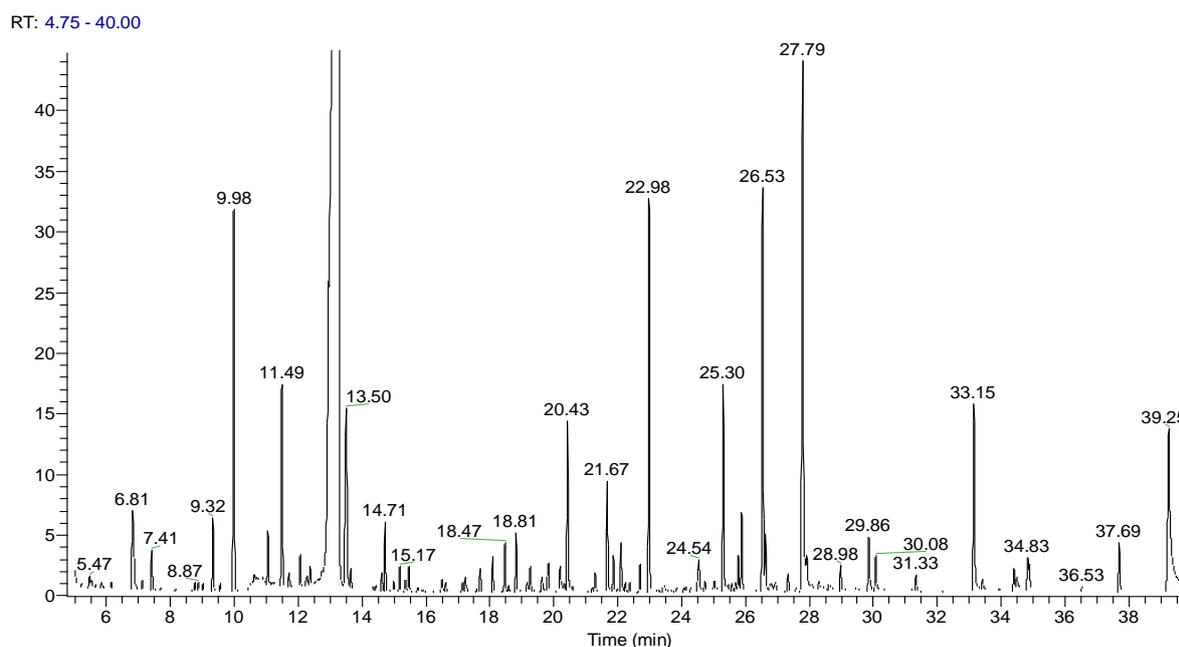


Figure IV.1. Chromatogramme en GC-MS des acides organiques.

Pour mettre en exergue les effets dus à l'ajout de la deuxième colonne lors du transfert de méthode de la GC à la GCxGC, une colonne de même nature sera donc

maintenue, dans un premier temps, et le couple de colonnes non polaire/polaire A (tableau IV.1) a été testé sans modulation cryogénique

Tableau IV.1. Couple de colonnes A

Colonne	Dimension	Polarité	Phase stationnaire
1 ^{ière}	30m x 0,25mm x 0,25 μ m	Non polaire	DB-5, 5% phényl diméthyl polysiloxane
2 ^{ième}	1m x 0,1mm x 0,1 μ m	Polaire	TR-WAXMS, polyéthylène glycol

Tableau IV.2. Comparaison des acides organiques détectés en GC-MS et GCxGC-MS sans modulation.

Acide organique	Tr GC-MS	Tr GCxGC-MS
Acide lactique	6,78	10,47
Acide glycolique	7,40	10,89
Acide oxalique	9,30	-
Acide 2-hydroxypropionique	9,54	12,99
Acide 3-hydroxybutyrique	9,98	13,51
Acide 3-hydroxyisovalérique	11,48	14,98
Acide méthylmalonique	11,73	15,18
Acide 2-éthylhydracrylique	12,05	15,56
Acide 4-hydroxybutyrique	12,37	15,69
Acide éthylmalonique	13,63	17,03
Acide succinique	14,71	17,89
Acide DL-glycérique	15,24	18,56
Acide malique	15,79	19,22
Acide fumarique	16,05	18,79
Acide glutarique	17,56	20,31
Acide 3-CH ₃ -glutarique	17,70	20,85

Acide adipique	19,79	22,86
Acide 4-phénylbutyrique (EI1)	20,42	23,30
Acide 2-hydroxyglutarique	21,29	24,67
Acide α -cétoglutarique	22,10	30,58
Acide N-acétylaspartique	23,45	-
Acide subérique	24,29	27,30
Acide cis-acotinique	25,31	-
Acide heptadecanoïque (EI2)	33,15	35,95

Les résultats préliminaires obtenus montrent:

- * Un décalage approximatif de 4 min des temps de rétention (t_r) des composés analysés par rapport à ceux obtenus en GC-MS (tableau IV.2). Ce décalage peut être dû à la diminution de la diffusion de gaz dans les colonnes. Comme la première colonne est plus large par rapport à la deuxième qui est plus courte et étroite, la diffusion du gaz est plus lente en comparaison à la résistance exercée par la seconde colonne. Par ailleurs, nous avons expérimenté le fait que le positionnement de la colonne au niveau de la source influençait le décalage de t_r des composés analysés.
- * Une variation de l'ordre d'élution pour certains métabolites. En effet, l'acide fumarique, l'acide malique, l'acide 2-OH glutarique, l'acide cis-acotinique et la tyglylglycine sont affectés. Un exemple avec les acides malique et fumarique est illustré dans la figure IV.2. Du fait de la polarité de la colonne de deuxième dimension, le coefficient d'activité des composés influence davantage leur rétention globale et donc leur temps d'élution.

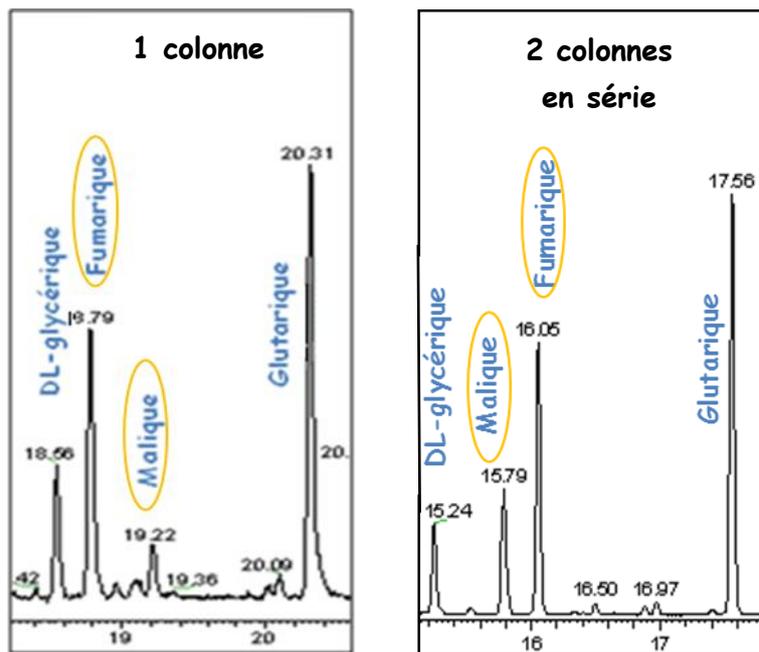


Figure VI.2. Variation de l'ordre d'élution de l'acide fumarique/acide malique, suite au transfert des méthodes.

- * La non-détection de certains composés minoritaires, comme par exemple l'acide oxalique (Figure IV.3)

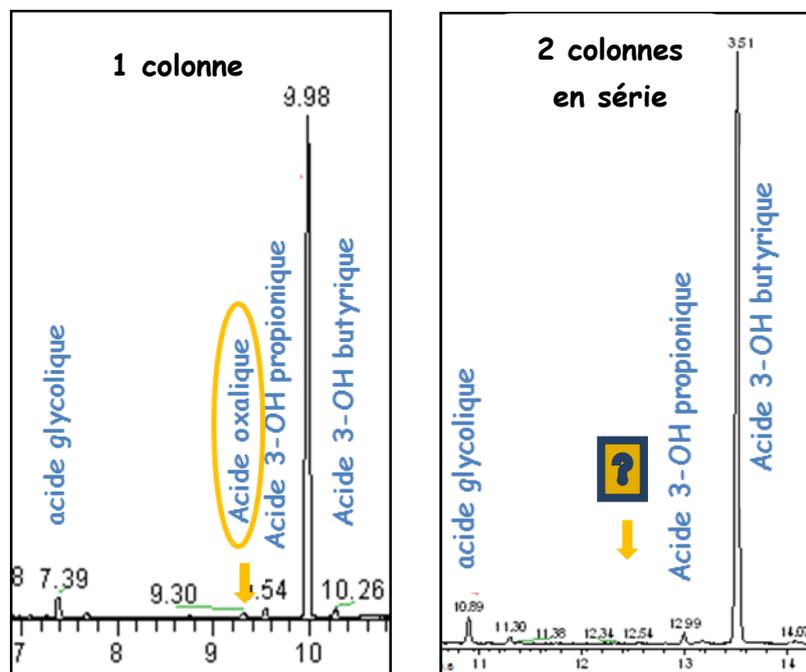


Figure IV.3. Extraits de chromatogrammes : a) acide oxalique détecté avec 1 colonne b) acide oxalique non détecté en couplage de colonnes.

La disparition des composés peut être expliquée par deux effets:

1/Le métabolite est retenu dans la phase stationnaire au point qu'il est co-élué avec un ou plusieurs autre(s) composé(s).

2/La molécule élué lentement dans la seconde colonne de façon à subir un élargissement de pic tel que ce pic est noyé dans le bruit de fond.

Au vu de des résultats obtenus, il semble nécessaire de poursuivre le développement afin de trouver de meilleures conditions de détection des acides organiques dans les échantillons urinaires.

IV.1.2. Développement de la méthode GCxGC

Pour le développement de la méthode GCxGC sur des échantillons urinaires provenant d'enfants sains, plusieurs paramètres sont pris en compte: le temps de modulation, la programmation de température et la combinaison des colonnes. La fréquence d'acquisition n'a volontairement pas été optimisée dans un premier temps.

IV.1.2.1. Modulation

La modulation est un élément technique très important en chromatographie bidimensionnelle puisqu'elle est au cœur de la redistribution des créneaux d'effluent d'une colonne à l'autre. Le modulateur cryogénique à double jet de l'appareillage utilisé, n'est alimenté que par du dioxyde de carbone liquide; la température délivrée au moment du jet est donc fixée à environ -50°C . Mis à part la mise en place des jets de telle sorte que l'on ait une bonne immobilisation de l'échantillon en tête de seconde colonne, nous devons optimiser la modulation. Le paramètre de période de modulation (P_M), qui est le temps nécessaire pour faire un cycle complet de modulation (focalisation, échantillonnage et re-direction de l'effluent vers la deuxième colonne) peut être modifié avec des valeurs allant de 4 à 9 secondes.

Ainsi, l'influence de la période de modulation sur la qualité du processus de séparation chromatographique bi-dimensionnelle a été étudiée. Un extrait des

chromatogrammes obtenus avec des périodes de modulations de 4, 6, 7, 8 et 9 secondes est donné en figure IV.4.

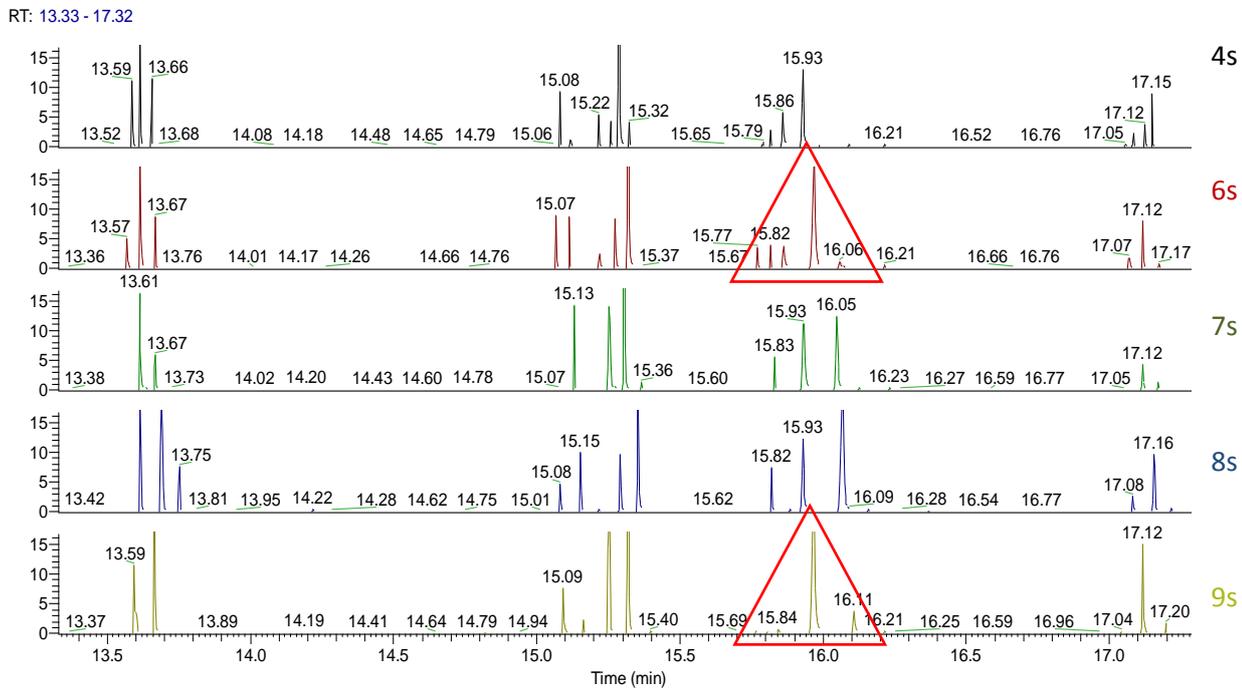


Figure IV.4. Extraits (de $t=13\text{min}$ à $t=18\text{min}$) des chromatogrammes bruts d'une matrice urinaire obtenus avec des périodes de modulation de 4, 6, 7, 8 et 9 secondes.

Les résultats obtenus montrent une diminution du nombre de pics à mesure que P_M augmente. En effet, lorsque P_M augmente, le nombre de fractions échantillonnées à l'issue de la première colonne est diminué. Ainsi, la séparation des composés issus de la première colonne est compromise et une partie de l'information est perdue, comme le montre le chromatogramme effectué à $P_M=9\text{s}$ (figure IV.4, triangle). Cette diminution du nombre de pics modulés ne nous permet pas parfois d'apprécier la séparation en deuxième dimension de composés initialement co-élus.

Comme le souligne Mostafa *et al.* [Mostafa *et al* 2012], il faut une P_M suffisamment courte pour préserver la séparation obtenue dans la première dimension, tout en faisant attention à ce que la rétention d'un composé dans la 2^{ème} dimension ne soit pas plus élevée que la P_M , et ne cause l'élution du composé pendant des cycles de modulations successives. Les résultats obtenus avec la modulation 4s et 6 s sont presque

semblables et permettent de bien séparer les composés. Toutefois, avec une P_M de 6s, chaque pic élué dans la première dimension est échantillonné en trois pics modulés en moyenne, ce qui nous assure une modulation optimale [Murphy et al, 1988]. Une période de modulation de 6 secondes sera donc retenue pour la suite de notre étude.

IV.1.2.2. Programmation de température

Dans la méthode GC-MS initiale, la programmation de température était de 80°C (5min) - 5°C/min - 280°C (10 min). Cette rampe est relativement faible et permet généralement d'atteindre une séparation satisfaisante des pics des acides organiques généralement recherchés en routine dans les échantillons urinaires. Mais, comme le montre la Figure IV.1, il y a un rassemblement de pics dans la seconde partie du chromatogramme, ce qui peut laisser penser à de probables co-élutions de métabolites. Une modification de la programmation en température est donc nécessaire.

Théoriquement, une diminution de la rampe de température d'une programmation engendre une augmentation des temps de rétentions et des largeurs de pics, ce qui peut induire une amélioration de la résolution chromatographique, comme le montre l'équation (eq. 1) ci-dessous.

$$R = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_1 + \omega_2)} \quad \text{eq. 2}$$

Ainsi, deux programmations de températures ont été testées :

- 1) Programmation 1) 80°C (5min) - 5°C/min - 155°C - 3°C/min - 280°C (10 min) qui a une pente faible ciblée que sur la seconde partie de l'analyse et constitue un compromis entre temps d'analyse pas trop long et meilleure efficacité ;
- 2) Programmation 2) 80°C (5min) - 3°C/min - 280°C (10 min) avec une pente unique faible qui implique un temps d'analyse plus long mais aussi une meilleure capacité de détection de pics.

Les résultats des analyses obtenues en conservant le jeu de colonnes (apolaire/polaire) DB-5/TRWAX-MS avec les deux programmations de température testées sont résumés dans le tableau IV.3. Ils montrent tout d'abord que certains métabolites qui n'étaient pas détectés antérieurement avec un simple ajout de colonne, le sont maintenant avec la programmation 1). Par ailleurs, plus de composés sont détectés et identifiés dans l'échantillon urinaire en utilisant la programmation 2) par rapport à la programmation 1). Comme espéré, avec ces conditions d'analyse, les métabolites masqués dans le bruit de fond ou précédemment co-élus bénéficient d'une focalisation grâce à la modulation et d'une meilleure séparation qui les rendent détectables.

En dépit du temps d'analyse un peu plus long, la programmation 2) avec une rampe de 3°C/min améliore la résolution et fait apparaître la totalité des composés recherchés. Ce choix de pente est en accord avec les préconisations de la littérature dans le cas de l'utilisation de modulateurs cryogéniques à double jet de CO₂ [Lu X, 2005]. Cette programmation sera donc retenue pour la suite.

Tableau VI.3. Elution des composés sur une combinaison de colonnes DB-5/TRWAX-MS en fonction de la programmation de température choisie. (x = composé détecté)

Composés	Programmation de T°C 1	Programmation de T°C 2	
	Tr (min) mod. 6s	Tr (min) Sans mod.	Tr (min) mod. 6s
Acide lactique	x	X	x
Acide α -hydroxybutyrique	x	X	x
Acide glycolique	x	X	x
Acide oxalique		X	x
Acide 3-hydroxypropionique	x	X	x
Acide 3-hydroxybutyrique	x	X	x
Acide 2-Méthyl-hydroxybutyrique			x
Acide 3-hydroxyisovalérique	x	X	x
Acide méthylmalonique	x	X	x
Acide 2-éthylhydracrylique	x		x
Acide 4-hydroxybutyrique	x	X	x
Urée	x	X	x
Acide octanoïque			x
Acide éthylmalonique	x	X	x
Acide succinique	x	X	x
Acide 2-méthylsuccinique	x		x
Acide DL-glycérique	x	X	x
Acide 2,3-dihydroxybutanoïque	x	X	x
Acide fumarique	x	X	x
Acide 5-hydroxyhexanoïque			x
Acide β -amino-isobutyrique	x		x
Acide 2-hydroxypropanoïque	x	X	x
Acide méthylmaleïque	x		x
Acide glutarique	x	X	x

Acide phenoxyacetique			x
Acide méthylmalonique	x	x	x
Acide 3-méthylglutarique	x	x	x
Acide éthylmalonique	x	x	x
Acide 3,4-dihydroxybutanoïque	x		x
Acide 3-méthylglutaconique	x	x	x
5-iodo-2-hydroxy-acetophenone			x
Acide malique	x		x
Acide adipique	x	x	x
Acide 4-phénylglutarique (EI 1)	x	x	x
Acide pyroglutamique			x
Acide heptanedioïque	x	x	x
Tiglylglycine	x	x	x
Acide 2-hydroxyglutarique	x	x	x
Acide alpha-cétoglutarique	x	x	x
Hexanoylglycine	x	x	x
Acide 4-hydroxyphénylacétique	x	x	x
Acide dodécanoïque			x
Acide N-acétylaspartique	x	x	x
Acide anthranilique			x
Acide cétosuccinique			x
Acide subérique	x	x	x
Acide cis-acotinique	x	x	x
Acide vanillique			x
Acide citrique	x		x
Acide 3,5-dihydroxybenzoïque			x
Acide hippurique	x	x	x
Myo-inositol	x		x
Acide sébacique			x

Acide 4-hydroxyphényllactique			x
Acide pentadécanoïque			x
Acide palmitique	x	x	x
Acide heptadécanoïque (EI2)	x	x	x
Acide linoléique			x
Acide 11-cis-octadécenoïque			x
acide oléique			x
Acide 4-hydroxyhippurique			x
Acide stéarique	x	x	x

Dans l'objectif de vérifier qu'il n'y a pas d'autres composés d'intérêt élués avant l'acide lactique lors de l'analyse GCxGC-MS d'échantillons urinaires, des essais ont été menés avec des températures initiales de programmation de 60°C et 70°C. L'étude des chromatogrammes nous a montré que seuls les composés provenant des réactifs de silylation ont été détectés. Une diminution de température initiale n'est donc pas nécessaire puisqu'elle n'apporte aucune information supplémentaire à cette étude.

IV.1.2.3. Combinaison de colonnes

Le choix de la combinaison des colonnes chromatographiques à utiliser pour une analyse en GCxGC est capital puisqu'il conditionne l'obtention d'une bonne séparation. Tout d'abord, la seconde colonne est généralement plus courte et plus étroite par rapport à la première. Cela implique que le débit de gaz sera plus lent dans la première colonne, en considérant la résistance exercée par la seconde colonne. Ainsi, un accroissement du temps de rétention des composés sera observé. Par ailleurs, la seconde colonne est généralement moins riche en phase stationnaire, de façon à générer des temps de rétention inférieurs à une période de modulation. Mais le plus important demeure la complémentarité chimique des phases stationnaires menant à une orthogonalité de leur sélectivité. De ce fait, l'objectif de cette étape est de chercher la combinaison de colonnes qui offrira la plus grande capacité de pic. Pour mieux apprécier

la séparation des composés dans l'espace analytique, les chromatogrammes seront présentés sous la forme de cartes avec des « color plot ». Dans ce cas, l'axe des abscisses représente le temps de rétention, donné en minutes, sur la première colonne et l'axe des ordonnées représente le temps de rétention, donné en secondes, sur la seconde colonne. La graduation de la couleur du bleu au rouge en passant par le vert reflète l'intensité des pics. Le bruit de fond correspondant à l'espace non occupé par des pics est coloré en bleu.

La configuration de colonnes la plus courante en GCxGC est telle qu'une colonne non polaire précède une colonne polaire (NP/P). Donc un premier couple de colonnes satisfaisant à cette configuration a été testé. Il s'agit du couple de phases stationnaires DB-5/TRWAX-MS (NP/P) combinant la sélectivité de la phase stationnaire la plus couramment employée dans l'analyse des acides organiques à sélectivité de la phase stationnaire polaire TRWAX-MS.

La séparation obtenue avec le couple DB-5/TRWAX-MS (30 m x 0,25mm x 0,25 μ m / 1 m x 0,1mm x 0,1 μ m) (Figure IV.5) montre que les composés n'occupent qu'un faible pourcentage de l'espace analytique 2D et qu'une grande majorité d'entre eux ont une rétention inférieure à 2 secondes sur la deuxième dimension. Cela signifie que la séparation est réduite au niveau de la deuxième dimension et donc que la colonne TRWAX-MS, qui met en jeu des interactions impliquant des dipôles permanents, n'améliore pas la séparation des métabolites urinaires.

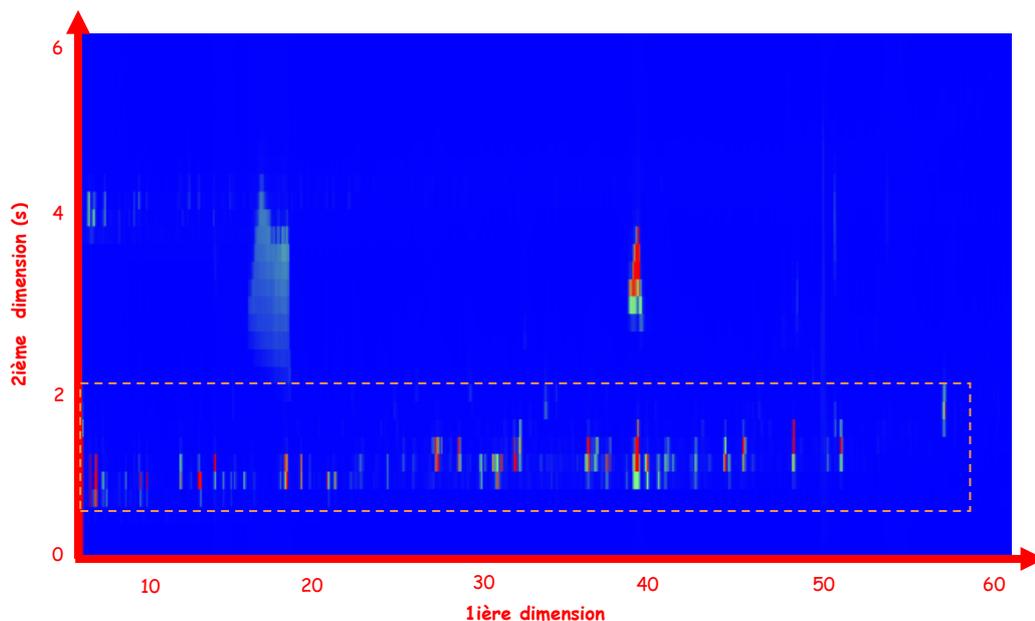


Figure IV.5. Chromatogramme en « color plot » d'un échantillon urinaire obtenu avec le jeu de colonnes DB-5/TRWAX-MS. (Fréquence d'acquisition 5Hz).

D'autre part, de récentes études réalisées en GCxGC-MS pour la détection des acides organiques [Wotjtowicz et al., 2010 Kouremenos et al, 2010] ont démontré que l'utilisation d'une colonne de polarité moyenne en deuxième dimension (BPX50, 50% phényl) permet d'obtenir des sélectivités complémentaires et une meilleure répartition des composés dans l'espace analytique. La combinaison de colonnes b) DB-5/BPX50 (NP/P) a donc été évaluée. Le chromatogramme obtenu (Figure IV.6) montre, effectivement, une meilleure dispersion des composés dans la deuxième dimension, due à l'interaction π - π des groupements siloxane phényl-méthyle. L'ajout de cette seconde colonne dans la deuxième dimension engendre un changement dans l'ordre d'éluion, comme par exemple l'acide malique, l'acide fumarique, l'acide 2-OH glutarique, l'acide cis-acotinique et tiglyglycine et une meilleure répartition des métabolites dans l'espace analytique. La séparation est donc beaucoup plus orthogonale avec une phase stationnaire de polarité moyenne.

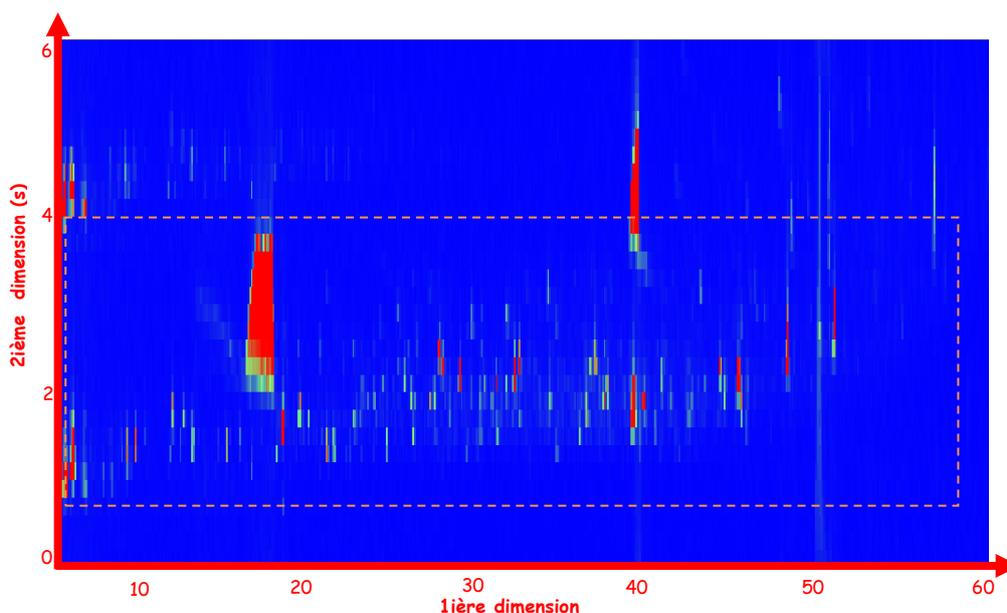


Figure IV.6. Chromatogramme en « color plot » d'un échantillon urinaire obtenu avec le jeu de colonnes DB-5/BPX50. (Fréquence d'acquisition 5Hz).

Certains auteurs ont expérimenté avec succès l'emploi d'une configuration de colonnes dite inverse avec une colonne moins polaire en deuxième dimension par rapport à la colonne de première dimension (P/AP) [Koek et al, 2008 ; Kouremenos et al, 2010]. Une combinaison de type colonne moyennement polaire BPX50 (30 m x 0,25mm x 0,25 μm) en première position et colonne apolaire TR5MS (1 m x 0,1mm x 0,1 μm) en deuxième dimension a donc été évaluée. Le chromatogramme obtenu en GCxGC-MS avec le jeu de colonnes BPX50/TR5-MS est très semblable à celui obtenu avec la combinaison b). Aucun composé n'est détecté en plus et la répartition des acides organiques dans l'espace analytique est similaire. Par contre, les pics présentent une plus grande dispersion comme l'illustre la figure IV.7. Suivant la configuration des phases stationnaires: BPX5/BPX50 (AP/P) (figure IV.7a) ou BPX50/TR5MS (P/AP) (figure IV.7b), les interactions avec les métabolites urinaires sont différentes. Avec la combinaison BPX50/TR5MS (P/AP), les interactions des métabolites sont plus fortes avec la phase stationnaire, les acides organiques éluent donc plus lentement, une inversion dans l'ordre d'élution de certains composés est observée ; comme c'est le cas de l'acide lactique et l'acide α -hydroxybutyrique.

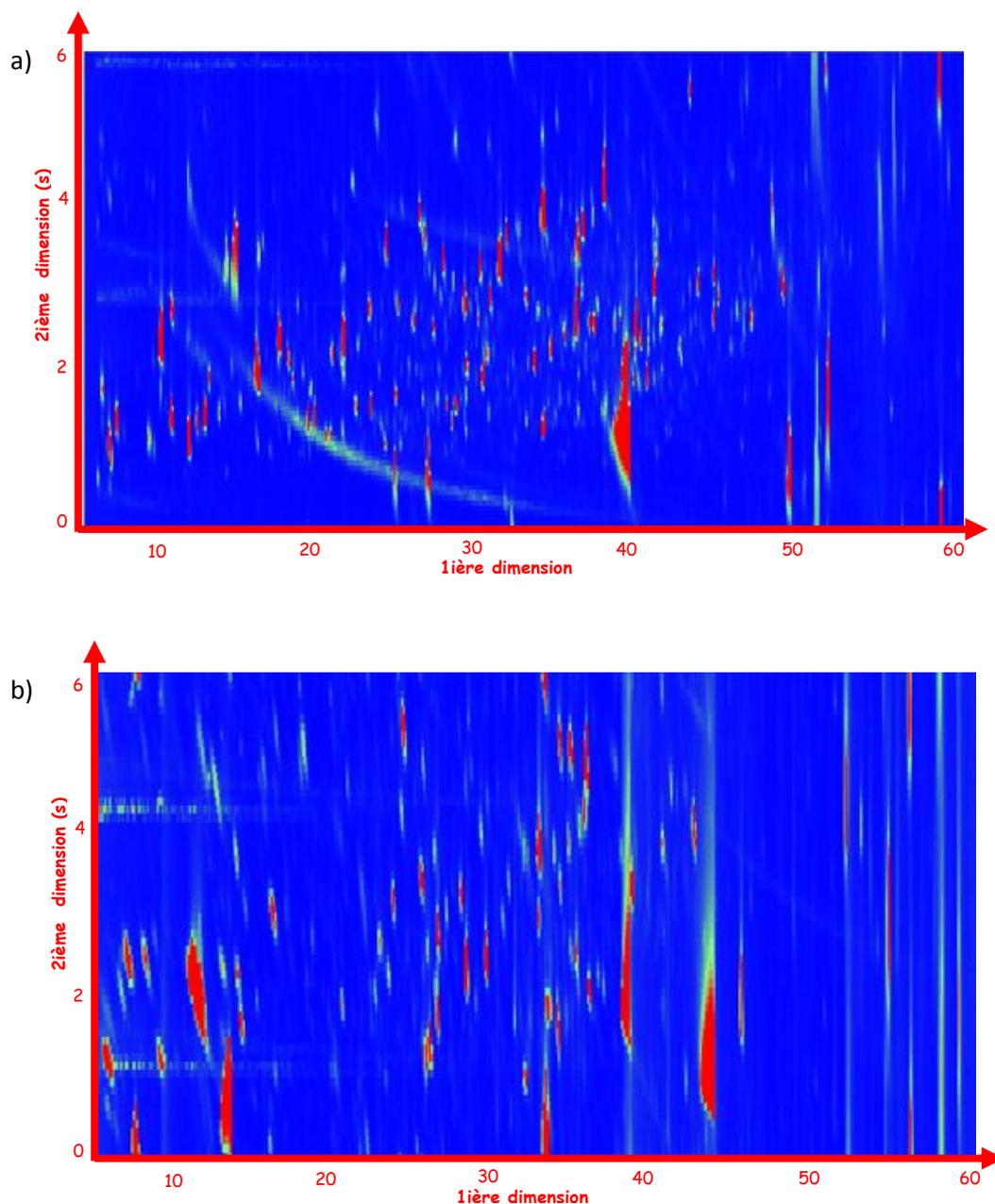


Figure IV.7. Chromatogrammes en « color plot » d'un échantillon urinaire obtenus avec les jeux de colonnes différents : DB5/BPX50 (IV.7a) et BPX50/TR5MS (IV.7b). (Après traitement d'urée et avec fréquence d'acquisition 10Hz)

Pour la suite de l'étude en GCxGC-MS, la combinaison de colonnes DB5/BPX50 est retenue parce qu'elle donne lieu à une très bonne orthogonalité des sélectivités.

IV.1.2.4. Procédure d'élimination de l'urée

Lors de l'étape précédente de choix de combinaison de colonnes pour l'analyse des acides organiques en GCxGC-MS, un grand signal d'environ 2 min d'élution s'étalant entre $t=13\text{min}$ et $t=15\text{min}$ sur le chromatogramme 2D est apparu. Il s'agit du signal correspondant à l'urée, métabolite majoritaire de l'urine. Ce composé s'extrait facilement avec l'ensemble des acides organiques et il se silyle par déplacement des d'hydrogènes mobiles au niveau de son groupement amine. D'une part, la grande quantité d'urée consomme une grande partie des agents de dérivation introduits et diminue la disponibilité de ces agents pour la silylation des autres composés présents en faible concentration. D'autre part, cet étalement augmente le risque de co-élution avec d'autres métabolites qui pourraient sortir dans la même zone d'élution et générer des problèmes de détection et d'identification. Ainsi, l'élimination de l'urée est recommandée [Almstetter et al, 2012].

L'élimination de l'urée d'échantillons urinaires pour mieux appréhender les analyses a déjà été abordée dans la littérature. En 1991, Shoemaker et Elliott [Shoemaker et al, 1991] ont rapporté une procédure utilisant une enzyme, l'uréase, pour dégrader des quantités excessives d'urée. Cependant la procédure proposée est chronophage (> 45 min.) et rigoureuse car l'introduction de l'uréase (total= 250 unités/mL) se fait en deux étapes avec un contrôle continu de la pression de CO_2 dans l'environnement de réaction. La mise en place de ce protocole n'est donc pas aisée. Quelques années plus tard, Matsumoto et Kuhara [Matsumoto and Kuhara, 1996] ont proposé une méthode plus rapide et facile à mettre en œuvre, dans laquelle 60 unités (U) d'uréase sont introduites dans $500\mu\text{L}$ d'échantillon et exposées à 37°C pendant quelques minutes. Ce traitement d'échantillon a été repris par Kuhara, Nakagawa et Inoue [Kuhara et al, 1999; Inoue et Kuhara, 2004; Nakagawa et al, 2010] dans le cadre d'analyses en GC pour le diagnostic de maladies innées du métabolisme. La simplicité de ce protocole fait qu'il sera utilisé comme base pour la préparation des échantillons urinaires.

Théoriquement, lorsque l'uréase est introduite dans l'urine et rentre en contact avec l'urée, il se produit de l'anhydride carbonique et de l'ammoniac suivant la stœchiométrie ci-dessous.



Cet ammoniac produit doublement, peut éventuellement avoir un impact sur le chromatogramme acquis. Pour lever le doute, des solutions de matrices urinaires contenant des concentrations croissantes allant de 2,8 µg/mL et 28 µg/mL de NH₃ ont été injectées dans les conditions analytiques précédemment retenues. Les acquisitions ont été réalisées sur des gammes de masses couvrant les m/z allant de 10 (pic moléculaire, m/z=17) à 600 (valeur haute utilisée pour l'analyse classique des AO) m/z. Aucun signal interférent provenant de l'ammoniac n'a été décelé sur les chromatogrammes.

Des ajustements au protocole proposé par Matsumoto et Kuhara ont alors été entrepris. D'abord, dans le but de favoriser la réaction enzymatique, les échantillons urinaires ont été tamponnés à un pH physiologique, c'est à dire aux alentours de pH=7,4. Des essais préliminaires effectués avec le tampon phosphate (KH₂PO₄, 2M), d'une part et le tampon de bicarbonate (KHCO₃, 2M) d'autre part, nous ont orientés vers le second choix. En effet, le tampon KH₂PO₄ accroît la concentration de phosphate dans l'urine et crée des interférences dans le milieu biologique, ce qui n'est pas le cas avec le tampon bicarbonate.

Ensuite, plusieurs quantités d'uréase de *Canavalia ensiformis*, type IX (59400 Unités/g) ont été évaluées: 25, 50, 80, 100, 150 et 250 unités. Chaque volume a été introduit directement dans 1 mL d'urine provenant d'un enfant sain. La réaction enzymatique s'est déroulée à 25 °C et pour chaque concentration, des prélèvements ont été effectués à 15, 30 et 60 min de réaction. Les différents échantillons prélevés ont subi la suite du protocole habituel d'extraction et d'analyse des AO. Les résultats obtenus ont montré la corrélation entre l'efficacité d'élimination de l'urée et le nombre d'unités d'uréase et le temps de réaction testés. L'élimination complète de l'urée a pu

être obtenue soit avec des concentrations faibles comme 60U/mL pendant un temps de réaction de l'ordre de 60min, soit avec des concentrations plus élevées (100U) dans un délai d'environ 15min, comme le montre la Figure IV.8.

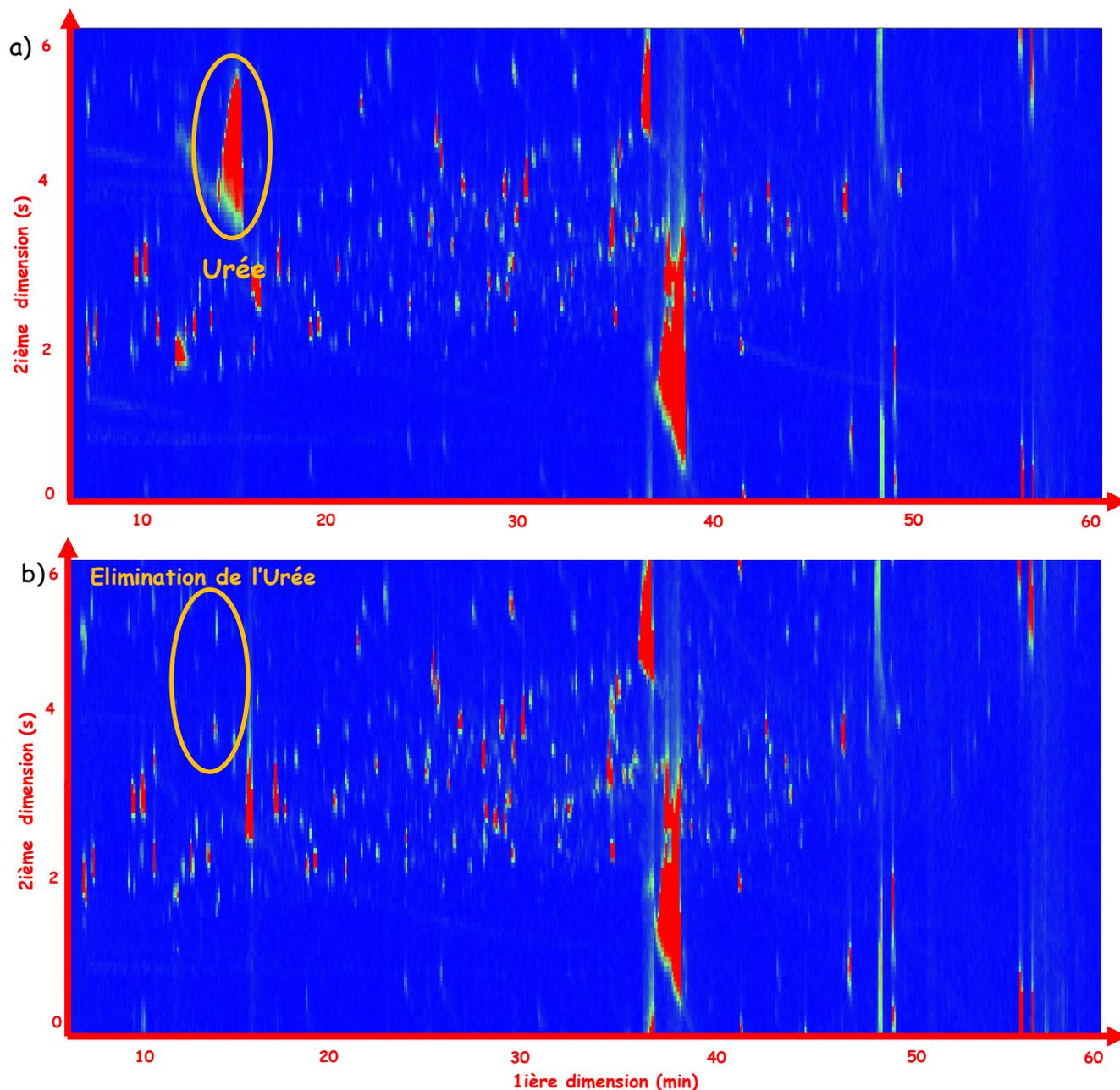


Figure IV.8. Chromatogrammes en « color plot » obtenus d'un même échantillon urinaire analysé avec les colonnes DB5/BPX50, avant (a) et après (b) introduction du protocole d'élimination de l'urée par réaction avec 100U d'uréase pendant 15 minutes.

Tableau VI.4. Concentration en urée d'échantillons urinaires correspondant à des enfants sains (S) et à des patients possédant des troubles neurologiques (P).

Enfant	Sexe	Age	Urée $\mu\text{mol/mL}$
S1	F	9	168,6
S2	M	6	189,7
S3	M	8	437,3
S4	M	8	504,5
S5	F	3	516,6
S6	M	12	582,8
P1	M	10	266,8
P2	M	7	447,8
P3	F	9	456,7
P4	M	12	501,3

Afin d'évaluer le protocole de prétraitement d'échantillon par élimination de l'urée sur des urines plus ou moins riches en urée, 10 urines provenant d'enfants dits sains et d'enfants ayant des troubles neurologiques ont été étudiées (tableau IV.4). Ces échantillons ont été traités comme suit: un volume correspondant à 100U d'uréase a été introduit dans 1 mL d'urine et mélangé à 100 μL de tampon bicarbonate, 2M, pH=8. La solution a été chauffée à 25°C sur une plaque chauffante pendant 15 min et en agitation continue. Les résultats obtenus ont montré que l'élimination de l'urée dans ces conditions n'était pas complète pour des échantillons dont la concentration en urée dépasse 550 $\mu\text{mol/mL}$.

Pour déterminer les limites de la réaction urée-uréase, la cinétique d'élimination de l'urée dans des échantillons riches en urée (582,8 $\mu\text{mol/mL}$ = valeur maximale rencontrée) a été étudiée. Cette cinétique, présentée en figure IV.9, montre que

l'élimination complète des 582,8 μmol d'urée de l'échantillon, avec 100U d'uréase de *Canavalia ensiformis*, type IX à pH=8 et 25°C, ne peut s'obtenir qu'au bout de 40 minutes de réaction. Compte-tenu de la rareté d'une telle concentration d'urée dans des échantillons urinaires d'enfants et du souhait de ne pas trop alourdir le protocole de préparation des échantillons, un temps de réaction enzymatique de 15 minutes sera conservé.

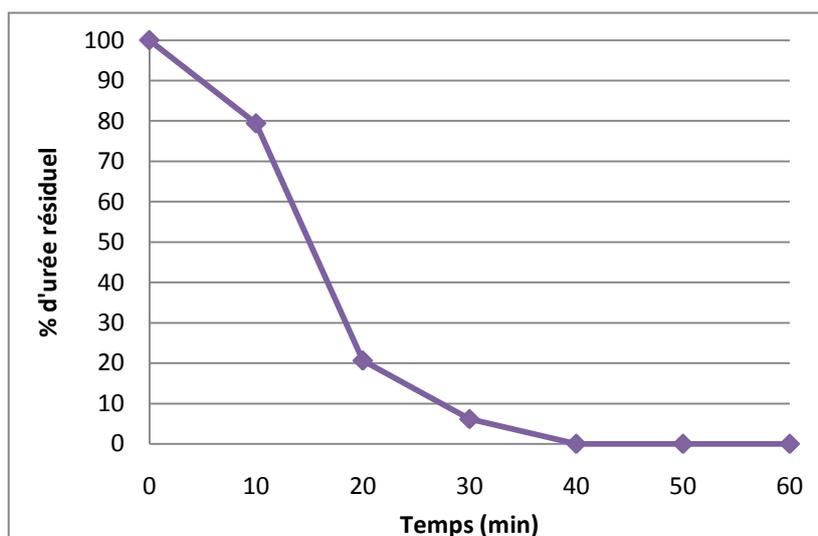


Figure IV.9. Cinétique d'élimination de l'urée dans l'échantillon urinaire contenant 582,8 $\mu\text{mol/mL}$ d'urée avec 100U d'uréase de *Canavalia ensiformis*, type IX à pH=8 et 25°C.

Grâce à la suppression pré-analytique de l'urée et donc au dégagement de la zone du chromatogramme, un composé, précédemment masqué par l'urée, a été détecté. Le métabolite identifié est l'acide 2-éthoxyéthoxy-acétique. D'après Kamerling [Kamerling *et al*, 1997], la formation endogène de celui-ci est liée à un précurseur exogène : le 2-(2-éthoxyéthoxy) éthanol. Le 2-(2-éthoxyéthoxy) éthanol ou Carbitol est employé dans des industries diverses (laques, peintures, résines, colorants, savons, produits cosmétiques entre autres) [Meininger, 1948] et peut être absorbé par la peau.

IV.1.3. Détection par spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse simple quadripolaire est un détecteur qui a une vitesse d'acquisition limitée comparé au spectromètre de masse à temps de vol (TOF-MS). La fréquence d'acquisition du quadripôle est mesurée en unité de masse atomique par seconde (amu/s). La précision pour obtenir les données qualitatives et quantitatives dépend de la reconstruction des pics (nombre de points par pic). La fréquence d'acquisition, le nombre de points qui détermine chaque pic et la gamme de masses par scan sont liés. Pour avoir des résultats fiables, il est nécessaire d'avoir une grande quantité de points par pic et des gammes de masses suffisamment étendues pour permettre l'identification des métabolites [Adahchour et al, 2006]. Des compromis sont donc à prévoir. Sachant que l'échantillon urinaire est un mélange complexe et que les métabolites ont des structures et masses moléculaires (MM) divers, il est nécessaire, dans un premier temps, d'utiliser une large gamme de masses allant de 70 à 600 m/z surtout que les métabolites peuvent être silylés jusqu'à 4 groupements TMS.

Les premières analyses effectuées ont donc été réalisées avec une gamme de balayage de 70 à 600 m/z, une vitesse de balayage de 2984 amu/s et une fréquence d'acquisition de 5 scans/s (équivalent à 5 Hz). Puis, pour atteindre des fréquences d'acquisition plus importantes permettant d'améliorer la résolution sur les représentations 2D des chromatogrammes, des gammes de masses plus courtes ont été utilisées. Des analyses ont été acquises sur une gamme de 200 unités de masse (de 230 à 430 m/z) à une fréquence d'acquisition de 16Hz. Par contre, l'identification des composés devient fastidieuse car les spectres de masses partiels obtenus ne fournissent pas toujours suffisamment d'informations permettant d'identifier facilement les molécules, même avec l'aide des bases de données. De plus, avec ce choix de gamme de masses réduite, certains composés n'ont pas été détectés. Il sera donc réservé aux cas d'études plus ciblées dans lesquelles les métabolites cibles ont des poids moléculaires assez proches.

Finalement, un compromis a été trouvé en conservant la gamme de masse de 530 unités initiale et une vitesse maximale d'acquisition de 11 000 amu/s. Une fréquence d'acquisition de 10Hz avec 8 points par pic a été obtenue en moyenne (Figure IV.10). Ces résultats permettent une identification correcte des composés.

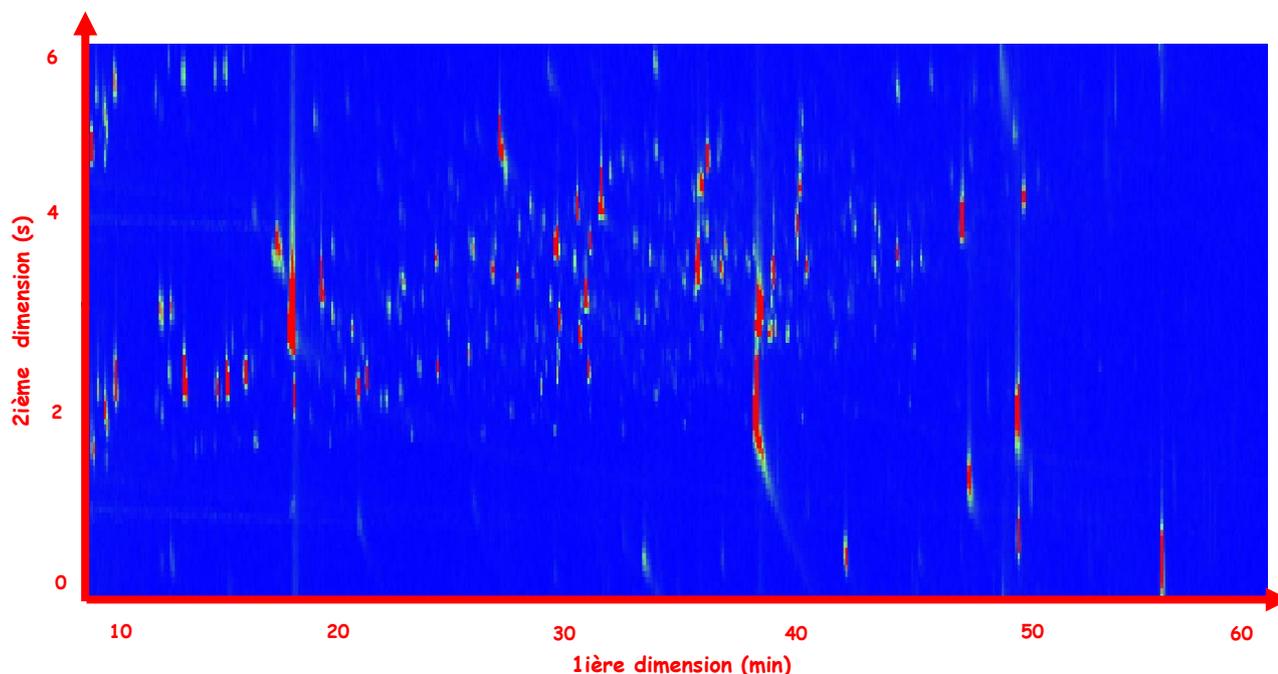


Figure IV.10. Chromatogramme en « color plot » obtenu avec une vitesse d'acquisition équivalente à 10Hz.

IV.1.4. Stabilité de l'échantillon

Les conditions de prélèvement et de stockage ont un rôle important dans la conservation de l'échantillon et son éventuelle modification métabolique qui peut être causée par la dégradation des métabolites, la contamination bactérienne et d'autres facteurs externes. Dans le cadre de cette étude, les recommandations de la littérature [Dunn *et al*, 2011; Fernandez-Peralbo *et al*, 2012] ont été prises en compte. Les échantillons prélevés sont aliquotés et mis au congélateur à -20°C pour maintenir leur stabilité et minimiser leur dégradation potentielle. Les cycles de congélation-décongélation peuvent être effectués jusqu'à 9 fois, mais il est recommandé de les éviter afin de maintenir l'intégrité de l'échantillon [Fernandez-Peralbo *et al*, 2012].

Afin de déterminer la stabilité des composés silylés et connaître le temps de conservation sans qu'il y ait de modification dans l'échantillon, un échantillon d'urine d'un enfant sain a été utilisé. L'échantillon silylé a été conservé à 4°C et des prélèvements ont été effectués tous les 2 jours pendant une semaine et ensuite une fois par semaine pendant 5 semaines. Ces prélèvements ont été analysés en GCxGC-MS dans les conditions analytiques retenues précédemment. Les résultats obtenus ont montré une constance du profil chromatographique pendant la première semaine, par contre à partir de la deuxième semaine, des petites variations ont été observées avec le temps. La figure IV.11 présente l'évolution des chromatogrammes bruts obtenus en GCxGC-MS (extraits de 4 minutes) pendant les 5 semaines d'étude. Comme le montre la figure IV.11, la dégradation de certains composés se traduit par la diminution de l'aire des pics jusqu'à leur disparition complète. D'autres pics apparaissent dus à la formation de produits de la dégradation. On en conclut que l'échantillon silylé n'est stable et ne peut être utilisé que pendant une semaine.

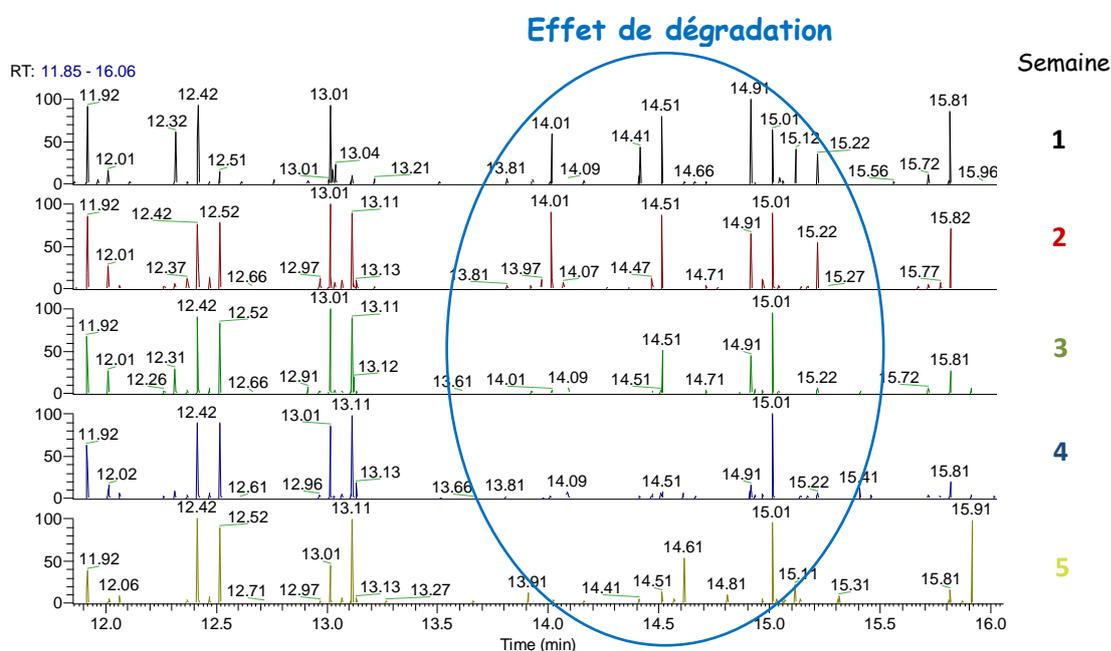


Figure IV.11. Extraits de chromatogrammes bruts en GCxGC-MS d'un échantillon silylé se dégradant pendant 5 semaines.

IV.2. COMPARAISON QUALITATIVE DE LA METHODE GCxGC-MS A UNE METHODE GC-MS CLASSIQUE

IV.2.1. Comparaison des profils urinaires: GC-MS Vs GCxGC-MS

Des échantillons urinaires provenant d'enfants ayant un profil sain ont été utilisés pour cette étude de comparaison de la méthode GCxGC à la méthode standard de GC-MS.

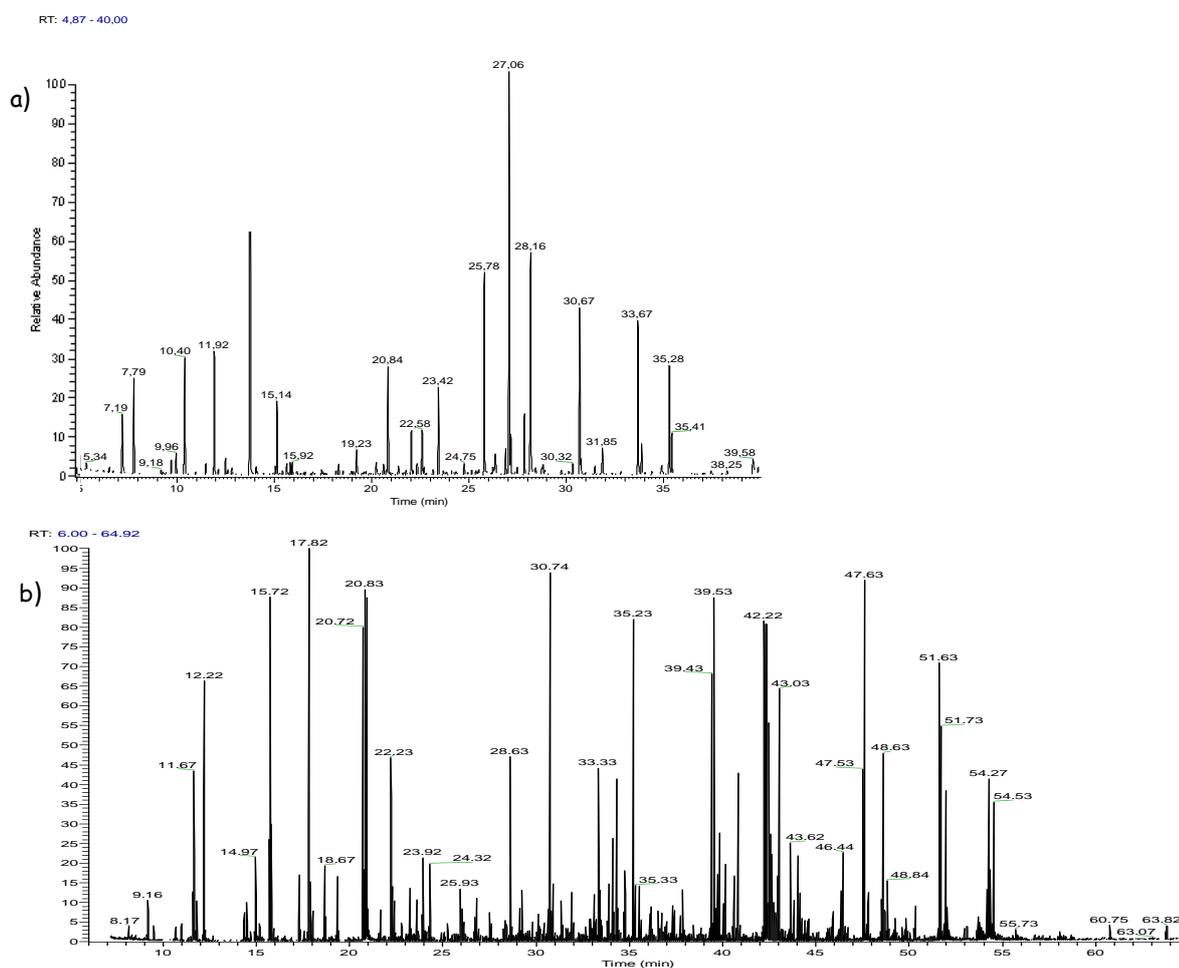


Figure IV.12. Comparaison des chromatogrammes bruts obtenus avec un même échantillon urinaire en: a) GC-MS et b) GCxGC-MS

La figure VI.12 montre les chromatogrammes bruts d'une même urine obtenus en GC-MS (Figure IV.12a) et en GCxGC-MS (Figure IV.12b), respectivement. Certes, l'analyse en GCxGC-MS est plus longue d'environ 20 minutes que celle employant la

méthode GC-MS initiale mais elle présente un plus grand nombre de pics qui laisse supposer plus de composés détectés.

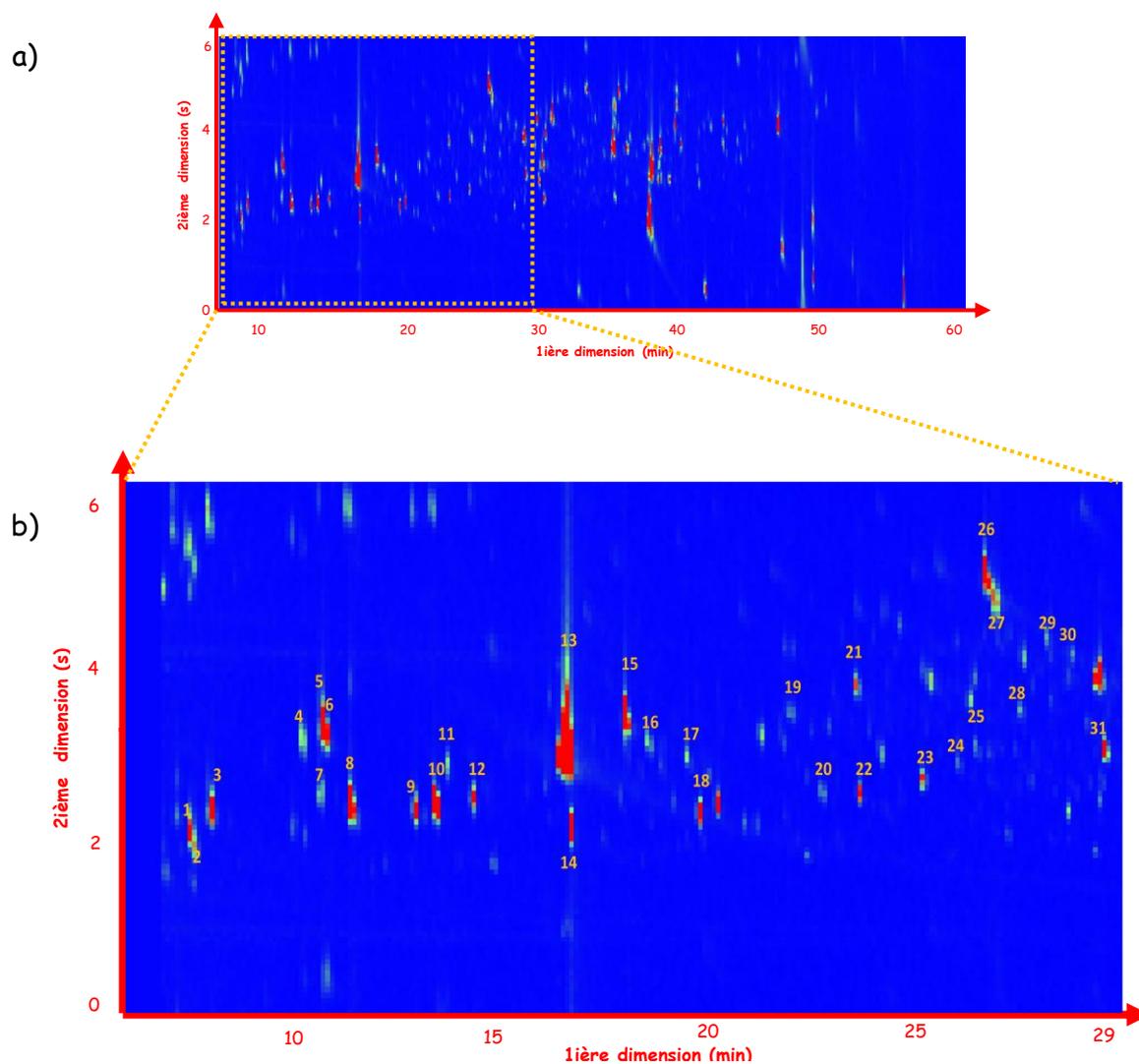


Figure IV.13. Extrait du chromatogramme en « color plot » d'un échantillon urinaire provenant d'un enfant sain.

1. Ac. lactique / 2. Ac. alphahydroxyisobutyric / 3. Ac. glycolique / 4. Ac. oxalique / 5. 2-methylphenol / 6. 3-methyl phenol / 7. beta-lactate / 8. Ac. 3-OH isobutyrique / 9. ac. 2-méthyl-3-OH butyrique / 10. Ac 3-OH isovalerique / 11. Ac. méthylmalonique / 12. Ac. 2-éthyl-3-OH propionique / 13. Phosphate / 14. Glycerol / 15. Ac. Succinique / 16. Ac. éthylmalonique / 17. Ac maleique / 18. Ac. 2,3-dihydroxybutanoïque / 19. ac. Glutarique / 20. Ac. 2,4-diOH butanoïque / 21. Ac. 3-méthylglutaconique / 22. Ac. 3,4-dihydroxybutanoïque / 23. Ac. 3,5-dihydroxy-3-méthylvalérique / 24. ac. malique / 25. Ac. adipique / 26. Ac. 4-phénylbutyrique / 27. L-proline / 28. Ac. 3-méthyladipique / 29. Ac. 2-furanocarboxylique / 30. Ac 4-OH benzeneacétique / 31. Ac. hydroxyglutarique.

L'observation du chromatogramme sous sa représentation graphique en 2D (Figure IV.13a) met en évidence le pouvoir séparatif de la GCxGC-MS vis-à-vis de ces composés. Dans l'extrait du chromatogramme en « color plot » (IV.13b) on met en évidence la séparation d'au moins 31 métabolites urinaires. L'ajout d'une seconde colonne de sélectivité différente par rapport à la première permet la séparation des analytes suivant des mécanismes complémentaires et génère une répartition homogène des métabolites dans l'espace analytique.

L'utilisation de la modulation cryogénique et des colonnes de polarités différentes permet d'améliorer l'efficacité de la séparation, ce qui évite la co-élution de composés observés dans une seule dimension. C'est le cas de l'acide lactique et l'acide α -hydroxyisobutyrique qui sont co-élus en GC monodimensionnelle et séparés grâce à la GCxGC (Figure IV.14). De plus, la sensibilité de la GCxGC, due à la focalisation cryogénique, permet la détection de métabolites supplémentaires présents à l'état de traces dans l'échantillon analysé. Cette détection des composés en faible quantité peut s'avérer utile car une légère augmentation d'un métabolite peut se traduire en un déficit spécifique.

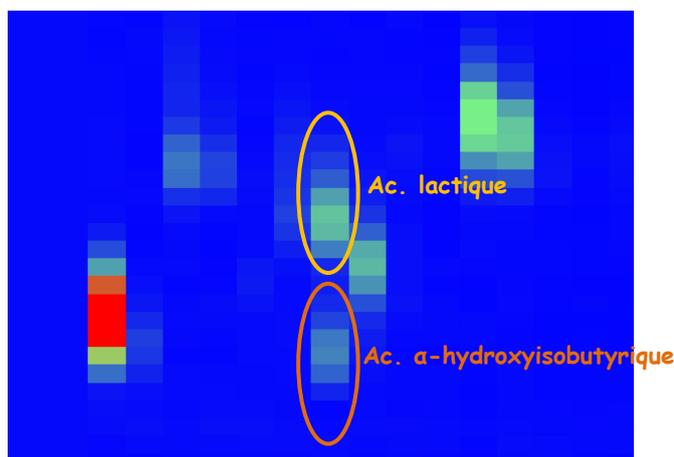


Figure IV.14. Zoom du chromatogramme en « color plot » ($t_r=7-8\text{min}$) montrant la séparation de deux composés : l'acide lactique et l'acide α -hydroxyisobutyrique.

Pour mieux apprécier l'apport de la méthode GCxGC-MS proposée sur la détection des métabolites urinaires, 17 échantillons urinaires correspondant à des

enfants sains d'âges différents ont été analysés d'une part avec la méthode standard en GC-MS et la méthode développée en GCxGC-MS. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.5. Ces résultats montrent une détection de 24 à 92 composés supplémentaires avec la méthode GCxGC-MS suivant l'échantillon. Bien que, l'inter-variabilité des métabolites dans l'urine peut être liée à des différences entre les régimes alimentaires chez chaque enfant, un maximum de 92 composés supplémentaires a été trouvé par rapport à la GC-MS. Ces résultats confirment l'apport de la GCxGC-MS quant à la séparation de composés ayant des structures plus ou moins semblables et souligne le potentiel de la GCxGC-MS dans le diagnostic des troubles métaboliques. De plus, la GCxGC-MS est plus sensible que la GC-MS pour la détection des métabolites éliminés en petites quantités dans l'urine.

Tableau IV.5. Nombre de composés détectés dans les urines d'enfants sains avec les méthodes GC-MS et GCxGC-MS.

Urine	Sexe	Age (ans)	GC-MS	GCxGC-MS	Nombre de composés supplémentaires
1	F	3,5	88	151	63
2	M	8	61	153	92
3	M	8	79	158	79
4	M	7	87	147	60
5	M	8	88	164	76
6	M	6	69	132	63
7	F	12	86	143	57
8	M	11	86	139	53
9	M	9	87	160	73
10	M	8	88	119	31
11	F	4	76	123	47
12	M	7	104	128	24
13	M	10	93	145	52
14	M	9	78	121	43
15	F	12	94	126	32
16	M	7	96	142	46
17	M	8	86	123	37

Dans le cas de composés isomères mal séparés, il peut y avoir de fausses identifications et l'utilisation de la déconvolution du chromatogramme ionique total (TIC) est nécessaire pour trouver les fragments caractéristiques de chaque composé co-élué. Cependant, cette approche prend évidemment beaucoup de temps. En utilisant la méthode proposée par GCxGC-MS, nous avons pu obtenir une résolution suffisante pour éviter la co-élution d'un grand nombre de composés, dont certains sont des isomères difficile à caractériser. Un exemple de la séparation de composés co-élués est présenté figure IV.15 ; il s'agit des acides lactique et α -hydroxyisobutyrique qui étaient co-élués en GC-MS et sont maintenant séparés en GCxGC-MS.

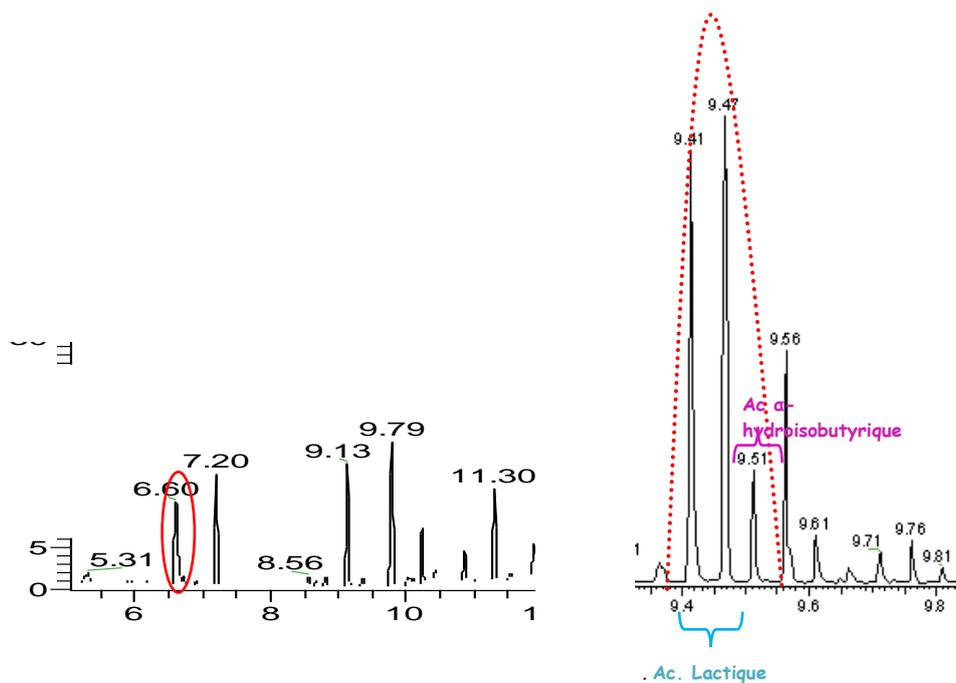


Figure IV.15. Extraits de chromatogrammes bruts des acides lactique et α -hydroxyisobutyrique a) co-élués dans un seul pic en GC-MS (tr=6,6min) et b) séparés et fractionnés à cause de la modulation.

IV.2.2. Les métabolites urinaires détectés

La variabilité au sein des régimes alimentaires fait que l'excrétion des métabolites par l'urine varie autant de façon qualitative que quantitative. Compte-tenu du pouvoir de détection de la GCxGC-MS, démontré précédemment, il est intéressant de

déterminer l'apport de cette technique quant à l'identification d'un maximum de métabolites habituellement présents chez l'enfant sain. Ainsi, un mélange d'échantillons urinaires provenant d'enfants sains, nourris sans aucune restriction alimentaire a été analysé d'une part avec la méthode classique de GC-MS et d'autre part avec la méthode GCxGC-MS développée.

Les résultats obtenus en GCxGC-MS montrent un total de 231 molécules silylées détectées, parmi lesquelles, 121 métabolites ont été identifiés, par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des bases de données, et répertoriés dans le tableau IV.6.

Ces résultats ont été confrontés à la base de données "Urine Metabolome Database" (<http://www.urinemetabolome.ca>) qui regroupe de nombreux composés détectés dans l'urine humaine [Bouatra, 2013].

Avec la méthode proposée, nous avons trouvé d'autres métabolites qui ne sont pas référencés dans l'UMDB. Ces molécules proviennent de différentes sources :

* Métabolisme endogène,

- **N-acétyl isoleucine** : produit transformé dans la voie métabolique des acides aminés qui suit une N-acétylation et est excrété en faible quantité dans l'urine des individus sains [Liebich et al, 1985]. Il est également considéré comme biomarqueur de la maladie du sirop d'érable [Lehnert et al, 1988] et la déficience aminoacylase I [Gerlo et al, 2006].
- **Acide vanillylpropionique** : excrété par l'urine [Tuchman et al, 1984; Lefevre et al, 1989], il est aussi détecté dans l'analyse du liquide amniotique [Kwokei, 1982].

* Alimentaire :

- **L'acide 5-hydroxyvalérique** : Métabolite détecté par exemple dans le miel d'acacia [Hegazi et al, 2009].

- **L'acide vanillylhydracrylique** : Produit intermédiaire de la voie de dégradation de l'acide férulique (un dérivé des aliments contenant des polyphénols [Rechner et al, 2002]).
- **L'acide isocitrique lactone** : Métabolite trouvé dans les plantes [Kringstad et al, 1975] comme par exemple à l'intérieur de l'herbe de seigle [Hope et al, 2005]. Ce composé peut traverser le corps sans changer sa structure [Grupe et al, 1981].
- **Acide 2-O-méthyle-L-ascorbique** est un des métabolites de la vitamine C [Gropper, 2013].

* Flore bactérienne intestinale

- **Succinylactate** : Produit par le métabolisme bactérien [Niwa, 1986].

Grâce à la sensibilité de la GCxGC-MS et à son pouvoir de résolution, nous avons pu identifier 69 métabolites supplémentaires (principalement des métabolites en faible concentration), comparé à la méthode classique. Le tableau IV.6 ci-dessous liste les 121 métabolites identifiés.

Tableau IV.6. Composés identifiés par GCxGC-MS dans un mélange contenant les urines provenant d'enfants sains, détectés (D) ou non (ND) en GC-MS.

N°	Métabolite	N° HMDB	GC-MS
1	Phénol	HMDB00228	D
2	Ac. lactique	HMDB00190	D
3	Ac. alpha-hydroxyisobutyrique	HMDB00729	ND
4	Ac. glycolique	HMDB00115	D
5	Ac. 4-hydroxypentenoïque		ND
6	Ac. lévulinique	HMDB00720	D
7	Ac. oxalique	HMDB02329	D
8	Ac. 2-hydroxy-2-méthylbutyrique	HMDB01987	D
9	Ac. 3-hydroxypropionique	HMDB00700	D
10	Pyruvatoxime	HMDB02455	ND
11	m-crésol	HMDB02048	ND
12	Ac. 3-hydroxyisobutyrique	HMDB00023	D
13	Ac. 2-méthyl-3-hydroxybutyrique	HMDB00354	D

14	Ac. 3-hydroxyisovaleric	HMDB00754	D
15	Ac. méthylmalonique	HMDB00202	D
16	Ac. 2-éthylhydracrylique	HMDB00396	D
17	Ac. 4-hydroxybutyrique (GHB)	HMDB00710	ND
18	Ac. acétoacétique	HMDB00060	ND
19	Ac. benzoïque	HMDB01870	D
20	Ac. gamma-Hydroxyvalérique		ND
21	Ac. caprilique	HMDB00482	ND
22	Ac. oxalique	HMDB02329	ND
23	Phosphate	HMDB02142	D
24	Glycerol	HMDB00131	ND
25	Ac. phénylacétique	HMDB00209	ND
26	Ac. 2-hydroxy-3-méthylvalérique (HMVA)	HMDB00317	ND
27	Ac. maléique	HMDB00176	ND
28	pyrocathécol	HMDB00957	D
29	Ac. succinique	HMDB00254	D
30	Ac. 2-méthylglycérique	HMDB02601	ND
31	Ac. méthylsuccinique	HMDB01844	D
32	Ac. 5-n-hydroxyvalérique		ND
33	Ac. glycérique	HMDB00139	ND
34	Ac. fumarique	HMDB00134	D
35	Ac. itaconique	HMDB02092	ND
36	Ac. N-acétylaspartique	HMDB00812	ND
37	Ac. 4-Deoxyerythronique	HMDB00498	D
38	Ac. 5-Hydroxycaproïque	HMDB00525	ND
39	erythrono-1,4-lactone	HMDB00349	ND
40	Isobutyrylglycine	HMDB00730	ND
41	Ac. citraconique	HMDB00634	ND
42	Ac. glutarique	HMDB00661	D
43	Ac. 2-méthylglutarique	HMDB00422	ND
44	Ac. phénoxyacétique	HMDB31609	ND
45	3-deoxytetronique	HMDB00360	D
46	Ac. méthylglutarique	HMDB00752	ND
47	Ac. 3-méthylglutaconique	HMDB00522	D
48	2-deoxytetronique	HMDB06118	D
49	N-acétylisoleucine		ND
50	N-2-méthylbutyrylglycine	HMDB00339	ND
51	Ac. 3-hydroxyadipique 3,6-lactone	HMDB29171	ND
52	Ac. citramalic	HMDB00426	D
53	Methylparabène	HMDB32572	ND
54	Ac. mandélique	HMDB00703	ND
55	isovaleroglycine	HMDB00678	ND
56	Ac. malique	HMDB00744	ND

57	Ac. adipique	HMDB00448	D
58	Ac. 4-hydroxycyclohexylcarboxylique	HMDB01988	ND
59	Ac. 3-hexenedioïque	HMDB00393	ND
60	Ac. pyroglutamique	HMDB00267	D
61	2,2' thio diacétique	HMDB42032	ND
62	D-threitol	HMDB04136	ND
63	Ac. 3-méthyl adipique	HMDB00555	D
64	Pyrogallol	HMDB13674	ND
65	Ac. tumiki's	HMDB02432	D
66	Ac. thréonique	HMDB00943	ND
67	Ac. ortho-hydroxyphénylacétique	HMDB00669	ND
68	tiglylglycine	HMDB00959	ND
69	Ac. 4-Hydroxycyclohexylacétique	HMDB00909	D
70	Ac. 2-hydroxyglutarique	HMDB00606	D
71	Ac. pimélique	HMDB00857	ND
72	Ac. m-hydroxyphénylacétique	HMDB00440	D
73	Ac. 3-hydroxy-3-méthyl-glutarique	HMDB00355	D
74	Ac. 2-cétoglutarique	HMDB00208	D
75	Ac. 4-hydroxybenzoïque	HMDB00500	D
76	Ac. p-hydroxyphénylacétique	HMDB00020	D
77	Succinylactate		ND
78	Ac. 2,5-furandicarboxylique	HMDB04812	D
79	Furoylglycine	HMDB00439	ND
80	Ac. 2-hydroxyadipique	HMDB00321	ND
81	Ac. 3-hydroxyadipique	HMDB00345	ND
82	Ac. Subérique	HMDB00837	ND
83	Ac. isocitrique lactone		D
84	Ac. phénylpyruvique	HMDB00205	ND
85	Ac. m-hydrocoumarique	HMDB00375	ND
86	Ac. quinolinique	HMDB00232	ND
87	Ac. tricarballylique	HMDB31193	ND
88	Ac. orotique	HMDB00226	ND
89	Ac. vanillique	HMDB00484	D
90	Ac. cis-acotinique	HMDB00072	D
91	Ac. homovanilique	HMDB00118	D
92	Ac. gentisique	HMDB00152	ND
93	Ac. p-hydroxymandélique	HMDB00822	ND
94	Ac. azélaïque	HMDB00784	D
95	Ac. hippurique	HMDB00714	D
96	Ac. protocatéchique	HMDB01856	ND
97	Ac. 3,5-dihydroxybenzoïque	HMDB13677	D
98	Ac. 3,4-dihydroxybenzeneacétique	HMDB01336	ND
99	Ac. citrique	HMDB00094	D

100	Ac. isocitrique	HMDB00193	D
101	Ac. 2-méthylcitrique	HMDB00379	ND
102	Ac. 3-Hydroxyanthranilique	HMDB01476	ND
103	Ac. sébacique	HMDB00792	D
104	Ac. vanillylpropionique		ND
105	Ac. 2-O-méthyl-L-ascorbique		ND
106	Ac. vanillylmandélique	HMDB00291	D
107	Ac. hydroxyphényllactique	HMDB00755	ND
108	Ac. hydrocaféique	HMDB00423	ND
109	Ac. 3-indoleacétique	HMDB00197	D
110	Ac. 2-indoleacétique		ND
111	Ac. pantothénique / Vitamine B5	HMDB00210	D
112	Ac. vanillylhydracrylique		ND
113	Ac. palmitique	HMDB00220	ND
114	Ac. 4-hydroxyphénylpyruvique	HMDB00707	ND
115	Ac. 2-hydroxysébacique	HMDB00424	ND
116	Ac. salicylurique	HMDB00840	ND
117	Ac. 3-hydroxysébacique	HMDB00350	ND
118	Ac. trans-férulique	HMDB00954	ND
119	Ac. 3-hydroxyhippurique	HMDB06116	D
120	Ac. 5-hydroxyindoleacétique	HMDB00763	D
121	Ac. 4-hydroxyhippurique	HMDB13678	D

La méthode développée en GCxGC-MS, nous a permis de détecter, non seulement des acides organiques simples, mais aussi d'autres métabolites comme des lipides, des vitamines, des composés aromatiques, des glucides, des aminoacides et des composés aliphatiques qui confirment la pertinence et l'amélioration du diagnostic des EIMs en GCxGC-MS. Par exemple, du D-threitol, un des métabolites faisant parti du groupe des polyols a été observé. Ce groupe est utilisé comme biomarqueur dans le diagnostic d'EIM [Wamelink et al, 2005]. Autre exemple, l'acide quinolinique (QUIN), métabolite neurotoxique, est impliqué dans certains troubles neuro-dégénératifs [Perkins et al, 1982].

Malgré les bases de données à disposition, toutes les molécules détectées n'ont pas été identifiées. Cela peut être dû au fait que les spectres regroupés dans les bases de données correspondent aux composés que sous une seule forme silylée. Cependant, durant la dérivation, le métabolite peut insérer autant de groupements TMS, qu'il possède d'hydrogènes mobiles et être sous forme mono, di, tri ou tetra-TMS. C'est le

cas par exemple, de l'acide n-acétylaspartique, marqueur de la maladie de Canavan [Al-Dirbashi *et al*, 2009]. Le spectre de masse de cet acide organique se trouve dans la base de données seulement sous la forme tri-TMS alors que cet acide peut également se présenter sous la forme di-TMS, comme le montre la figure IV.16 [Inoue *et Kuhara*, 2004].

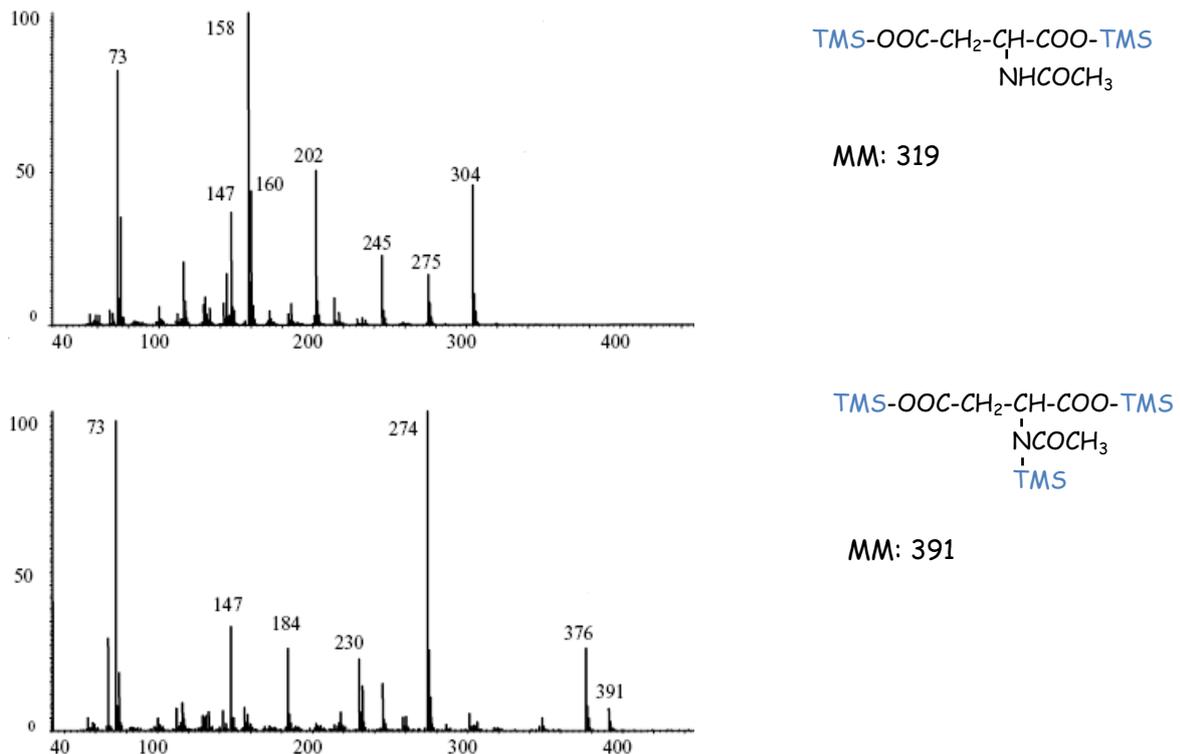


Figure IV.16 Spectres de masse de l'acide N-acétylaspartique di et tri-TMS.

L'identification des métabolites urinaires requiert beaucoup d'attention pour éviter de fausses interprétations. En effet, il peut y avoir des artefacts. Par exemple, l'acide lactique dimère, détecté dans un des échantillons, peut-être dû soit à l'excrétion de l'acide lactique en grande quantité dans le cas de l'acidurie lactique [Habbal *et al*, 2001], soit à un métabolisme bactérien [Ketting *et al*, 1985]. Dans le cas du présent échantillon provenant d'un enfant sain, la présence de l'acide lactique dimère est probablement liée au métabolisme bactérien.

IV.3. QUANTIFICATION

La quantification des métabolites à faible concentration avec la méthode monodimensionnelle GC-MS peut être compliquée du fait de co-élutions et/ou de distorsions de pics quand les métabolites en question sont co-élus avec composés abondants. La GCxGC-MS s'est avérée être un outil efficace pour la détection de métabolites dans les urines mais qu'en est-il d'un point de vue quantitatif ?

IV.3.1. Essais préliminaires

Tout d'abord, du fait de la modulation et de la rapidité de séparation sur la seconde colonne, les chromatogrammes en GCxGC présentent parfois des problèmes de répétabilité. Afin de contrôler la robustesse de l'appareillage, la répétabilité des temps de rétention des pics, en trois fractions, de quelques acides organiques a été évaluée. Cinq métabolites qui éluent parmi les premiers (acide lactique et acide glycolique) et les derniers composés (acide citrique, acide heptanoïque et acide stéarique) ont été sélectionnés. Les valeurs des coefficients de variation (nombre d'injections = 6) ont été calculés pour chaque métabolite. Ils sont inférieurs à 0,5%, ce qui démontre une bonne répétabilité.

Par ailleurs, le traitement de l'échantillon, et spécifiquement l'étape d'extraction des acides organiques de l'échantillon urinaire, est une phase très importante dans le cadre d'une étude quantitative. Le rendement d'extraction de quelques composés standards : acide méthylmalonique, acide 3-OH-3-méthylglutarique, acide phénylpiruvique, acide quinolinique et acide cis-acotinique a été étudié. Pour cela, des matrices urinaires ont été dopées avec des concentrations variables de ces 5 acides et l'aire des pics de leurs chromatogrammes a été comparée à celles obtenues après extraction avec la méthode classique utilisée à l'hôpital Armand Trousseau-Roche Guyon (cf. III.2.1.2).

Les résultats ont montré des rendements d'extraction compris entre 78% et 96% pour les acides malonique, 3-OH-3-méthylglutarique, phénylpiruvique et cis-

acotinique mais ils ne présentent qu'un rendement maximum de 20% d'extraction avec l'acétate d'éthyle (AcOEt) pour l'acide quinolinique (QUIN), métabolite neurotoxique à concentration élevé.

Ce taux d'extraction faible pour l'acide quinolinique n'autorise pas une quantification fiable du composé dans un mélange complexe. L'étape d'extraction des métabolites est donc remise en question.

IV.3.2. Développement de la méthode de préparation d'échantillon

L'extraction des métabolites par l'acétate d'éthyle n'étant pas satisfaisante, il est important de trouver un nouveau protocole de préparation des échantillons urinaires.

Wittmann *et al.* [Wittman *et al.*, 2008] ont étudié l'extraction des acides organiques urinaires avec le tétrahydrofurane (THF) et ont montré un taux d'extraction satisfaisant pour certains métabolites comme l'acide QUIN. En effet, le THF a un pouvoir d'extraction réduit sur les métabolites ayant une polarité faible par rapport à l'acétate d'éthyle (AcOEt), alors que pour les métabolites les plus polaires, le THF permet une meilleure extraction.

L'urine étant composée de métabolites de polarité variée, nous nous sommes intéressés à l'apport du THF dans le processus d'extraction.

Dans un premier temps, l'extraction au THF seul a été évaluée :

50 $\mu\text{mol/L}$ de chaque composé standard et 20 $\mu\text{mol/L}$ d'acide 4-phenylbutyrique (étalon interne) ont été mélangés à de l'urine traitée précédemment avec l'uréase. 36 μL de triéthylamine a été ajouté et chauffé à 60°C pendant 15 min. Après acidification avec 200 μl de HCl (2,4 M), 2ml de THF ont été ajoutés et la solution a été mélangée pendant 1 min au vortex. Ce procédé d'extraction avec le THF a été répété trois fois avant évaporation de la phase organique dans le Speedvac à 40°C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec. Ensuite, l'échantillon est silylé avec 50 μL de pyridine et 50 μL de BSTFA+TMS à 80°C pendant 45 min.

1 μL de cette solution silylée a été analysée et un rendement d'extraction de 95% a été obtenu pour QUIN. Par contre, pour les 4 autres acides, le rendement d'extraction est inférieur ou égal à celui obtenu précédemment avec l'acétate d'éthyle (figure IV.17).

Le profil de quantification des AO réalisé uniquement avec le THF n'est donc pas possible car les rendements d'extraction ne sont pas satisfaisants pour l'ensemble des métabolites. Une procédure d'extraction complète des acides organiques urinaires, en deux étapes, est alors envisagée.

Après divers ajustements concernant :

- Le choix du pH d'extraction : pH proche du point isoélectrique de l'acide quinolinique ($\text{pK}_a = 2,43$ et $4,78$) afin de favoriser son extraction,
- L'ordre des combinaisons d'extraction : THF puis AcOEt ou AcOEt puis THF,

Un protocole a été défini. Pendant la première étape, l'échantillon urinaire est extrait avec l'AcOEt (comme détaillé antérieurement). Puis, la phase aqueuse restante est alcalinisée à pH 9 et mélangée avec 36 μL de triéthylamine pendant 15 min à 60°C avant de subir la seconde procédure d'extraction par le THF.

L'extraction en deux étapes AcOEt-THF a permis d'atteindre un rendement compris entre 83% et 96% pour l'acide QUIN. Le rendement d'extraction des autres composés étudiés est conservé, voire amélioré dans certains cas (Figure IV.17).

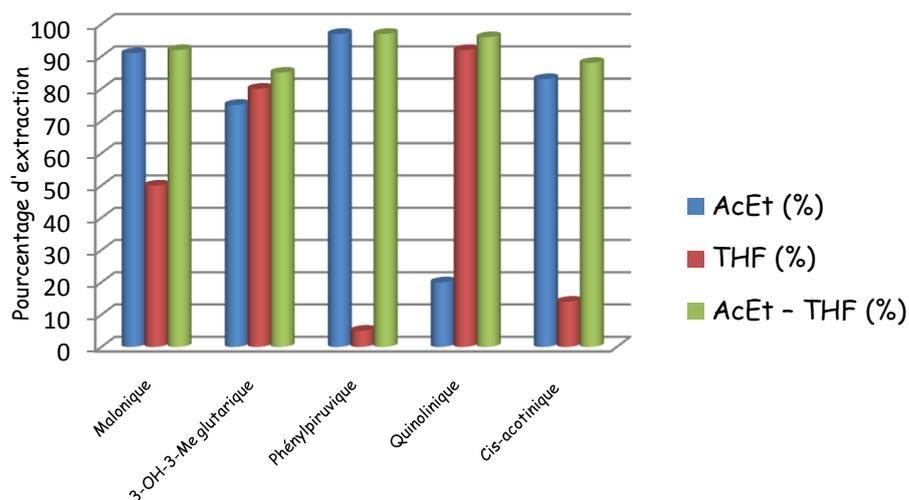


Figure IV.17. Rendements d'extraction de 5 métabolites urinaires d'intérêt suivant la méthode employée.

L'application de cette méthode d'extraction en deux étapes avec l'acétate d'éthyle puis le THF à d'autres échantillons urinaires d'enfants sains a permis de révéler des composés qui n'avaient pas ou pas complètement été extraits par l'AcOEt, comme c'est le cas de l'acide citrique qui est extrait plus efficacement, maintenant.

Cette étude démontre que la préparation de l'échantillon est une étape décisive pour la détection et la quantification précise des métabolites urinaires. Par ailleurs, cette procédure, permettant d'améliorer l'extraction des métabolites, rend l'échantillon extrait encore plus complexe qu'avec la procédure initiale. D'où l'importance d'utiliser une méthode d'analyse possédant un grand pouvoir séparatif comme la GCxGC pour le profilage urinaire.

IV.3.3. Validation de la méthode GCxGC-MS

La validation de la méthode de dosage des acides organiques urinaires par GCxGC-MS développée a été menée en employant l'urine d'un enfant sain avec une alimentation variée et sans aucune prise de médicaments. Cette urine a été dopée avec quatre acides organiques représentant les métabolites d'intérêt dans le diagnostic de maladies neuro-dégénératives. Il s'agit de:

- ❖ L'acide méthylmalonique : biomarqueur de l'acidurie méthylmalonique,
- ❖ L'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique : biomarqueur de l'acidurie 3-hydroxy-3-méthylglutarique,
- ❖ L'acide phénylpyruvique : biomarqueur de la phénylcétonurie et
- ❖ L'acide quinolinique, biomarqueur de la neuro-toxicité.

Les critères de linéarité, fidélité intermédiaire, limites de détection (LOD) et quantification (LOQ) ainsi que le rendement d'extraction ont été évalués.

IV.3.3.1. Linéarité

Il s'agit, pour un certain intervalle de concentration, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration à examiner dans l'échantillon.

La linéarité a été déterminée avec quatre concentrations croissantes: 7, 15, 25 et 50 $\mu\text{mol/L}$ de chaque acide. Les échantillons ont été préparés quotidiennement et analysés pendant 4 jours consécutifs.

La figure IV.18 montre les courbes réponses obtenues pour les quatre acides. Les résultats sont donnés en rapport d'aire du composé considéré sur l'aire de l'étalon interne (l'acide 4-phénylbutyrique). Une bonne régression linéaire a été obtenue avec des valeurs de coefficient de corrélation (R^2) compris entre 0,99 et 0,97 (figure IV.18 et tableau IV.7).

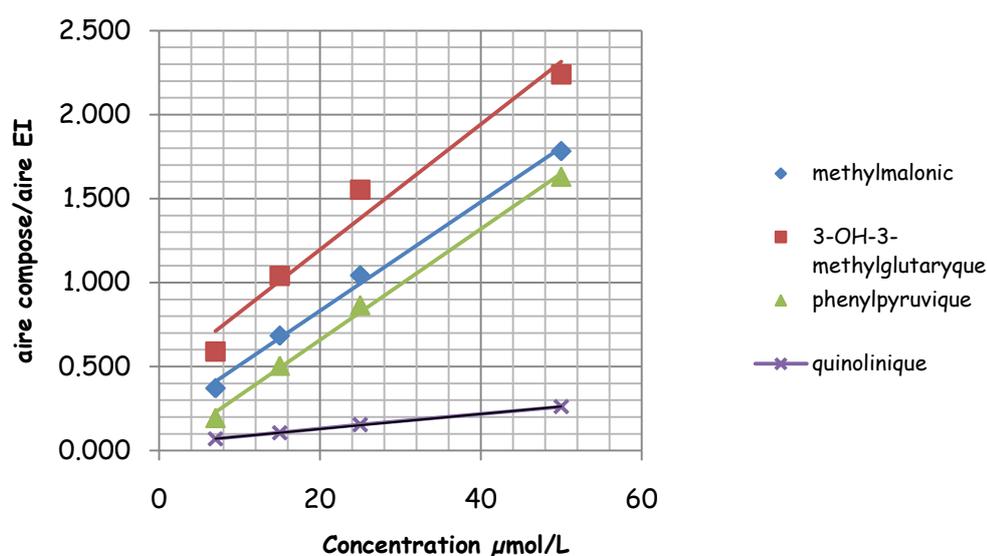


Figure IV.18. Courbes d'étalonnage des composés : l'acide méthylmalonique, l'acide 3-OH-3-méthylglutarique, l'acide phénylpyruvique, l'acide quinolinique.

Tableau IV.7. Linéarité de l'acide méthylmalonique, l'acide 3-OH-3-méthylglutarique, l'acide phénylpyruvique, l'acide quinolinique sur 4 jours.

Métabolite	Equation linéaire	R ²
Méthylmalonique	$Y = 0,0324x + 0,1837$	0,99
3-OH-3-méthylglutarique	$Y = 0,0373x + 0,4509$	0,97
Phénylpyruvique	$Y = 0,0331x - 0,0027$	0,99
Quinolinique	$Y = 0,0045x + 0,0399$	0,99

IV.3.3.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été étudiée avec les 4 métabolites décrits précédemment plus l'acide cis-acotinique. Les analyses ont été répétées au moins trois fois pendant quatre jours à trois concentrations : 7, 25 et 50 µmol/L.

Tableau IV.8. Fidélité intermédiaire de la méthode GCxGC-MS sur les 5 acides organiques.

Métabolites	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	CV%
Méthylmalonique	7	6,6
	25	3,6
	50	5,2
3-OH-3-méthylglutarique	7	5,8
	25	6,4
	50	5,5
Phénylpyruvique	7	7,7
	25	2,3
	50	4,4
Quinolinique	7	7,9
	25	6,5
	50	6,8
Cis-acotinique	7	7,6
	25	3,5
	50	6,8

Les résultats obtenus, résumés dans le tableau IV.8, montrent des pourcentages de coefficient de variation (CV%) inférieurs à 8%. Ces résultats démontrent la fidélité intermédiaire de la méthode.

IV.3.3.3 Limites de détection et quantification

Les limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ) ont été obtenues à partir des courbes d'étalonnage. La LOD a été déterminée comme étant égale à trois fois le rapport signal sur bruit et la LOQ comme étant égale à dix fois le rapport signal sur bruit. Les valeurs obtenues pour LOD et LOQ ainsi que les rendements d'extraction (RE) pour chaque composé sont notés dans le tableau IV.9.

Les résultats obtenus sont très satisfaisants.

Tableau IV.9. Valeurs de LOD, de LOQ et de RE des 5 métabolites.

Métabolites	LOD $\mu\text{mol/L}$	LOQ $\mu\text{mol/L}$	RE %
Méthylmalonique	0,2	0,6	92
3-OH-3-méthylglutarique	0,1	0,4	85
Phénylpyruvique	0,2	0,7	97
Quinolinique	0,1	1,5	96
Cis-acotinique	0,08	0,3	88

IV.3.4. Application à l'acide quinolinique

IV.3.4.1. L'acide quinolinique et la neuro-dégénérescence

L'acide quinolinique (QUIN, acide 2,3-pyridinedicarboxylique) est un composé obtenu dans la voie métabolique de la kynurenine (KYN), une des plus importantes voies du métabolisme du tryptophane [Weber et al, 1997] (Figure IV.19). Cette voie fonctionne comme un mécanisme de défense contre les pathogènes intracellulaires et comme un médiateur des signaux à l'origine des réponses de stress dans le cerveau.

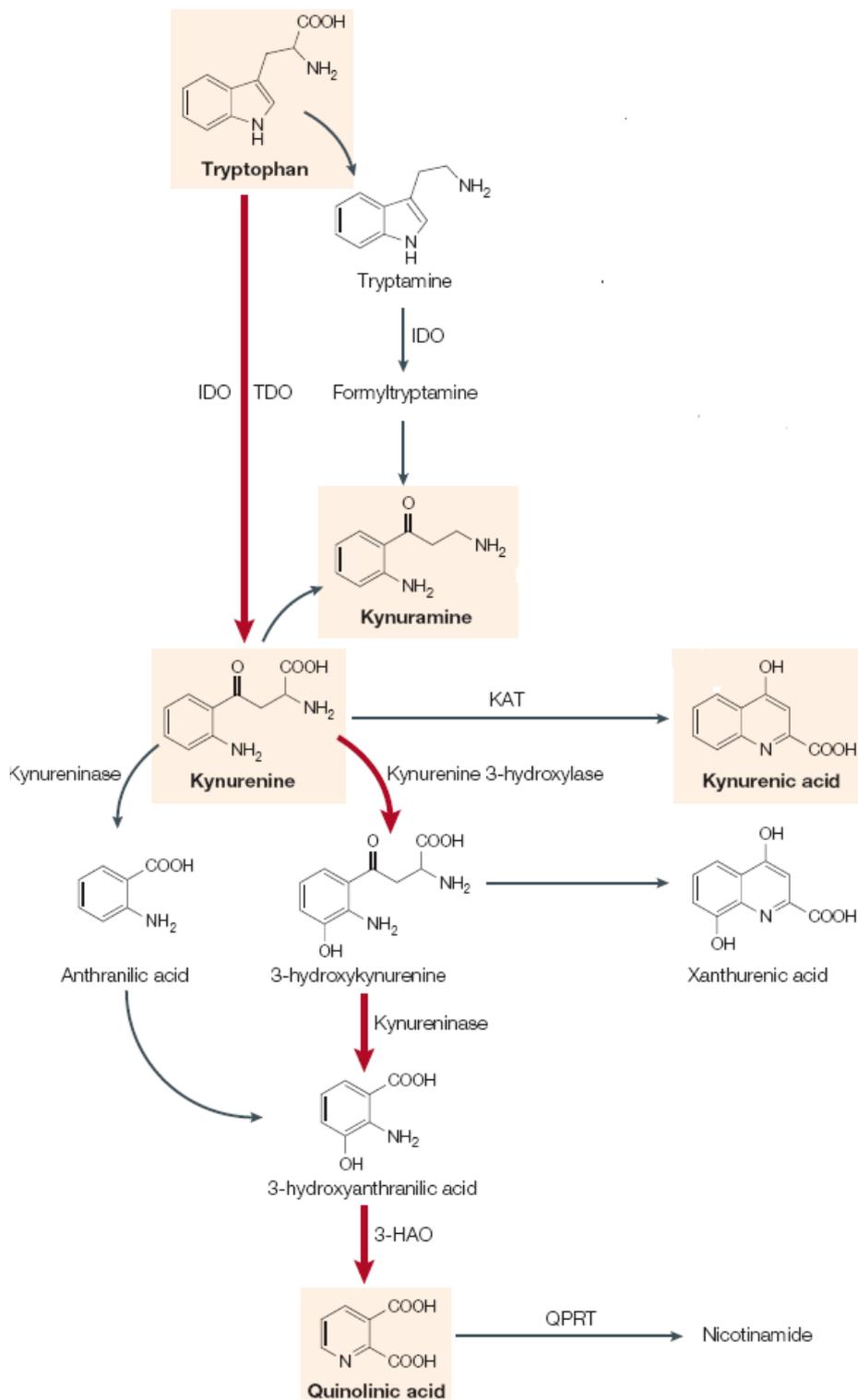


Figure IV.19. Voie métabolique de la kynurenine.

(IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase, TDO : Tryptophane 2,3-dioxygenase, KAT: Kynurenine aminotransferase, 3-HAO: 3-hydroxyanthranilate oxidase, QPRT : Quinolate phosphoribosyltransferase)

QUIN est impliqué dans les relations complexes entre l'inflammation et les réponses apoptotiques associés aux dommages et à la mort cellulaire dans le système nerveux central [Smythe et al, 2002]. QUIN est aussi lié à la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires neurologiques.

L'acide QUIN est un neuro-excitateur et c'est un agoniste des récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) [Perkins et al, 1983]. Il peut exercer sa neuro-toxicité par différents mécanismes directs ou indirects.

Dans le cerveau, l'hippocampe est une zone riche en récepteurs NMDA et est sensible aux effets neuro-toxiques de l'acide QUIN [Erhardt et al, 2002]. La réponse à une élévation de QUIN produit un événement métabolique qui peut provoquer la perturbation du développement du cerveau de façon similaire à celle qui est observée dans le cas de l'autisme.

La concentration de QUIN est beaucoup plus élevée dans le plasma que dans le cerveau, mais l'augmentation des taux plasmatiques contribuent à accroître la concentration de QUIN dans le tissu cérébral. Cela est probablement dû à une augmentation dans le transport de la barrière hémato-encéphalique [Luthman et al, 1996]. En fonction de la concentration, QUIN peut conduire à la mort neuronale ou à un dysfonctionnement neuronal chronique [Kerr et al, 1995].

Guillemin et al. [Guillemin et al, 2007] ont montré que QUIN est un facteur potentiel dans la cascade complexe et multifactorielle de la neuro-dégénérescence dans la maladie d'Alzheimer. QUIN est associé à la neuro-inflammation, ce qui pourrait également l'impliquer dans le diagnostic de l'autisme [Zimmerman et al, 2005] et de la maladie de Huntington [Schwarcz et al, 2010]. Une exposition à de grandes concentrations de métabolites du tryptophane (parmi eux, QUIN), pendant la croissance, peut affecter le comportement humain à l'âge adulte [Pocivavsek et al, 2012]. Cette exposition peut contribuer à des déficits cognitifs et à des comportementaux associés à des troubles neuropsychiatriques, comme la schizophrénie [Iccarino et al, 2013].

Des études de détection de QUIN ont été faites dans différents fluides biologiques : Liquide céphalorachidien [Zimmerman et al, 2005; Heyes et al, 1995; Medana et al, 2003], plasma [Smythe et al, 2002, Smythe et al, 2003; Heyes et al, 1988], tissu cérébral [Wolfensberger et al, 1983] et dans l'urine [Mawatari et al, 1995; Patterson et al, 1980; Chamberlin et al, 1987, Tuchman et al, 1984]. A part dans le cas de l'urine, tous ces échantillons biologiques sont obtenus avec des méthodes invasives, notamment après la mort du patient dans le cas du tissu cérébral.

La détection de QUIN dans l'échantillon urinaire a déjà été entreprise par différentes techniques telles que la chromatographie liquide [Mawatari et al, 1995; Patterson et al, 1980; Rider et al, 2002], l'électrophorèse capillaire de zone [Weber et al, 1997, Wang et al, 2013], la polarographie à impulsion différentielle [Furlanetto et al, 1998] et la chromatographie en phase gazeuse classique [Chamberlin et al, 1987; Tuchman et al, 1984, Dobbie et al, 1997]. Mais parfois la quantification fiable de QUIN par ces techniques a montré des limites. En effet, il est difficile de détecter de faibles quantités de QUIN en GC-MS et lorsqu'il se présente en quantité plus élevée, il est élué avec un autre composé et sa détection devient plus difficile.

Dans une perspective de diagnostic de certaines maladies neurodégénératives, il est donc important de s'intéresser à la quantification de QUIN dans les échantillons urinaires avec des techniques plus sensibles et plus sélectives.

IV.3.4.2. Quantification de l'acide quinolinique urinaire chez l'enfant

La quantification du QUIN chez les enfants malades pourrait représenter un facteur important dans la détermination du degré d'exposition des cellules neuronales. Elle devrait, ainsi, aider à déterminer les dommages causés par ce métabolite dans le développement de l'enfant.

Nous avons donc évalué la pertinence de la méthode développée et proposée pour la quantification de ce métabolite.

12 échantillons d'urine appartenant à des enfants sains et des enfants atteints de divers troubles neurologiques diagnostiqués par le service de neurologie de l'hôpital Armand Trousseau ont été analysés en GCxGC-MS après préparation de l'échantillon.

L'extraction des métabolites a été effectuée avec l'ancien (acétate d'éthyle) et le nouveau (acétate d'éthyle + tétrahydrofurane) protocoles (cf. § IV.1.2.4). Les extraits ont été analysés avec la méthode GCxGC-MS. L'acide heptadecanoïque a été utilisé comme étalon interne.

La figure IV.20 démontre la capacité de détection de l'acide quinolinique avec la méthode GCxGC-MS, là où la méthode GC-MS était défailante

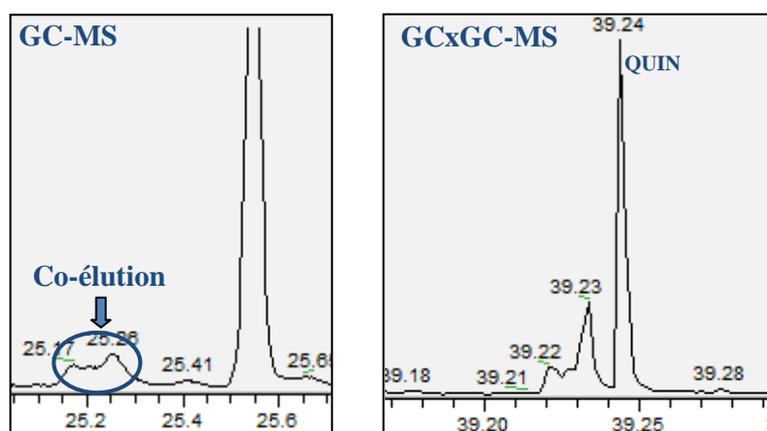


Figure IV.20. Détection de l'acide QUIN en GC-MS and GCxGC-MS (ex: un des pics modulés, tr: 39,24)

La figure IV.21 montre les résultats de la quantification de l'acide quinolinique.

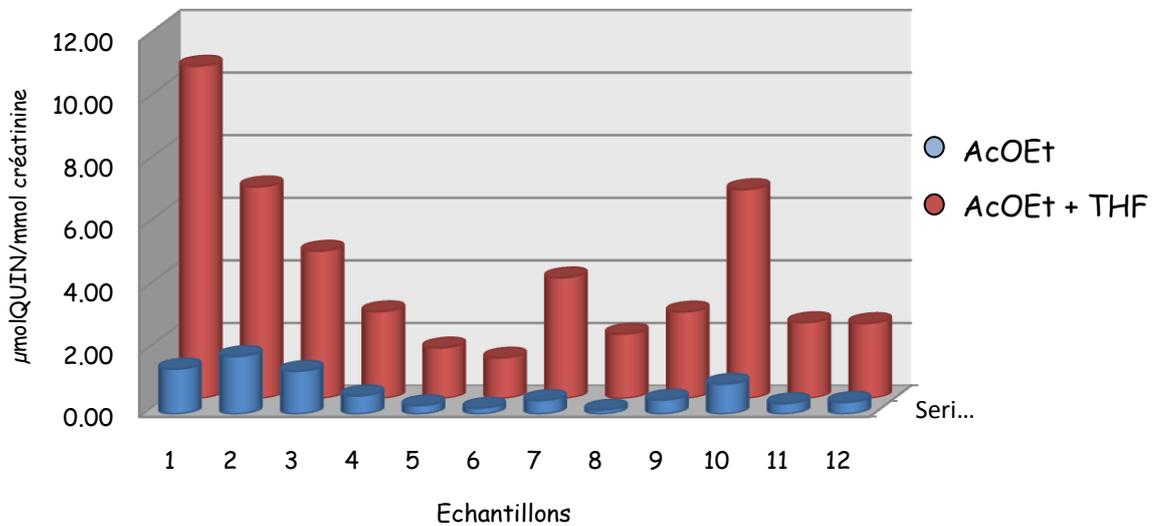


Figure IV.21. Comparaison du pouvoir d'extraction avec une et deux étapes dans 12 échantillons urinaires.

Comme vu précédemment, il apparaît que la quantité de QUIN extraite par la nouvelle méthode proposée est supérieure à celle extraite par le procédé classique.

Par ailleurs, il apparaît sur le tableau IV.10 que la concentration de QUIN diminue lorsque l'enfant grandit, comme cela a été reporté par *Guneral et al.* [*Guneral et al., 1994*].

Les valeurs de concentration obtenues, d'une part chez les enfants sains, sont comprises entre 2,43 et 6,68 μmol de QUIN/mmol de créatinine et, d'autre part chez les enfants avec des troubles neurologiques, vont jusqu'à 10,62 μmol de QUIN/mmol de créatinine (Tableau IV.10).

Tableau IV.10. Concentrations d'acide quinolinique dans les échantillons urinaires des enfants sains (S) et des enfants avec des troubles neurologiques (P) suivant leur âge.

Enfant	Age (ans)	Sexe	Concentration ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine)
P1	9	M	1,30
P2	7	F	1,62
P3	6	M	2,06
P4	3	M	2,78
P5	2	M	3,86
P6	3	M	4,71
P7	3	M	6,77
P8	1,7	M	10,62
S1	10	M	2,43
S2	8	M	2,40
S3	8	F	2,77
S4	6	M	6,68

Les résultats obtenus, lors de l'analyse des échantillons, ne nous permettent pas de discriminer les deux groupes d'enfants étudiés. Ces taux d'acide quinolinique n'étant pas excessifs, selon Bouatra *et al* [Bouatra *et al*, 2013], ils ne peuvent, seuls, expliquer le dommage neuronal observé chez les patients évalués. L'application à un plus grand nombre de cas sains et pathologiques serait plus judicieuse.

IV.4. COMPARAISON DES PROFILS : RESULTATS PRELIMINAIRES

La GCxGC est l'une des plus puissantes techniques pour analyser les composés volatils dans des mélanges complexes. Lorsqu'on recherche des métabolites non ciblés dans un échantillon complexe, l'analyse visuelle des cartes chromatographiques 2D n'est pas évidente pour distinguer un profil complet. On doit donc utiliser les chromatogrammes bruts afin de détecter tous les métabolites présents dans l'échantillon, ce qui représente un travail très fastidieux et chronophage. En effet, grâce à la modulation, la capacité obtenue est, en moyenne, de 3 à 4 pics par composé. Nous avons détecté 231 composés lors de l'analyse du mélange des urines, cela se

traduit par l'obtention d'environ 693 pics dans le chromatogramme brut. A défaut de logiciel intégré permettant la comparaison automatique des chromatogrammes, identifier et différencier tous ces composés manuellement a été un long travail. La tâche devient encore plus complexe lorsqu'il faut discriminer les composés d'intérêt par comparaison des profils chromatographiques de divers enfants.

Afin de faciliter la comparaison des profils urinaires chez les enfants sains et présentant des symptômes pathologiques, nous avons étudié deux approches comparatives dont l'objectif était de distinguer les biomarqueurs potentiels de maladies chez les enfants présentant des troubles neurologiques :

- Une basée sur la comparaison de chromatogrammes bruts
- Une basée sur la comparaison d'images comme les cartes chromatographiques 2D.

IV.4.1. Comparaison de chromatogrammes: Logiciel GC-LC Concordance

Le logiciel LC-GC CONCORDANCE [Pont et al, 2007 ; Suberbielle et al, 2008] permet d'automatiser les comparaisons des chromatogrammes venant de mélanges complexes en compensant simultanément les décalages et les fluctuations aléatoires du temps de rétention des composants. Quand un chromatogramme complexe est obtenu, le logiciel donne la possibilité de fixer manuellement les pics afin de modéliser correctement la déformation. Ce logiciel, en cours d'évaluation, offre la possibilité de comparaison automatique des profils, deux à deux, en quelques minutes. Ainsi, quatre chromatogrammes correspondant à deux enfants sains et à deux enfants présentant des troubles neurologiques ont été sélectionnés, intégrés par le logiciel Xcalibur et les données résultantes ont été traités par le logiciel LC-GC CONCORDANCE. Pour déterminer la concordance des pics sur les chromatogrammes, les temps de rétention de quatre composés présents dans tous les échantillons ont été fournis comme référence.

Une comparaison entre deux chromatogrammes provenant d'un enfant sain et un enfant malade est illustrée dans la figure IV.22.

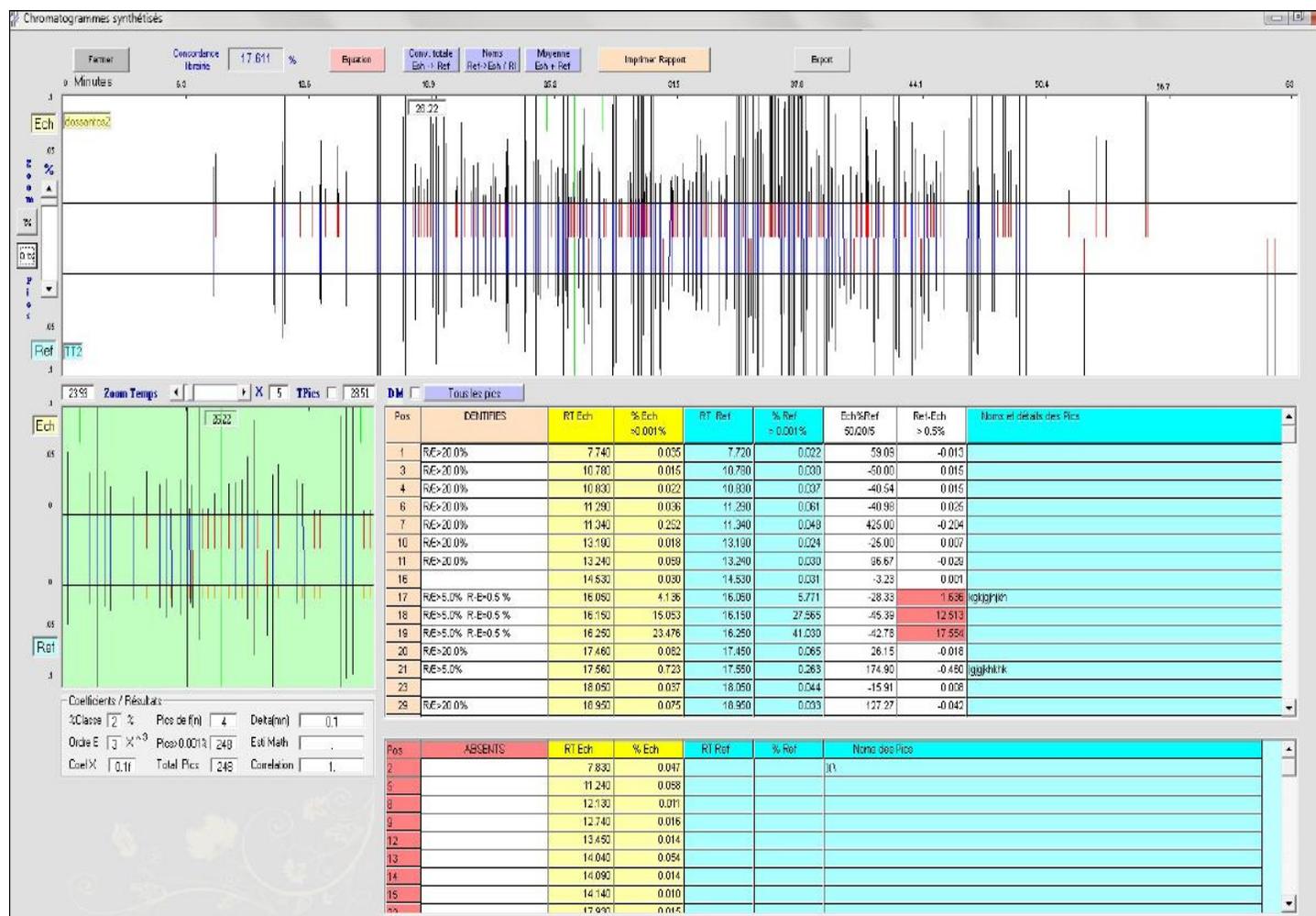


Figure IV.22. Représentation graphique et comparaison de chromatogrammes d'un enfant sain (bas) et d'un enfant malade (haut) avec le logiciel LC-GC Concordance.

Comme montré sur la figure IV.22, il est possible de visualiser instantanément la comparaison des profils représentés sur des axes avec des petites barres représentant les pics. Les lignes bleues matérialisent les concordances de pics entre les deux axes et les lignes rouges signalent les pics manquants sur l'un des deux axes.

Dans cet exemple, il y a de nombreuses lignes rouges donc la concordance moyenne entre les deux chromatogrammes est faible. Cette observation faite sur la figure IV.22 est confirmée par le résultat de 37,75% inscrit sur la première page du rapport fourni en figure IV.23.

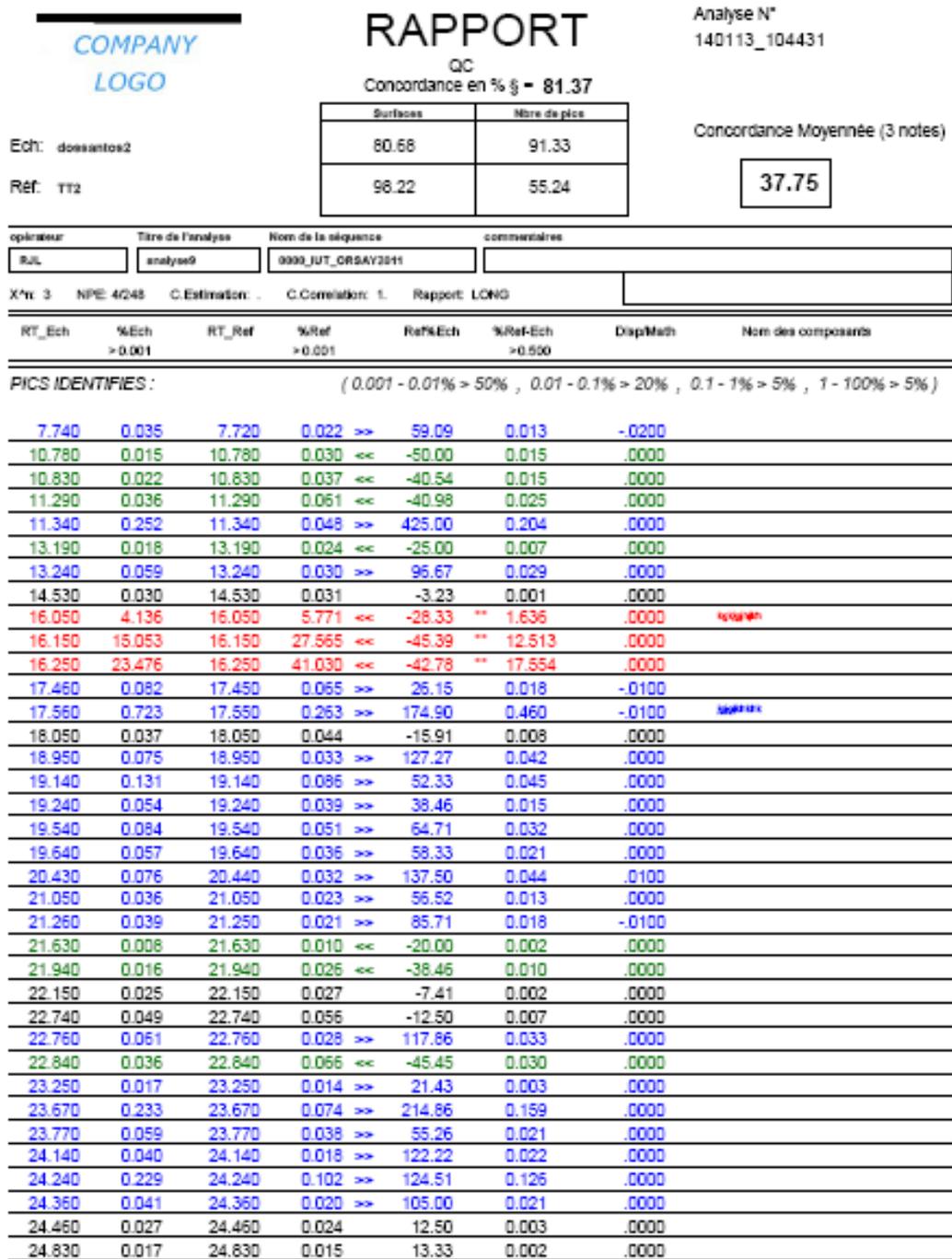


Figure IV.23. Première page du rapport pour la comparaison de deux chromatogrammes

Après comparaison des chromatogrammes, le rapport fourni (Figure IV.23) détaille les informations sur la variation des surfaces, le temps de rétention des pics en commun et ceux manquants dans chaque échantillon. Dans cette comparaison 212 pics concordants et 118 pics non concordants ont été relevés. Ce dernier nombre semble élevé mais il faut rappeler qu'un composé est représenté par plusieurs pics sur les chromatogrammes bruts en GCxGC et que la composition qualitative et quantitative des urines est très variable.

Etant donné que le logiciel LC-GC Concordance utilise un chromatogramme témoin pour réaliser les comparaisons deux à deux, cet outil ne peut être utilisé pour effectuer une discrimination globale entre profils sains et profils pathologiques. Au mieux, l'utilisation d'un mélange d'urines d'enfants sains comme profil témoin permettrait de mettre en évidence les zones des chromatogrammes présentant des différences importantes, lors de la comparaison avec d'autres profils. Cela pourrait nous orienter vers des pics susceptibles d'avoir un intérêt dans les cas pathologiques.

IV.4.2. Comparaison des cartes graphiques : Collaboration ESPCI

Dans la représentation sous forme de carte 2D du chromatogramme issu de l'analyse GCxGC, les variations d'intensité du signal sont représentés par une graduation de couleurs. Ces cartes chromatographiques 2D peuvent être considérées comme des images et découpées en points appelés pixels.

L'équipe de statistique appliquée à l'Ecole Supérieure de Physique Chimie Industrielle ParisTech propose un outil de comparaison de cartes chromatographiques 2D. Ce logiciel vise à classer les chromatogrammes en fonction de la composition chimique des échantillons tout en déterminant l'origine (pixels) de leur discrimination [Vial et al, 2011].

Pour comparer des profils urinaires et ainsi pouvoir tirer des informations sur leurs différences potentielles, nous avons utilisé les chromatogrammes correspondant à

plusieurs échantillons urinaires de 2 enfants sains et 3 enfants avec des troubles neurologiques. Ces échantillons sont décrits dans le tableau IV.11. Afin d'obtenir une bonne résolution graphique des cartes 2D, une gamme de masse réduite à 200 unités (230-430 m/z) a été balayée et une fréquence d'acquisition de 20 Hz a été utilisée. Les chromatogrammes obtenus ont été convertis au format ASCII et les données ont été transmises à l'équipe de statistique appliquée à l'Ecole Supérieure de Physique Chimie Industrielle ParisTech. Les 13 chromatogrammes retenus correspondent aux profils indiqués dans le tableau IV.11.

Tableau IV.11. Nombre de chromatogrammes et répétitions retenus pour l'étude du pixel discriminant.

Numéro	Individu	Echantillon	Groupe
1		MM_1	Sains
2	MM	MM_2	
3		MM_3	
4		TT_1	
5	TT	TT_2	
6		TT_3	
7		BB_1	Patients
8	BB	BB_2	
9		BB_3	
10	DS	DS_1	
11		DS_2	
12	RR	RR_1	
13		RR_2	

Pour réaliser la comparaison globale des chromatogrammes GCxGC, l'équipe de statistique appliquée a réalisé un prétraitement par la soustraction de la ligne de base et la normalisation de l'aire totale à la moyenne de chaque groupe. Une Analyse en Composantes Principales (ACP) est alors effectuée. L'ACP est une méthode statistique d'analyse de données qui permet de représenter une matrice renfermant un grand nombre de variables en un plus petit nombre de dimensions. L'interprétation du résultat de l'ACP est graphique et permet notamment une interprétation dans l'espace des individus. Cette interprétation s'effectue en repérant les individus qui sont aux extrémités des axes représentant les composantes principales. Ces individus représentent les cas extrêmes de variations des variables identifiées comme importantes.

Les résultats obtenus en Analyses en Composantes Principales (ACP) sont présentés en figure IV.24. Ils laissent apparaître une organisation par groupes en fonction de l'individu.

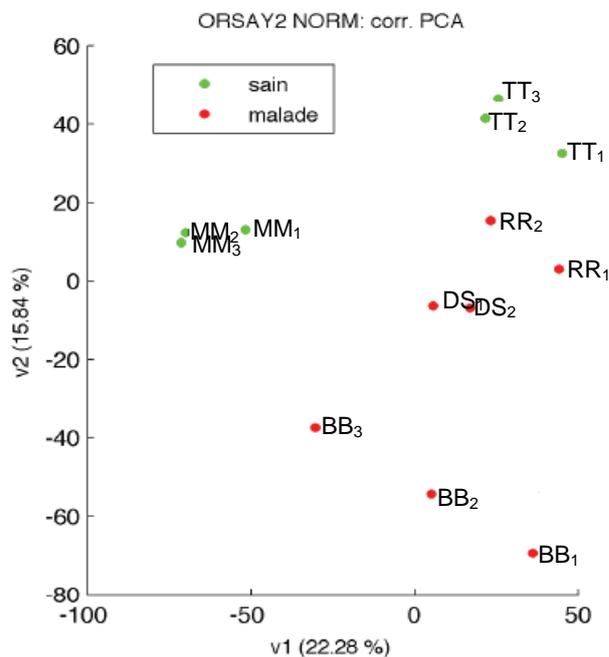


Figure IV.24. ACP des groupes de données normalisées

Pour la sélection des potentiels pixels discriminants, nos collaborateurs de l'ESPCI ont utilisés deux critères : le coefficient de corrélation de Spearman et l'utilisation d'un seuil d'intensité des pics. Les résultats indiquent 29 pixels discriminants trouvés chez les enfants ayant des troubles neurologiques. Ces pixels mettent en évidence des variations d'intensité des pics correspondant aux composés discriminants. Un exemple de pixel discriminant associé à un composé surexprimé chez les enfants avec des troubles neurologiques est montré en figure IV.25.

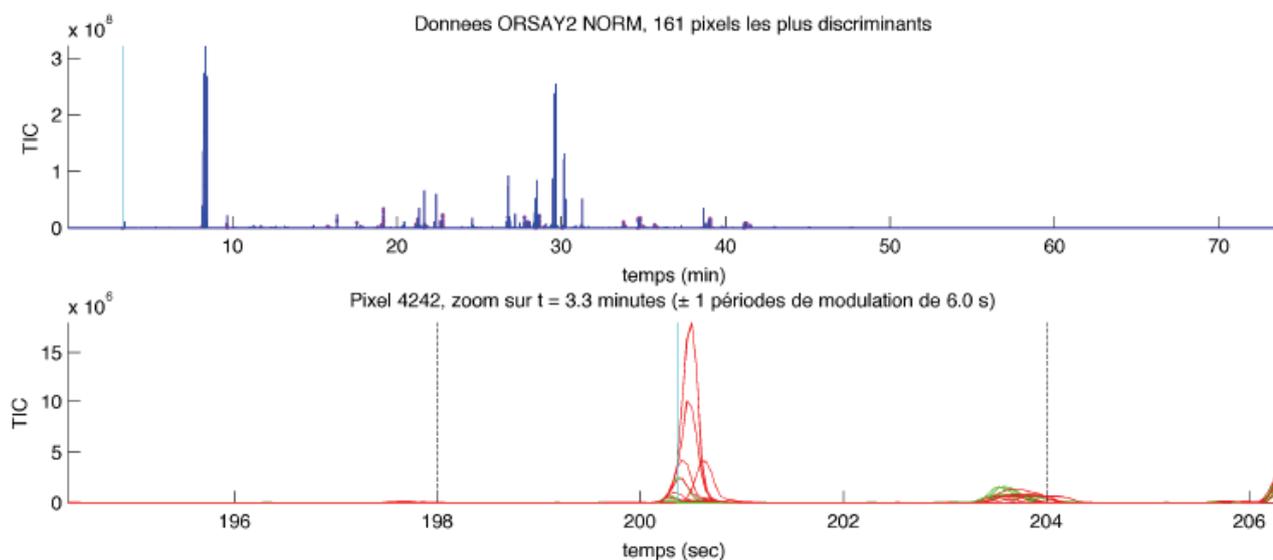


Figure IV.25. Exemple de pixel discriminant associé à un composé surreprésenté chez les enfants avec des troubles neurologiques (rouge) en comparaison aux profils des enfants sains (vert).

Les 29 pixels discriminants nous ont permis d'identifier 8 composés : L'acide isobutyrique, l'acide succinique, l'acide benzoïque, l'acide D-gluconique, l'acide méthylcitrique, l'acide pantothénique, l'acide hydroxyindolique et la glycine.

Pour tous ces composés identifiés, l'aire des pics correspondant a été mesurée en prenant en compte le fait que plusieurs pixels discriminants correspondent à un pic modulé pour chaque composé et que, comme décrit précédemment, la détermination de l'aire globale s'effectue par la somme des aires de tous les pics modulés.

Les résultats obtenus sont très variables d'un échantillon à l'autre, reflétant une grande variabilité des concentrations des composés excrétés dans l'urine. Des différences de concentration de certains composés dues à l'idiosyncrasie de chaque organisme et à la variabilité de la diète alimentaire ont été observées. Toutefois, on note que l'acide D-gluconique a une concentration plus élevée chez les enfants présentant des troubles neurologiques, ce qui est une information intéressante.

La comparaison globale des chromatogrammes avec l'approche du pixel discriminant n'a pas mis en évidence, de manière nette, des composés qui nous auraient aidés à distinguer les profils de patients par rapport aux profils sains.

Les résultats obtenus montrent que cette approche mérite d'être approfondie et appliquée à un plus grand nombre de cas sains et pathologiques, éventuellement sur d'autres gammes de masses, ce qui permettrait d'obtenir une information plus complète.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adahchour M, Brandt M, Baier H.U, Vreuls R.J.J, Batenburg A.M, Brinkman U.A.Th. Comprehensive two dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadripole mass spectrometer: principles and applications. *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 438.

Al-Dirbashi O, Kurdi W, Imitaz F, Ahmad A.M, Al-Sayed M, Tulbah M, Al-Nemer M, Rashed M.S. Reliable prenatal diagnosis of Canavan disease by measuring N-acetylaspartate in amniotic fluid using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Prenat. Diagn.* 2009, 29, 477-480.

Almstetter M.F, Oefner P.J, Dettmer K. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 1993-2013.

Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo A.C, Wilson M.R, Knox C, Bjorndahl T.C, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame Z.T, Poelzer J, Huynh J, Yallou F.S, Psychogios N, Dong E, Boqumil R, Roehring C, Wishart D.S. The human urine metabolome. *PLoS One.* 2013, 8(9), e73076.

Chamberlin B.A, Sweeley Ch.C. Metabolic profiles of urinary organic acids recovered from absorbent filter paper. *Clin Chem.* 1987, 33, 572-576.

Dobbie M.S, Surtees R.A.H. Concentrations of quinolinic acid in cerebrospinal-fluid measured by gas-chromatography and electron-impact ionization mass spectrometry age related changes in a pediatric reference population. *J. chromatogr B.* 1997, 696, 53-58.

Dunn W.B, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-Mcintyre S, Anderson N, Brown M, Knowles J.D, Halsall A, Haselden J.N, Nicholis A.W, Wilson I.D, Kell D.B, Goodacre R, Human serum metabolome (HUSERMET) Consortium. Procedures for large scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2011, 6 (7), 1060-1083.

Erhardt S, Engberg G, Increased phasic activity of dopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area following pharmacologically elevated levels of endogenous kynurenic acid. *Acta Physiol Scand.* 2002, 175, 45-53.

Fernandez-Peralbo M.A, Luque de Castro M.D. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass spectrometry analysis. *Trends Anal. Chem.* 2012, 41, 75-85.

Furlanetto S, Pinzauti S, La Porta E, Chiarugi A, Mura P, Orlandini S. Development and validation of a differential pulse polarographic method for quinolinic acid determination in human plasma and urine after solid-phase extraction, a chemometric approach. *J. Pharm. and Biom. Anal.* 1998, 17, 1015-1028.

Gerlo E, Van Coster R, Lissens W, Winckelmans G, De Meirleir L, Wevers R. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of N-acetylated amino acids: The first case of aminoacylase I deficiency. *Anal. Chim. Acta.* 2006, 571, 191-199

Gropper S.S, Smith J.L. *Advances Nutrition and Human Metabolism.* Sixth edition. Wadsworth, cengage learning. USA, 2013, pag. 317.

Grupe A, Spiteller G. New polar acid metabolites in human urine. *J. Chromatogr.* 1981, 226, 301-314.

Guillemin G, Brew B.J, Noonan C.E, Knight T.G, Smythe G.A, Cullen K.M. Mass spectrometric detection of quinolinic acid in microdissected Alzheimer's disease plaques. *Int. Congr. Ser.* 2007, 1304, 404-408.

Guneral F, Bachman C. Age related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin. Chem.* 1994, 40, 862-868.

Habbal Z.M, Chidiac-Tannoury R. Lactic acid dimer: An artifact in the Gas Chromatographic analysis of urine with massive Lactic Acid Aciduria. *Clin. Chem.* 2001, 47, 979-980

Hegazi A. G, El-Hady K. A. Influence of Honey on the Suppression of Human Low Density Lipoprotein (LDL) Peroxidation (In vitro). *Evid Based Complem. Alternat. Med.* 2009, 6,113-121.

Heyes M.P, Markey S.P. Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal. Biochem.* 1988, 174(1), 349-359.

Heyes M, Saito K, Milstein S, Schiff S. Quinolinic acid in tumors, hemorrhage and bacterial infections of the central nervous system in children. *J. Neurol. Sci.* 1995, 133, 112-118.

Hope J.L, Prazen B.J, Nilsson E.J, Lidstrom M.E, Synovec R.E. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry detection : analysis of amino acid and organic acid trimethylsilyl derivatives in rye grass samples. *Talanta*. 2005, 65, 380-388

Iccarino H.F, Suckow R.F, Xie S, Bucci D.J. The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2013, 150 (2-3) 392-397.

Inoue Y, Kuhara T. Rapid and sensitive method for prenatal diagnosis of propionic acidemia using stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and urease pretreatment. *J. Chromatogr B*. 2002, 776, 71-77.

Inoue Y, Kuhara T. Rapid and sensitive screening and chemical diagnosis of canavan disease by gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2004, 806, 33-39.

Kamerling J.P, Duran M, Bruinvis L, Ketting D, Wadman S.K, de Groot C.J, Hommes F.A. 2-ethoxyethoxy acetic acid: an unusual compound found in th gas chromatographic analysis of urinary organic acids. *Clin. Chim. Acta*, 1997, 77, 397-405.

Kerr S.J, Armati P.J, Brew B. J. Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain culture. *J. Neurovirol*. 1995, 1, 375-380.

Ketting D, Wadman SK, Bruinvis L, Sweetman L. The occurrence of lactyl lactate and succinyl lactate in the urine of patients screened for inherited metabolic disease. *Clin Chim Acta*. 1985, 146, 29-35.

Koek M.M, Muilwijk B, van Stee L.L.P, Hankeimer Th. Higher mass loadability in comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry for improved analytical performance in metabolomics analysis. *J. Chromatogr. A*. 2008, 1186, 420-429.

Kouremenos KA, Pitt J, Marriot PJ. Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two dimensional gas chromatography: Applications to diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery. *J. Chromatography A*. 2010, 1217, 104-111.

Kringstad R, Nordal A. Lactone-forming acids in succulent plants. *Phytochem*. 1975, 14, 1868-1870

Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Oshe M, Zhen-wei X, Yoshida I, Inokuchi T, Yamaguchi S, Takayanagi M, Matsumoto I. Pilot study of gas chromatographic-mass spectrometry screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J. Chromatogr B.* 1999, 731, 141-147.

Kwokei J.N.G. Andersen B.D, Bianchine J.R. Capillary gas chromatographic mass spectrometric profiles of trimethylsilyl derivatives of organic acids from amniotic fluids of different gestational age. *J. Chromatog.* 1982, 228, 43-50

Lefevere M.F, Verhaeghe B.J, Declerck D.H, Van Bocxlaer J.F, De Leenheer A.P, De Sager R.M. Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Single and Multicolumn Capillary Gas Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 23-29.

Lehnert W and Werle E. Elevated excretion of N-acetylated branched-chain aminoacids in maple syrup urine disease. *Clin. Chim. Acta.* 1988, 123-126

Liebich HM, Foerst C. Urinary excretion of N-Acetylamino acids. *J. Chromatogr.* 1985, 338, 187-191.

Lu X, Kong H, Li H, Ma C, Tian J, Xu G. Resolution prediction and optimization of temperature programme in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2005, 1086, 175-184.

Luthman J, Vänerman E, Fredrikson G, Fornstedt-Wallin B, in: Allegri Fillipini G, Costa C.V.L, Bertazzo (Eds). *Recent advances in tryptophan research*, Plenum, New York, 1996, 229-239.

Matsumoto I and Kuhara T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry - rapid, practical and simultaneous urinary metabolites. *Mass spectrometry Reviews*, 1996, 15, 43-57.

Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, Watanabe M. Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta* 1995, 302, 179-183.

Medana I.M, Day N.P.J, Salahifar-sabet H, Stocker R, Smythe G, Bwanaisa L, Njobvu A, Kayira K, Turner G.D.H, Taylor T.E, Hunt N.H. The clinical significance of cerebrospinal fluid levels of kynurenine pathway metabolites and lactate in severe malaria. *J. Infect. Dis.* 2003, 188, 844-849.

Meininger W.M. External use of "carbitol solvent", "carbitol" and other agents. Arch. Derm. Syphilol. 1948, 58(1), 19-26.

Mostafa A, Edwards M, Górecki T. Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. J. of chromatography A. 2012, 1255, 38-55

Murphy R.E, Schure M.R, Foley J.P. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. Anal. Chem. 1998, 70, 1585 - 1594.

Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S. Simplified method for the chemical diagnosis of organic acidurie using GC-MS. J. Chromatogr B. 2010, 878, 942-948.

Niwa T. Review. Metabolic profiling with gas chromatography - mass spectrometry and its application to clinical medicine. J. Chromatogr. 1986, 379, 313-345

Patterson J.I, Brown R.R. Determination of urinary quinolinic acid by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 1980, 182, 425-429.

Perkins M.N, Stone T.W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsants kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. Brain Res. 1982, 243, 184-187.

Perkins M.N., Stone T.W. In vivo release of [3H]-purines by quinolinic acid and related compounds. Br. J. Pharmacol. 1983, 80(2), 263-267.

Pocivavsek A, Wu H.Q, Elmer G.J, Bruno J.P, Schwarcz R. Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood. Eur. J. Neurosci. 2012, 35(10), 1605-1612.

Pont F, Viennet L, Regazzoni S, Loyer R. Comparaison automatique de chromatogrammes complexes assisté par ordinateur en GC et HPLC. Application au contrôle de qualité dans l'industrie des parfums et à la protéomique. Spectra Analyse. 2007, 259, 49-56.

Rechner A.R., Kuhnle G, Bremner P, Hubbard G.P, Moore K.P. and Rice-Evans C.A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 33, 220-235.

Rider L.G, Schiffenbauer A.S, Zito M, Lim K.L, Ahmed A, Zemel L.S, Rennebohm R.M, Passo M.H, Summers R.M, Hicks J.E, Lauchenbruch P.A, Heyes M.P, Miller F.W, Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaboration Study Group. Neopterin and quinolinic are surrogate measures of disease activity in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Clin. Chem.* 2002, 10, 1681-1688.

Szwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar K.V, Muchowski P.J. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog. Neurol.* 2010, 90(2), 230-245.

Shoemaker J and Elliott W. Automated screening of urine samples for carbohydrates organic and amino acids after treatment with urease. *J Chromatogr.* 1991, 562, 125-138.

Smythe G.A, Braga O, Brew B.J, Grant R.S, Guillemin G.J, Kerr S.J, Walker W. Concurrent quantification of quinolinic, picolinic, and nicotinic acids using electron-capture negative ion gas chromatography - mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2002, 301, 21-26

Smythe G.A, Poljak A, Bustamante S, Braga O, Maxwell A, Grant R, Sachdev P. ECNI GC-MS analysis of picolinic and quinolinic acids and their amides in human plasma, CSF, and brain tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 527, 705-712.

Suberbielle E, Gonzales-Dunia D, Pont F. High reproducibility of two-dimensional liquid chromatography using pH driven fractionation with a pressure resistant electrode. *J. Chromatogr. B.* 2008, 871, 125-129.

Tuchman M, Bowers L.D, Fregien K.D, Crippin P.J, Krivit, W. Capillary Gas Chromatographic Separation of Urinary Organic Acids. Retention Indices of 101 Urinary Acids on a 5% Phenylmethyl Silicone Capillary Column. *J. Chromatogr. Sci.* 1984, 22, 5, 198-202.

Urine Metabolome Database (UMDB), <http://www.urinemetabolome.ca>

Vial J, Pezous B, Thiébaud D, Sassiati P, Teillet B, Cahours X, Rivals I. The discriminant pixel approach: A new tool for the rational interpretation of GCxGC-MS chromatograms. *Talanta.* 2011, 83, 1295-1301.

Wamelink M.M.C, Smith D.E.C, Jakobs C and Verhoeven N.M. Analysis of polyols in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry: a useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005, 28, 951-963.

Wang X, Davis I, Liu A, Miller A, Shamsi S.A. Development of a capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry assay with a sulfonated capillary for profiling picolinic acid and quinolinic acid formation in multienzyme system. *J. chromatogr. A.* 2013, 1316, 147-153.

Weber P. L., Malis M., Palmer S.D., Klein T.L., Lunte S. L. Capillary zone electrophoresis separation of tryptophan and its metabolites, including quinolinic acid. *J. Chromatogr B.* 1997, 697, 263-268.

Wittmann Gy, Karg E, Muhl A, Bodamer O.A, Turi S. Comparison of tetrahydrofuran and ethyl acetate as extraction solvents for urinary organics acids analysis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008, 31, 73-80.

Wojtowicz P, Zrostlikova J, Kovalczuck T, Schurek J, Adam T. Evaluation of comprehensive two dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of Inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *J. Chromatography A.* 2010, 1217, 8054-8061.

Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster A.C. Whetsell O, Schwarcz R. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.* 1983, 41, 247-252.

Zimmerman A.W, Jyonouchi H, Comi A.M, Connors S.L, Milstein S, Varsou A, Heyes M.P. Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatr. Neurol.* 2005, 33, 195-201.

CHAPITRE V.

**ANALYSE DIRECTE EN TEMPS REEL
« DART » DES ACIDES ORGANIQUES**

V.1 Introduction à l'analyse directe en temps réel « *DART* »

V.1.1. La source d'ionisation « *DART* »

V.1.2. Les mécanismes d'ionisation

V.1.3. Le *DART* et le métabolome humain

V.2. Instrumentation

V.2.1. Introduction de l'échantillon

V.2.2. Source d'ions *DART*

V.2.3. LTQ - Orbitrap XL

V.3. Développement d'une méthode d'analyse directe en temps réel « *DART* »

V.3.1. Echantillons

V.3.2. Détectabilité des acides organiques

V.3.3. Application aux échantillons urinaires d'enfants

V.3.3.1 Approche qualitative

V.3.3.2. Approche quantitative

Conclusion

INTRODUCTION

L'analyse directe en temps réel dite « DART » est basée sur une nouvelle source d'ionisation de composés à pression atmosphérique qui permet un échantillonnage direct à l'air libre [Cody et al, 2005]. C'est une méthode d'ionisation très douce par laquelle les composés de l'échantillon sont ionisés par un gaz électriquement déchargé provenant de la source d'ions « DART ». Ils sont ensuite conduits vers l'analyseur d'un spectromètre de masse (DART-MS) [Yan et al, 2014]. Les avantages de l'ionisation à pression atmosphérique sont : la thermalisation (= retour à un équilibre thermodynamique) immédiate des ions nouvellement formés ainsi que la faible fragmentation des ions des analytes [Gross, 2014].

Le DART-MS permet l'analyse directe des échantillons, sans préparations très contraignantes en amont, sous une forme solide, liquide ou gazeuse. Il est appliqué à des composés déposés ou adsorbés sur des surfaces ou qui sont désorbés dans l'atmosphère [Gross, 2014].

Ces dernières années, le DART-MS a gagné en popularité grâce à sa capacité à déterminer la composition de mélanges complexes [Chernetsova et al, 2011 ; Vladislav et al, 2014]. Des applications ont été effectuées dans différents domaines comme la criminalistique [Steiner et al, 2009], la métabolomique [Navare et al, 2010 ; Zhou et al, 2010], la pharmacocinétique [Jeckelman et al, 2010], la pétrochimie [Rummel et al, 2010] et l'agroalimentaire [Vaclavick et al, 2010].

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est donc d'évaluer la capacité du DART-MS à analyser des métabolites urinaires tels que les acides organiques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Maxime Bridoux de la Direction des Applications Militaires (DAM) du Commissariat à l'énergie atomique (CEA).

V.1. INTRODUCTION A L'ANALYSE DIRECT EN TEMPS REEL « DART »

V.1.1. La source d'ionisation « DART »

Au sein de la source d'ionisation d'analyse directe en temps réel « DART » schématisée en figure V. 1, l'hélium est guidé à travers un tube segmenté axialement. Dans le premier compartiment, une décharge corona est générée entre l'électrode aiguille et la première électrode à disque perforée en produisant des électrons et des atomes excités (métastables, exemple : He*) [Gross, 2014; Carroll et al, 1975]. Le plasma passe à travers un second compartiment et les cations formés sont extraits par une autre électrode perforée, lorsqu'ils traversent cette dernière avec le flux de gaz. Ce flux est variablement chauffé et acheminé vers une lentille ou grille afin d'éliminer les anions et les électrons. Ainsi, l'hélium sort de la source d'ionisation au niveau de la zone de réaction atmosphérique contenant des espèces excitées, neutres électroniquement [Cody et al, 2005].

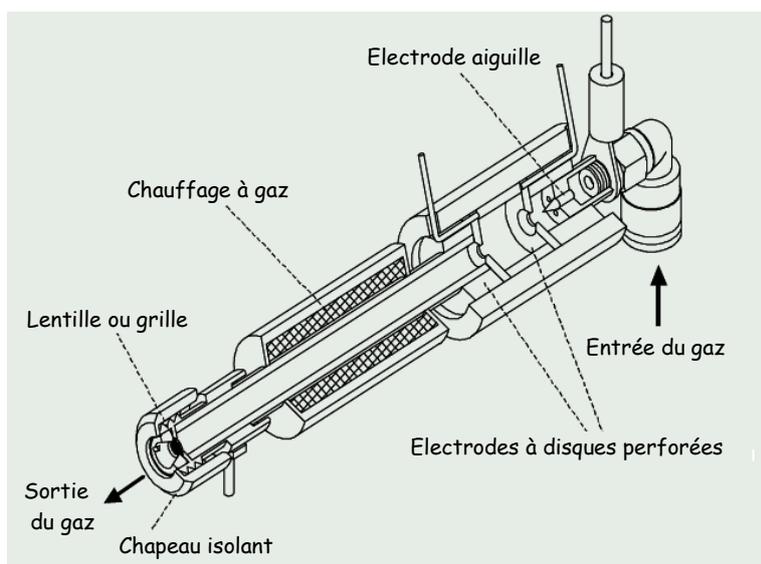


Figure V.1. Vue en coupe de la source d'ionisation « DART » [Cody et al, 2005].

La lentille perforée (ou grille), placée à la sortie de la source, assure plusieurs fonctions :

- * elle empêche les appariements ion-ion et ion-électron,
- * elle est une source d'électrons par ionisation de Penning de surface,
- * elle agit comme une électrode pour faciliter le passage des ions vers le spectromètre de masse.

V.1.2. Mécanismes d'ionisation

L'ionisation de Penning [*Penning, 1927*] implique un transfert d'énergie des atomes de gaz noble excités G^* à l'analyte M ayant un potentiel d'ionisation plus faible que l'énergie interne de G^* . Ceci produit un radical cation moléculaire M^+ et un électron (e^-).



Les gaz nobles peuvent se charger en énergie avec les décharges électriques corona ou avec une décharge luminescente. L'énergie stockée dans ces gaz diminue dans l'ordre suivant $He^* > Ne^* > Ar^* > Kr^*$ [*Hiraoka et al, 2011*].

Avec la source *DART*, le courant d'hélium ou d'azote peut être chargé en énergie et produire un plasma d'électrons, d'ions et d'espèces métastables [*Bridoux et al, 2013*]. C'est généralement l'hélium qui est utilisé en *DART* car c'est le gaz le plus efficace et son état électronique excité (2^3S) a une énergie de 19,8 eV, ce qui est nettement supérieur à l'énergie d'ionisation des autres molécules [*Gross, 2014*].

On commute la polarité de la source d'ion du *DART* entre les modes ion positif et ion négatif par le changement de polarité des électrodes à disque et grille. La polarité de l'aiguille de décharge n'est pas modifiée, de sorte que le plasma ne soit pas interrompu. Ce qui permet une commutation rapide entre les modes positif et négatif.

V.1.2.1. Ionisation positive

Lorsque l'hélium métastable (He^*) sort de la source d'ionisation pour se diriger vers l'atmosphère, il peut interagir avec l'azote, l'oxygène et l'eau, ainsi que n'importe quelle autre molécule gazeuse, incluant la molécule d'analyte M . Les premières ionisations qui se produisent sont :



Ensuite, des réactions successives de transferts de protons conduisent à la formation de clusters d'eau ionisée. Ces derniers participent au mécanisme de formation des ions positifs de la molécule M comme suit :



Il peut aussi y avoir, à partir de $\text{N}_4^{+\cdot}$, $\text{O}_2^{+\cdot}$, NO^+ , un transfert de charges direct aux analytes pour former des ions moléculaires positifs.



V.1.2.2. Ionisation négative

La formation d'ions négatifs se fait par un mécanisme différent. Les électrons sont produits par ionisation Penning d'espèces neutres N_{gaz} dans la phase gazeuse ou par la réaction d'atomes d'hélium excités par une surface, comme l'électrode de sortie N_{surface} (ionisation de Penning de surface).



S'en suit une rapide thermalisation des électrons par collisions avec le gaz, à pression atmosphérique.



L'oxygène atmosphérique capture les électrons initiaux afin de former les ions réactifs $O_2^{\cdot-}$. Ces ions forment des adduits avec l'analyte M, qui peuvent se dissocier pour donner des anions radicalaux.



Le *DART* produit des spectres de masse relativement simples, caractérisés par M^+ et/ou $[M + H]^+$ en mode positif et $M^{\cdot-}$ et/ou $[M-H]^-$ en mode négatif. La fragmentation de certains composés peut être observée en fonction de la nature du gaz et de la température.

V.1.3. Le *DART* et le métabolome humain

Le *DART* est, maintenant, vu comme un outil potentiel pour l'analyse directe et rapide du métabolome dans les mélanges complexes [Jones et al, 2014]. Les échantillons peuvent être analysés sans traitement ou avec un prétraitement minimal [Li, 2014].

Récemment, le sérum humain a été analysé en *DART* afin d'obtenir son empreinte [Zhou et al, 2010] et son profil métabolique [Jones et al, 2014]. En 2013, la source d'ionisation *DART* a été appliquée à la détection et quantification ciblée de la L-phénylalanine pour le diagnostic de la Phénylcétonurie chez le nouveau-né [Wang et al, 2013]. Dans ce cadre, cette méthode a fait preuve de rapidité avec un temps d'analyse de 18 secondes par échantillon.

Ces études démontrent que le *DART* est une technique simple qui peut être appliquée aux analyses de routine sur un grand nombre d'échantillons pendant un temps court.

V.2. INSTRUMENTATION

V.2.1. Introduction de l'échantillon

Des grilles d'acier inoxydable (Ion Sense Inc.) sont utilisées comme surface d'échantillonnage. Les grilles sont fixées sur un rail mobile dont la vitesse de déplacement peut être réglée. Un volume de 5 μ l d'échantillon liquide est déposé sur la grille puis séché. Cette grille en déplacement avec une vitesse de 2,0 mm/s permet l'analyse des échantillons déposés par passage dans le courant du gaz à la sortie de la source d'ions *DART*.

V.2.2. Source d'ions « *DART* »

L'instrumentation utilisée dans cette étude est une source d'ions *DART* type SVP (Ion Sense, Saugus, MA, USA) reliée à un spectromètre de masse hybride constitué

d'une trappe ionique linéaire, couplée à un piège à ions électrostatique (LTQ-Orbitrap XL) de ThermoScientifique, San Jose, CA, USA).

Les paramètres de la source sont :

- Modes positifs et modes négatifs,
- Gaz : Hélium à 99,99% de pureté à 80 psi avec une température variable entre 50 et 500 °C,
- Tension de décharge de l'aiguille à +1,5V,
- Tension de l'électrode-grille à 200V.

L'interface Vapur ® (Ion Sense) est située entre la source d'ions *DART* et le spectromètre de masse. L'orientation de la source *DART* est telle que sa sortie est alignée avec le tube en céramique conduisant les ions à l'interface d'entrée du spectromètre de masse, comme montré sur la figure V.2. En mode transmission, les échantillons placés sur la grille sont chauffés avec le gaz qui passe à travers le support poreux ; ainsi, les analytes sont ionisés.

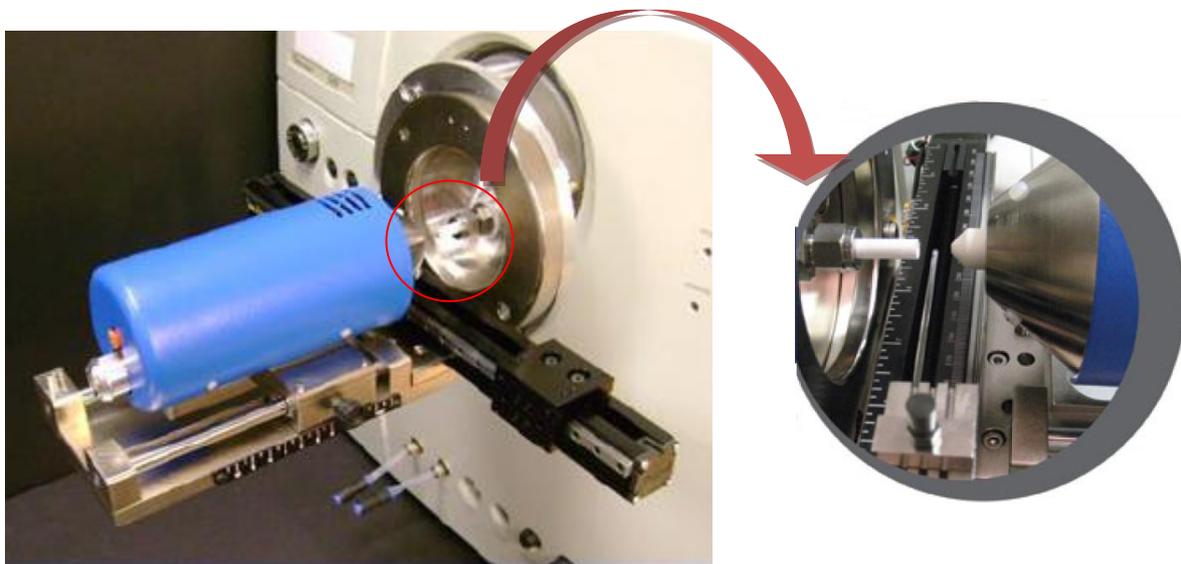


Figure V.2. Source d'ions *DART*- SVP (Ion Sense). Zoom : Orientation de la source vers le spectromètre de masse.

V.2.3. LTQ - Orbitrap XL

L'analyseur est un spectromètre de masse hybride constitué d'une trappe ionique linéaire, couplée à un piège à ions électrostatique (LTQ - Orbitrap XL).

Les paramètres du LTQ - Orbitrap XL sont:

- Capillaire : Tension à 30 V ; température de 200 °C,
- Tube de tension de lentille : 100 V,
- Détecteur de tension réglé à 15 kV,
- Gamme de masse comprise entre 80 et 400 m/z.

La dissociation induite par collision d'ions précurseurs sélectionnés est réalisée dans le piège à ions. Ces ions entrent en collision avec des atomes d'hélium dont l'énergie normalisée de collision est de 30%. La cellule de collision du piège à ions est alimentée avec de l'hélium à 99,999%.

Les analyses des données sont effectuées en utilisant le Logiciel Xcalibur™ (ThermoScientifique).

V.3. DEVELOPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE DIRECTE EN TEMPS REEL « DART »

V.3.1. Echantillons

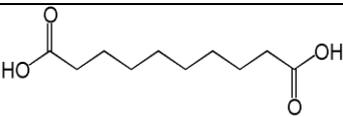
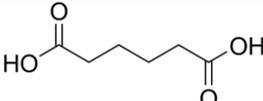
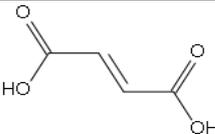
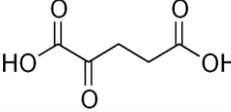
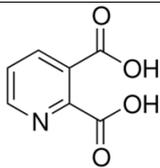
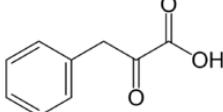
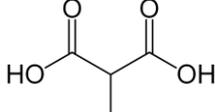
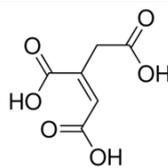
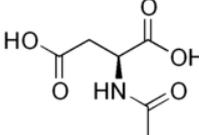
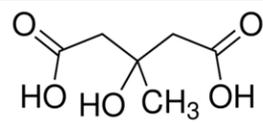
Les acides organiques étudiés au cours du développement de la méthode *DART* ont été choisis en fonction de leur structure chimique. Chaque composé a des caractéristiques structurales différentes et est représentatif de différents groupes d'acides organiques. La plupart de ces composés, présentés dans le tableau V.1, sont considérés comme des biomarqueurs de maladies innées du métabolisme et de troubles neurologiques.

Les standards utilisés (l'acide sébacique, l'acide adipique, l'acide fumarique, l'acide alpha-cétoglutarique, l'acide quinolinique, l'acide phénylpyruvique, l'acide

methyImalonique, l'acide cis-acotinique, l'acide N-acétyl aspartique, L'acide 3-hydroxy-3-methylglutarique) ainsi que les étalons internes (l'acide heptadécanoïque et l'acide 4-phenylbutyrique qui ne sont pas présents dans les urines saines) ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Les échantillons urinaires utilisés proviennent d'enfants sains et d'enfants présentant des troubles neurologiques

Tableau V.1. Liste des composés standards utilisés pour l'analyse DART-MS.

Composé	Structure	Formule	MM
Acide sébacique		$C_{10}H_{18}O_4$	202,2475
Acide adipique		$C_6H_{10}O_4$	146,1412
Acide fumarique		$C_4H_4O_4$	116,0722
Acide 2-cétoglutarique		$C_5H_6O_5$	146,0981
Acide quinolinique		$C_7H_5NO_4$	167.1189
Acide phénylpyruvique		$C_9H_8O_3$	164.1580
Acide méthylmalonique		$C_4H_6O_4$	118.0878
Acide cis-acotinique		$C_6H_6O_6$	174.1082
Acide N-acétylaspartique		$C_6H_9NO_5$	175.1394
Acide 3-hydroxy 3 méthylglutarique		$C_6H_{10}O_5$	162.1406

V.3.2. Détectabilité des acides organiques

Des solutions mères aqueuses à 10mM ont été préparées pour chaque acide excepté pour l'acide phénylpyruvique dont le solvant de dilution était un mélange Méthanol/eau (50/50). A partir de ces solutions, un mélange a été préparé de telle sorte que la concentration en chaque acide soit de 100 $\mu\text{mol/L}$ dans l'eau. Le méthanol n'a pas été choisi comme solvant de dilution pour tous les composés car certains composés comme l'acide sébacique et l'acide adipique peuvent facilement s'estérifier en présence de méthanol.

Les solutions ont été analysées dans les deux modes d'ionisation : positif et négatif. La gamme de balayage a été fixée de 50 à 300 m/z et la température de l'hélium a été portée à 300°C.

Tableau V.2. Détection (D) ou non détection (ND) des métabolites standards en modes négatif et positif.

Composé	M. négatif	M. positif
Ac. sébacique	D	D
Ac. adipique	D	D
Ac. fumarique	D	ND
Ac. 2-cétoglutarique	D	ND
Ac. quinolinique	D	ND
Ac. phénylpyruvique	D	ND
Ac. cis acotinique	D	ND
Ac. N-acétyl aspartique	D	ND
Ac. 3-OH-3-méthylglutarique	D	ND
Ac. méthylmalonique	D	ND

Les résultats, indiqués dans le Tableau V.2, montrent que seulement deux composés ont pu être détectés en mode positif, ce qui veut dire que les composés ne

s'ionisent pas bien avec ce mode. Par contre, les composés répondent tous à l'ionisation en mode négatif. Comme tous les composés ont au moins une fonction acide, la réaction de déprotonation est favorisée.

La température d'un gaz ionisant est souvent un des principaux facteurs qui affectent les résultats expérimentaux. Elle doit donc être optimisée afin d'obtenir un signal intense de l'ion analyte et permettre la détection et l'identification des composés ciblés.

L'impact de la température de l'hélium a été étudié individuellement sur chaque composé. Des températures croissantes, allant de : 50 à 500°C avec des incréments de 50°C. La figure V.3 montre que les composés exposés aux différentes températures s'ionisent variablement. Ce comportement est probablement dû aux propriétés physicochimiques particulières de chaque type de composés : polarité, point isoélectrique, température d'ébullition. A faibles températures (entre 50 et 200°C) les composés, comme l'acide quinolinique, l'acide N-acétylaspartique et l'acide 3-OH-3-méthylglutarique, ne sont pas ionisés efficacement. A températures très élevées (au-delà de 400°C), l'intensité du signal, pour certains composés, diminue. Cet effet peut être dû à une thermo-dégradation du composé avant qu'il puisse atteindre le spectromètre de masse.

Il faut donc déterminer une gamme de température où l'ionisation de la plupart des analytes est satisfaisante. L'intervalle de température compris entre 200°C et 300°C semble être le mieux.

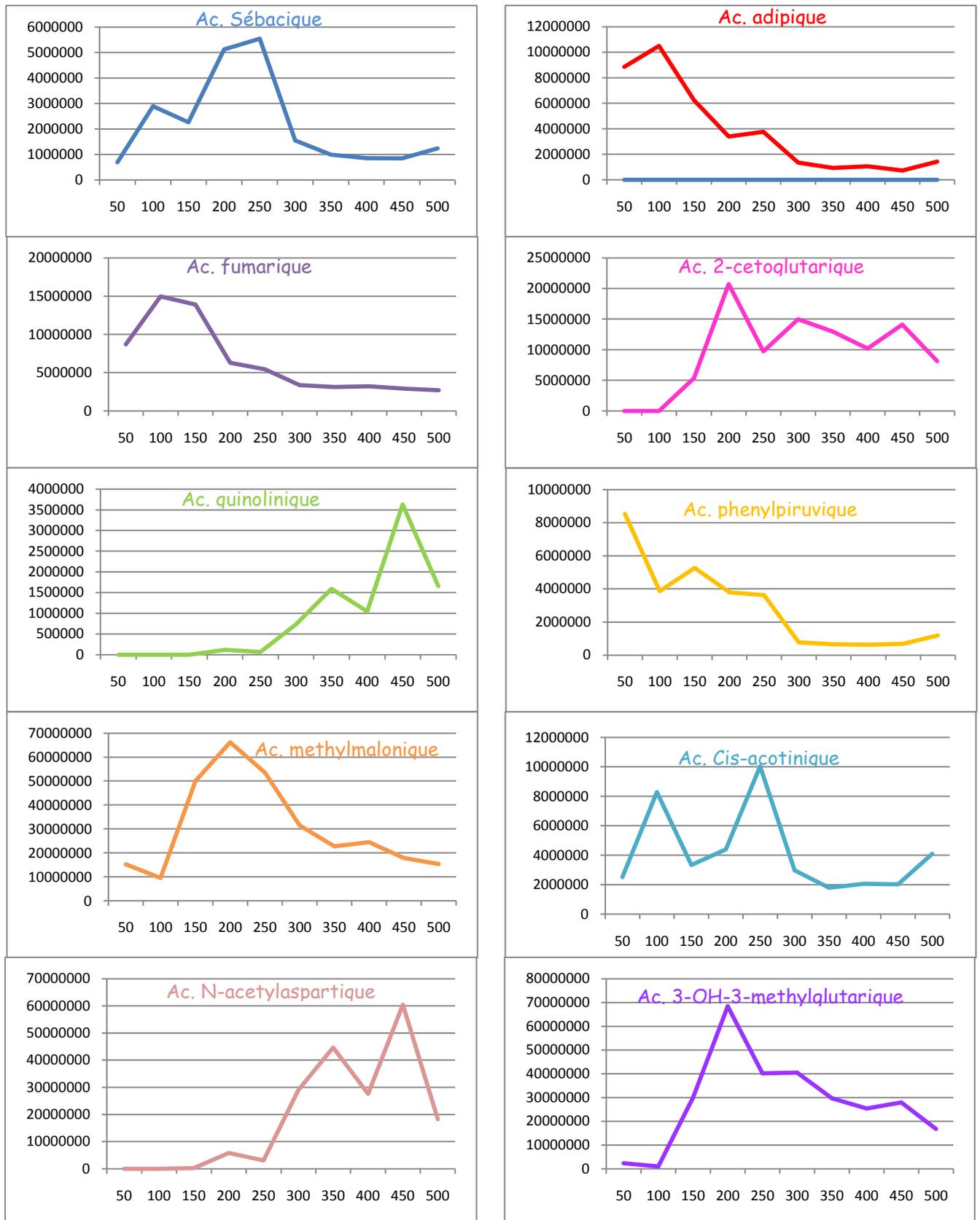


Figure V.3. Influence de la température de l'hélium sur le signal des composés étudiés (Intensité/Température)

V.3.3. Application aux échantillons urinaires d'enfants

V.3.3.1. Approche qualitative

Après l'optimisation de la température pour l'ionisation de l'hélium et choix du mode d'ionisation, nous avons passé à l'analyse directe d'échantillons urinaires d'enfants.

L'urine est décongelée à température ambiante pendant quelques minutes puis centrifugée à 4000 tours par minutes pendant 5 minutes. Ensuite elle est diluée afin d'obtenir une solution correspondant à 1mmol de créatinine (généralement 200 μ L d'urine dans 800 μ L d'eau).

Des échantillons urinaires de deux enfants sains et deux enfants ayant des troubles neurologiques sont analysés directement en « DART ». La figure V.4 montre le spectre de masse global obtenu par analyse directe de l'échantillon urinaire d'un enfant sain où les valeurs de m/z des ions moléculaires $[M-H]^-$ de chacun des métabolites apparaissent. La figure V.5 illustre la détection de l'acide N-acétylaspartique ($[M-H]^- = 174$) et l'acide cis-acotinique ($[M-H]^- = 173$).

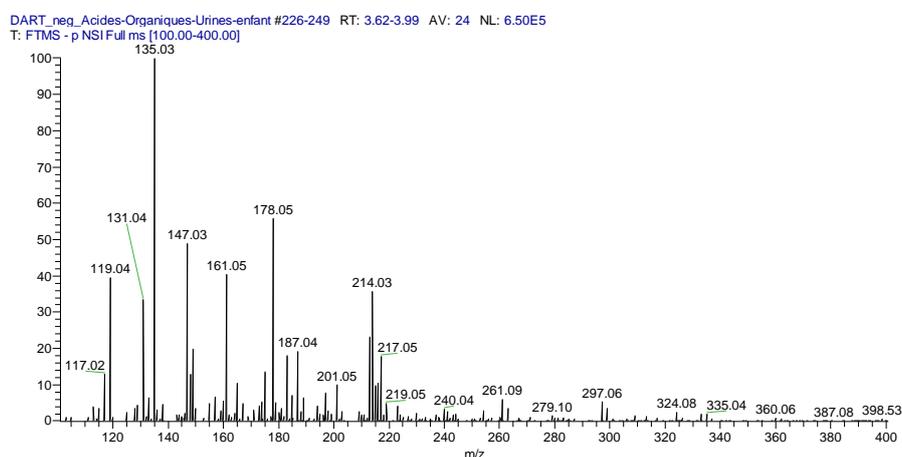


Figure V.4. Spectre de masse DART-MS d'un échantillon urinaire.

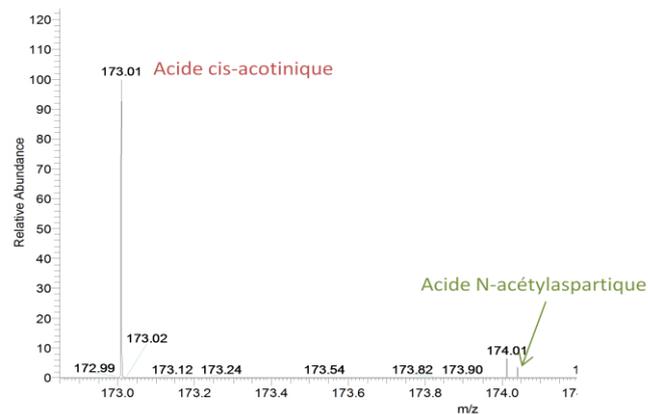


Figure V.5. Extrait de spectre de masse DART-MS d'un échantillon urinaire: détection de l'acide cis-acotinique (ion 173.01) et l'acide N-acétylaspartique (ion 174.04).

Les métabolites figurant dans le tableau V.1 ont été repérés dans l'urine des 4 enfants (Figure V.6) mais dans des proportions différentes. La figure V.6 montre que l'intensité du signal pour l'acide 3-OH-3-méthylglutarique est importante dans tous les échantillons. Cette réponse est en accord avec ce qui est observé dans l'étude précédente (étude de l'influence de la température de l'hélium) qui montre qu'avec une température de 300°C, ce composé s'ionise bien.

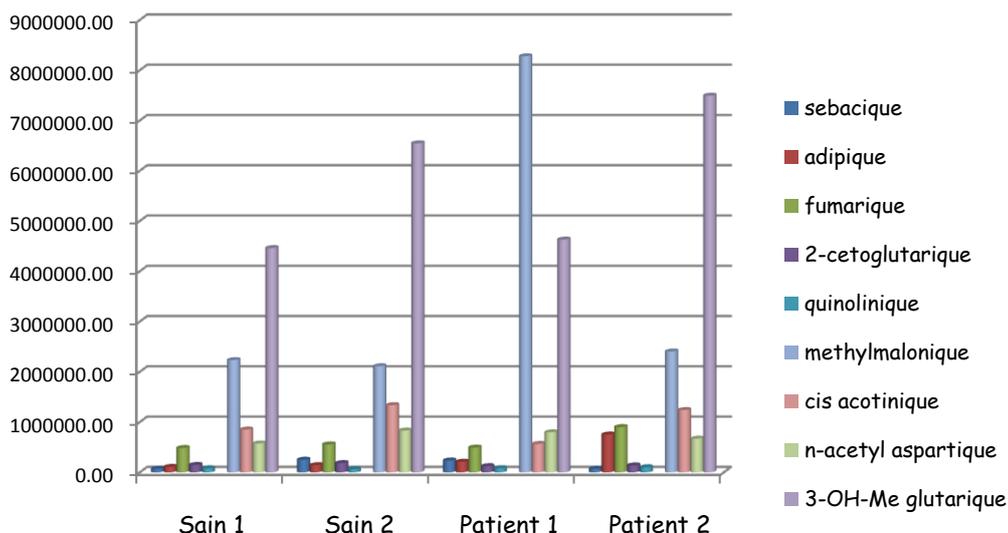


Figure V.6. Détection des 10 composés étudiés dans les urines des enfants sains et des enfants avec des troubles neurologiques.

V.3.3.2. Approche quantitative

Dans la perspective d'une quantification, une urine correspondant à un enfant sain a été dopée avec respectivement 25, 50, 100, 500 et 1000 $\mu\text{mol/L}$ de mélange de standards. Les résultats obtenus pour les concentrations croissantes en acide sont représentés sur la figure V.7. Il y apparaît que les intensités des signaux ne répondent pas proportionnellement à l'augmentation de la concentration. Ces résultats mettent en évidence un problème d'ionisation des composés ; probablement dus à des interférences ioniques et des suppressions ioniques de signaux.

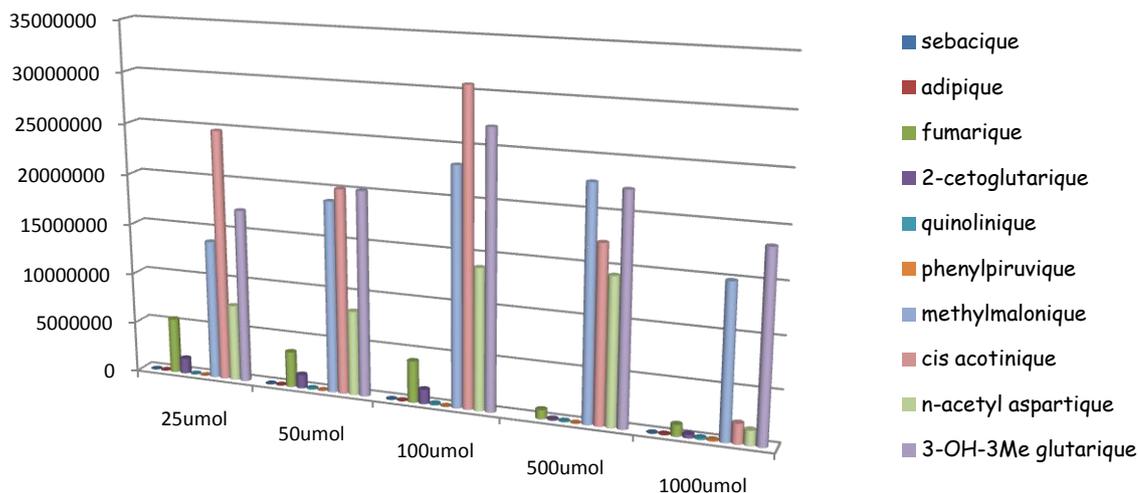


Figure V.7. Essais de quantification sur une urine dopée.

Suite aux résultats obtenus, l'influence du pH du milieu sur l'ionisation des composés a été étudiée. Pour cela, des solutions des composés standards, pris isolément, ont été préparées à 100 $\mu\text{mol/L}$ dans l'eau d'une part en milieu acide (pH=1) et d'autre part en milieu basique (pH=8). L'acide trifluoroacétique a servi à l'acidification du milieu et la triéthylamine à l'alcalinisation jusqu'à pH=8. Ils ont été choisis du fait de leur bonne volatilité qui limite les risques d'interférence.

La quantification avec le « *DART* » peut présenter des problèmes de fluctuations. La littérature signale que l'utilisation d'un étalonnage externe est peu envisageable [Hajslova et al, 2011]. Pour cela, il est recommandé que la normalisation des réponses des analytes soit basée sur celle d'un étalon interne. L'acide 4-phénylbutyrique est introduit comme étalon interne.

La figure V.8 montre les réponses obtenues, par groupes, pour les différents acides organiques introduits.

- G1 : acides sébacique, adipique et phénylpyruvique
- G2 : acides fumarique, cétooglutarique et quinolinique
- G3 : acides méthylmalonique, cis-acotinique et méthylglutarique
- G4 : acides, N-acétylaspartique et 4-phénylpyruvique

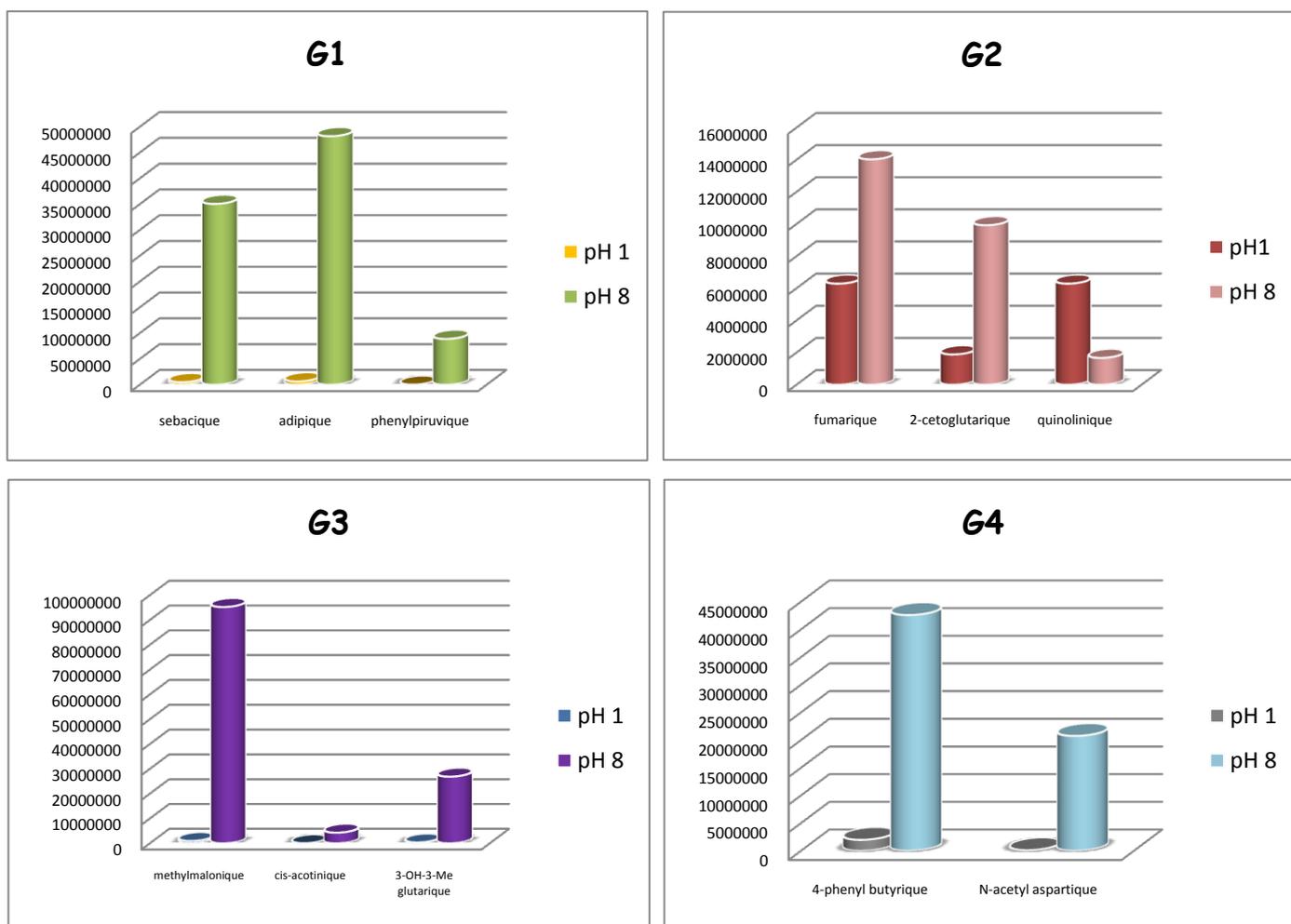


Figure V.8. Intensité des composés analysés en solution à pH=1 et à pH=8.

D'après les résultats de la Figure V.8, tous les composés étudiés répondent mieux quand ils se trouvent à pH 8, excepté l'acide quinolinique.

Après optimisation de l'ionisation des composés, l'élaboration d'une courbe d'étalonnage a été entreprise. Pour cela, des mélanges contenant tous les composés à différentes concentrations (30, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$) ont été préparés dans l'eau et menés à pH de l'ordre de 8.

Pour tous les composés étudiés, les résultats montrent que l'intensité du signal augmente avec la concentration (Fig. V.9). Ces résultats montrent que le pH du milieu

est un facteur important à prendre en compte pour optimiser l'ionisation des composés et ainsi obtenir des réponses proportionnelles aux quantités introduites.

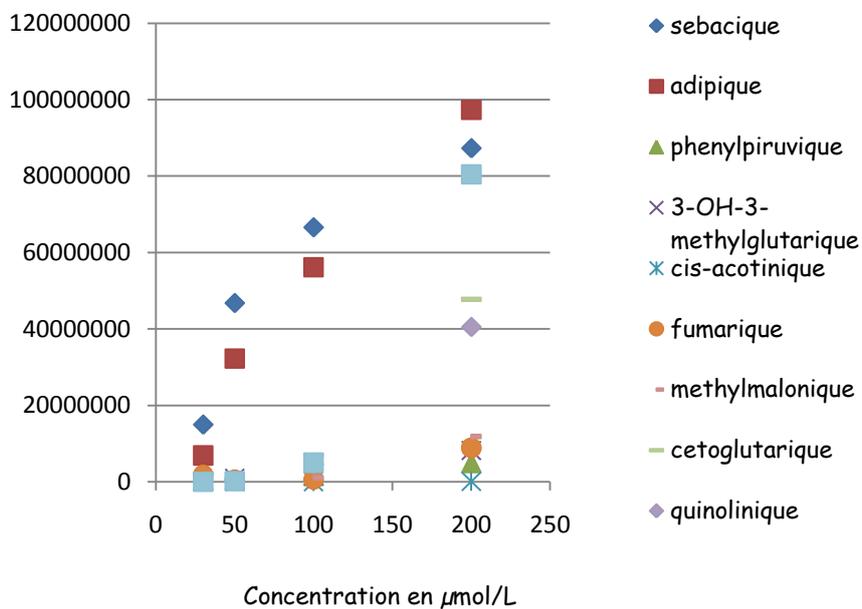


Figure V.9. Intensité du signal par rapport à la concentration des composés standards.

La relation entre concentration et intensité n'étant pas linéaire pour tous les composés, des investigations se poursuivent dans ce sens.

CONCLUSION

Les paramètres de température d'hélium (200°C - 300°C), de mode d'ionisation (négatif) et de pH du milieu (pH=8) ont été étudiés pour optimiser l'ionisation et donc améliorer le signal des métabolites étudiés.

L'analyse directe en temps réel par spectrométrie de masse « *DART-MS* » a démontré qu'elle était un outil de détection de métabolites rapide.

L'analyse directe en temps réel de l'urine permet de s'affranchir de ou de réduire certaines étapes de préparation d'échantillon, ainsi les résultats sont obtenus plus rapidement qu'avec la chromatographie en phase gazeuse.

L'optimisation de la méthode « *DART-MS* » est primordiale pour la détection de biomarqueurs de maladies neurologiques dans le milieu urinaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bridoux M.C, Machuron-Mandard X. Capabilities and limitations of direct analysis in real time orbitrap mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the analysis of synthetic and natural polymers. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2013, 27, 2057-2070.

Caroll D.I, Dzidic I, Stillwell R.N, Haegele K.D, Horning E.C. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatography-mass spectrometer computer analytical system. *Anal. Chem.* 1975, 47, 2369-2372.

Chernetsova E.S, Morlock G.E, Revelsky I.A. DART mass spectrometry and its applications in chemical analysis. *Rus. Chem. Rev.* 2011, 80, 235-255.

Cody R.B, Laramme J.A, Durst H.D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* 2005, 77, 2297-2302.

Gross J.H. Direct analysis in real time - a critical review on DART-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 63-80.

Hiraoka K, Ninomiya S, Chen L.C, Iwama T, Mandal M.K, Suzuki H, Ariyada O, Furuya H, Takekawa K. Development of double cylindrical dielectric barrier discharge ion source. *Analyst.* 2011, 136, 1210-1215.

Jeckelman N, Haefliger O.P. Release kinetics of actives from chewing gums into saliva monitored by direct analysis in real time spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, 24, 1165-1171.

Jones C.M, Monge M.E, Fernández F.M. Metabolite profiling by direct analysis in real time Mass spectrometry. *Mass Spectrometry in Metabolomic. Methods in Molecular Biology.* 2014, 1198, 275-289.

Li X, Hou G, Xing J, Song F, Z, S. Direct analysis in real time - mass spectrometry for the rapid detection of metabolites of aconite alkaloids in intestinal bacteria. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2014, 25, 2181-2184.

Navare A.T, Mayoral J.G, Nouzova M, Noriega F.G, Fernandez F.M. Direct rapid analysis in real time (DART) mass spectrometric detection of juvenile hormone III and its terpene precursors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 3005-3013.

Penning F.M. Über ionization durch metastabile atome. *Naturwissenschaften.* 1927, 15, 818.

Rummel J.L, McKenna A.M, Marshall A.G, Eyler J.R. Powell. The coupling of direct analysis in real time ionization to fourier transform ion cyclotron resonance mass

spectrometry for ultrahigh-resolution mass analysis. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2010, 24, 784-790.

Steiner R.R, Larson R.I. Validation of direct analysis in real time source for use in forensic drug screening. *J. Forensic Sci.* 2009, 54, 617-622.

Vaclavik I, Zachariasova M, Hrbek V, Hajslova J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta.* 2010, 82, 1950-1957.

Wang Ch, Zhu H, Cai Z, Song F, Liu Z, Liu S. Newborn screening of phenylketonuria using direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 3159-3164.

Yan B, Chen T, Xu Z, Qu H. Rapid process development of chromatographic process using direct analysis in real time mass spectrometry as a process analytical technology tool. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 94, 106-110.

Zhou M.S, Guan W, Walker R, Mezencev R, Benigno B.B, Gray A., Fernandez F.M, McDonald J.F. Rapid mass spectrometric metabolic profiling of blood sera detects ovarian cancer with high accuracy. *Cancer Epidemiol. Biomar. Prev.* 2010, 19, 2262-2271.

Zhou M, McDonald J.F, Fernández F. Optimisation of a Direct Analysis in Real Time / Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Serum Metabolic fingerprinting. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 68-75.



**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

L'objectif principal de ce travail a été d'évaluer la technique de *GCxGC-MS* pour le profilage métabolique qualitatif et quantitatif des urines d'enfants avec, pour perspectives, la découverte de nouveaux candidats biomarqueurs d'erreurs métaboliques associés à des troubles neurologiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au protocole de préparation des échantillons. Ainsi, nous avons amélioré la méthode en introduisant une étape enzymatique d'élimination de l'urée qui empêchait la visualisation et la détection complète des composés d'intérêt. Puis, grâce à l'étude systématique des différentes conditions de séparation en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (*GCxGC*) couplée à un spectromètre de masse simple quadripolaire, nous avons développé une méthode nettement plus sensible et avec une plus grande capacité de pics par rapport à la méthode classique par *GC-MS*. La méthode par *GCxGC-MS* ainsi développée a été aussitôt appliquée à l'étude de la stabilité des composés. Dans un second temps, nous avons évalué l'apport de la *GCxGC-MS* dans le profilage des composés organiques urinaires présents dans des échantillons urinaires prélevés chez des volontaires sains. Par rapport aux profils obtenus en *GC-MS* classique, les profils chromatographiques urinaires effectués par la méthode proposée ont effectivement présenté une sensibilité et une résolution nettement plus élevées, ce qui a permis la détection d'un maximum de 92 composés supplémentaires par échantillon analysé individuellement. Cela nous a mené à faire un profilage d'un mélange de plusieurs urines d'enfants sains où nous avons pu détecter 231 molécules silylées.

Parmi les composés supplémentaires détectés et caractérisés, certains sont d'un intérêt diagnostique. Grâce à la *GCxGC-MS*, nous avons pu détecter, par

exemple, de l'acide quinolinique chez un individu présentant des symptômes neurologiques, cet acide n'a pas été détecté avec la méthode *GC-MS* classique.

L'acide quinolinique est impliqué dans les réponses inflammatoires et apoptotiques associées à des lésions neuronales. Les essais préliminaires de quantification de ce composé ont montré, néanmoins, qu'il fallait modifier le protocole de préparation de l'échantillon. Ceci souligne un point de difficulté inhérent à l'utilisation d'une technique séparative très performante dans l'analyse de milieux complexes. En effet, la *GCxGC-MS* étant capable de séparer des composés dans une large gamme de polarité, il devient nécessaire d'adapter la méthode de préparation de l'échantillon, afin d'obtenir un rendement d'extraction suffisant pour la sensibilité et la précision de la méthode de dosage.

Ces considérations nous ont conduits à développer un nouveau protocole d'extraction approprié, permettant d'atteindre des rendements d'extraction d'environ 90%. A titre d'exemple, la méthode usuelle d'extraction des acides organiques urinaires ne peut extraire que 20% environ de la quantité d'acide quinolinique ajoutée dans le milieu.

Appliquée à des échantillons urinaires recueillis d'une part chez des enfants sains et d'autre part chez des enfants présentant des troubles neurologiques, la méthode de profilage proposée a montré des résultats qualitatifs et quantitatifs nettement supérieurs à ceux obtenus par la méthode classique par simple *GC-MS*. L'ensemble des résultats obtenus montre toutes les potentialités de la *GCxGC-MS* dans le domaine de la découverte de candidats biomarqueurs, malgré les contraintes liées à l'étape de préparation de l'échantillon. En effet, si les techniques séparatives bidimensionnelles sont d'une puissance inégalée pour séparer les composés présents dans un mélange

complexe, l'étape de préparation des échantillons n'en demeure pas moins essentielle pour quantifier de manière précise les substances détectées.

Par ailleurs, la masse de données contenues dans le chromatogramme nécessite l'utilisation d'outils de traitement appropriés. Ceci nous a amené à développer des collaborations, notamment avec une équipe spécialisée dans le traitement de données. Un programme de comparaison de profils obtenus en GCxGC-MS en cours d'élaboration a été appliqué. Cela devrait nous permettre de repérer plus rapidement et plus efficacement les candidats biomarqueurs présents dans les échantillons urinaires.

Enfin, pour s'affranchir de l'étape de dérivation lors de la préparation d'échantillon, nous avons mené une étude sur l'analyse directe en temps réel couplée à la spectrométrie de masses (DART-MS) des acides organiques urinaires. Ces essais effectués à la Direction des Applications Militaires (DAM) du CEA et axés sur la détection d'un panel d'acides organiques représentatifs de métabolites fonctionnalisés présents dans les urines se sont révélés très prometteurs. Malgré les effets de suppression ionique mis en évidence lors de l'utilisation de cette technique, sa capacité à détecter et quantifier des métabolites urinaires ciblés tels que les acides organiques est évidente. Les résultats obtenus montrent que cette approche mérite d'être approfondie dans les plus brefs délais.

Les perspectives engendrées par ce travail sont évidentes, il s'agit de :

1. Poursuivre l'identification des composés supplémentaires détectés dans les échantillons urinaires étudiés, particulièrement ceux qui ne sont pas répertoriés dans les bases de données disponibles,

2. Appliquer la méthode GCxGC-MS ainsi développée à un plus grand nombre de cas sains et pathologiques,
3. Valider la nouvelle méthode d'analyse directe en temps réel des acides organiques en utilisant le système d'ionisation DART permettant de simplifier l'étape de préparation d'échantillon.

ANNEXES

Tableau I.1. Classification des principaux acides organiques

CLASIFICACION DES ACIDES ORGANIQUES	Exemples
ACIDES MONOCARBOXYLIQUES	
1. Acides gras saturés : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$	
- De C_1 à C_5 : ac. gras volatils	Acide propionique (C_3)
- De C_6 à C_{12} : ac. gras à chaîne moyenne	Acide octanoïque (C_8)
- $< \text{C}_{12}$: ac. gras à chaîne longue	Acide palmitique (C_{16})
2. Acides gras insaturés	
3. Dérivés hydroxylés	Acide lactique Acide 3-hydroxybutyrique
4. Dérivés cétoniques	Acide acétoacétique Acide 2-cetocaproïque
ACIDES DICARBOXYLIQUES	
1. Saturés de C_2 à C_{16} : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$	Acide oxalique (C_2) Acide malonique (C_3) Acide succinique (C_4) Acide glutarique (C_5) Acide adipique (C_6) Acide subérique (C_8) Acide sébacique (C_{10}) Acide dodécanoïque (C_{12})
2. Insaturés : $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	Acide fumarique
3. Dérivés hydroxylés	Acide hydroxyglutarique Acide 3-hydroxysébacique
4. Dérivés cétoniques	Acide 2-cétoglutarique Acide 2-cétoadipique
ACIDES TRICARBOXYLIQUES	Acide citrique
POLYHYDROXYLÉS	Acide méthylcitrique
ACIDES PHENOLIQUES	Acide benzoïque Acide phénylacétique Acide phénylpropionique Acide phényllactique

	Acide phénylpiruvique Acide 4-hydroxyphényllactique Ac. 4-hydroxyphénylpiruvique
ACIDES ORGANIQUES DIVERSES	
1. Soufres	Acide thiodiglycollique Acide thenoique
2. Pyrimidiques	Acide nicotinique
3. Imidazoliques	Acide imidazole lactique Acide imidazole piruvique
4. Pyrrolidines	Acide pyroglutamique
5. Furanes	Furan 2,5-dicarboxylique
ACIDES ORGANIQUES CONJUGUES AUX ACIDES AMINES	
1. À la glycine	Benzoylglycine Isovalerylglycine Propionylglycine Tiglylglycine Hexanoylglycine Suberylglycine
2. À l'alanine	Benzoylalanine Isovalerylalanine
3. À l'acide glutamique, à la glutamine	Phenylacetylglutamine
ACIDES AMINES ACÉTYLÉS	
	N-acetyltyrosine N-acetylaspartique

Annexe I.2. Aciduries organiques et les métabolites associés

DESORDRES	NOM DE LA MALADIE	METABOLITES
DESORDRES DU METABOLISME D'AMINO ACIDES AROMATIQUES	Phénylcétonurie	Acide phenylpiruvique Acide phenyllactique Acide 2-hydroxyphenylacetique
	Tyrosinemia	A. Formes transitoires neonatales, oculocutaneuses et hépato-rénales Acide 4-hydroxyphenylpiruvique Acide 4-hydroxyphenyllactique Acide 4-hydroxyphenylacetique N-acetyltyrosine B. Forme hépato-rénale Succinylacetone
	Hawkinsinuria	Acide 4-hydroxycyclohexylacetique 5-oxoproline Acide 4-hydroxyphénylpyruvique Acide 4-hydroxyphenyllactique
	Alcaptonurie	Acide homogentisique
DESORDRES DU METABOLISME D'AMINOACIDES À CHAÎNE RAMIFIÉE	Maladie de sirop d'érable	Acide 2-oxoisocaproïque Acide 2-oxo-3-méthylvalérique Acide 2-oxoisovalérique Acide 2-hydroxyisovalérique Acide 2-hydroxyisocaproïque Acide 2-hydroxy-3-méthylvalérique
	Déficiencia de dihydrolipoyldeshidrogenase (E3)	Acide lactique Acide 2-oxoglutarique Acide 2-oxoisocaproïque Acide 2-oxo-3-méthylvalérique Acide 2-oxoisovalérique Acide 2-hydroxyisovalérique

	Acide 2-hydroxyisocaproïque Acide 2-hydroxy-3-methylvalérique
Acidémie isovalérique	Isovalérylglycine Acide 3-hydroxyisovalérique Acide 4-hydroxyisovalérique
Déficience 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	Acide 3-hydroxyisovalérique Acide 3-methylcrotonylglycine
Déficience de carboxylase multiple biotine-insensible	A. Déficience d'holocarboxylase synthetase Acide 3-hydroxyisovalérique Acide 3-methylcrotonylglycine Acide methylcitrique Acide 3-hydroxypropionique Acide lactique B. Déficience de biotinidase Tous les métabolites sont impliqués mais généralement avec de faibles augmentations.
Acidurie 3-methylglutaconique	A. Déficience de 3-methylglutaconyl-CoA hydratase Acide 3-methylglutaconique Acide 3-hydroxyisovalérique Acide 3-methylglutarique B. Hydratase normale Acide 3-methylglutaconique Acide 3-methylglutarique
Acidurie 3-hydroxy-3-méthylglutarique	Acide 3-hydroxy-3-methylglutarique Acide 3-methylglutaconique Acide 3-methylglutarique Acide 3-hydroxyisovalérique Acide 3-methylcrotonylglycine

Déficiences de l'oxothiolase

A. Déficiences mitochondriales de chaîne ramifiée 3-oxothiolase

Acide 2-méthyl-3-hydroxybutyrique

Acide 2-méthylacétoacétique

Tyrosylglycine

B. Déficiences cytosoliques 3-oxothiolase ou succinyl-CoA transférase

Acide 3-hydroxybutyrique

Acide acétoacétique

Acidémie propionique

Acide méthylcitrique

Acide 3-hydroxypropionique

Propionylglycine

Acide 3-hydroxyvalérique

Acidémie méthylmalonique

Acide méthylmalonique

Autres métabolites de l'acidémie propionique

Déficiences malonyl-CoA décarboxylase

Acide malonique

Acide méthylmalonique

DESORDRES DU METABOLISME DES AMINOACIDES DIBASIQUES

Acidurie 2-Oxoadipique

Acide 2-oxoadipique

Acide 2-hydroxadipique

Acidurie glutarique type I

Acide glutarique

Acide 3-hydroxyglutarique

Acide glutaconique

Acide orotique

Syndrome Hyperornithinémie - Hyperammonémie - Homocitrullinurie (HHH)

Intolérance à la protéine Lysinurique

Acide orotique

DESORDRES DU CYCLE DE L'URÉE	Déficience d'ornithine carbamoyltransferase et citrullinémie	Acide orotique Uracile
	Argininemia	Acide orotique
DESORDRES DU METABOLISME DE LA PYRIDINE	Acidurie orotique	Acide orotique
	Déficience de dihydropyrimidine déshydrogénase	Uracile Thymine
DESORDRES DE L'OXYDATION DES ACIDES GRAS	Déficience de long chaîne acyl-CoA déshydrogénase	Acide subérique Acide sébacique
	Déficience chaîne moyenne acyl-CoA déshydrogénase	Acide octanoïque Acide 5-hydroxyhexanoïque Acide 7-hydroxyoctanoïque Acide adipique Acide subérique Acide octènedioïque Acide sébacique Acide décenedioïque Hexanoylglycine Phenylpropionylglycine Suberylglycine
	Déficience court chaîne acyl-CoA déshydrogénase	Acide éthylmalonique Acide méthylsuccinique Acides dicarboxyliques - variablement augmentés
	Déficience multiple Acyl-CoA déshydrogénase (acidurie glutarique type II)	Acide glutarique Acide éthylmalonique Acide adipique Acide subérique Acide 2-hydroxyglutarique Isovalerylglycine

Isobutyrylglycine
Acide 2-méthylbutyrylglycine

**AUTRES
DESORDRES**

Acidurie 4-hydroxybutyrique	Acide 4-hydroxybutyrique Acide 3,4-dihydroxybutyrique
Déficiences de fumarase	Acide fumarique
Acidurie mévalonique	Mévalonolactone Acide mévalonique
5-oxoprolinurie	5-oxoproline
Maladie de canavan	Acide N-acétylaspartique
Acidurie D-glycérique	Acide D-glycérique
Hyperoxaluria type I	Acide oxalique Acide glycolique Acide glyoxylique
Hyperoxaluria type II	Acide oxalique Acide L-glycérique
Glyceroluria	Glycérol
Acidoses lactique	Acide lactique Acide pyruvique Acide 2-hydroxybutyrique Acide 4-phényllactique
Prolifération bactérienne intestinale	Acide D-lactique Acide 3-hydroxypropionique Acide 4-hydroxyphényllactique
Cétoses	Acide 3-hydroxybutyrique Acide acétoacétique Acide 3-hydroxyisobutyrique

Acide 3-hydroxyvalérique
Acide 3-hydroxy-2-méthylbutyrique
Acide adipique
Acide subérique



**LISTE DES
ILLUSTRATIONS**

LISTE DE FIGURES

Figure I.1. Schéma de transmission autosomique récessif des aciduries organiques

Figure I.2. Cycle métabolique du Krebs ou cycle de l'acide citrique. Exemples de blocages dans les voies métaboliques dues à une déficience enzymatique, produisant une accumulation du produit intermédiaire.

Figure I.3. Quelques structures des acides organiques

Figure II.1. Système de chromatographie en phase gazeuse (GC)

Figure II.2. Schéma du quadripôle

Figure II.3. Exemple de chromatogramme des acides organiques obtenu avec la méthode de GC-MS.

Figure II.4. Principe de la GCxGC.

Figure II.5. Représentation schématique du système de chromatographie gazeuse bidimensionnelle

Figure II.6. Modulation cryogénique à deux jets de CO₂

Figure II.7. Organisation des composés, regroupés par le nombre de carbones, sur le chromatogramme en 2D

Figure III.1. Schéma du protocole extraction et de dérivation des acides organiques utilisé dans l'étude

Figure IV.1. Chromatogramme en GC-MS des acides organiques

Figure VI.2. Variation de l'ordre d'éluion de l'acide fumarique/acide malique, suite au transfert des méthodes.

Figure IV.3. Extraits de chromatogrammes : a) acide oxalique détecté avec 1 colonne b) acide oxalique non détecté en couplage de colonnes

Figure IV.4. Extraits (de t=13min à t=18min) des chromatogrammes bruts d'une matrice urinaire obtenus avec des périodes de modulation de 4, 6, 7, 8 et 9 secondes.

Figure IV.5. Chromatogramme en « color plot » obtenue avec le jeu de colonnes DB-5/TRWAX-MS. (Fréquence d'acquisition 5Hz).

Figure IV.6. Chromatogramme en « color plot » obtenu avec le jeu de colonnes DB-5/BPX50. (Fréquence d'acquisition 5Hz).

Figure IV.7. Chromatogramme en « color plot » des jeux de colonnes : DB5/BPX50 (IV.7a) et BPX50/TR5MS (IV.7b).

Figure IV.8. Chromatogrammes en « color plot » obtenu d'un échantillon urinaire analysé avec les colonnes DB5/BPX50, avant (a) et après (b) introduction du protocole d'élimination de l'urée par réaction avec 100U d'uréase pendant 15 minutes

Figure IV.9. Cinétique d'élimination de l'urée dans l'échantillon urinaire contenant 582,8 $\mu\text{mol/ml}$ d'urée avec 100U d'uréase de *Canavalia ensiformis*, type IX à pH=8 et 25°C.

Figure IV.10. Chromatogramme en contour plot obtenue avec une vitesse d'acquisition équivalent à 10Hz.

Figure IV.11. Extraits de chromatogrammes bruts en GCxGC-MS d'un échantillon silylé se dégradant pendant 5 semaines.

Figure IV.12. Comparaison des chromatogrammes bruts obtenus avec un même échantillon urinaire en: a) GC-MS et b) GCxGC-MS

Figure IV.13. Zoom du chromatogramme en « color plot » obtenue d'un échantillon urinaire provenant d'un enfant sain.

Figure IV.14. Zoom du chromatogramme en « color plot » ($t_r=7-8\text{min}$) montrant la séparation de deux composés : L'acide lactique est l'acide α -hydroxyisobutyrique.

Figure IV.15. Extraits de chromatogrammes bruts des acides lactique et α -hydroxyisobutyrique a) co-élus dans un seul pic en GC-MS ($t_r=6,6\text{min}$) et b) séparés et fractionnés à cause de la modulation.

Figure IV.16 Spectres de masse de l'acide N-acétylaspartique di et tri-TMS

Figure IV.17. Rendements d'extraction de 5 métabolites urinaires d'intérêt suivant la méthode employée.

Figure IV.18. Courbes d'étalonnage des composés : l'acide méthylmalonique, l'acide 3-OH-3-méthylglutaryque, l'acide phenylpyruvique, l'acide quinolinique.

Figure IV.19. Voie métabolique de la kynurenine

Figure IV.20. Détection de l'acide QUIN en GC-MS and GCxGC-MS (ex: un des pics modulés, t_r : 39,24)

Figure IV.21. Comparaison du pouvoir d'extraction avec une et deux étapes dans 12 échantillons

Figure IV.22. Représentation graphique et comparaison de chromatogrammes d'un enfant sain (bas) et d'un enfant malade (haut) avec le logiciel LC-GC Concordance

Figure IV.23. Première page du rapport pour la comparaison de deux chromatogrammes

Figure IV.24. ACP des groupes de données normalisées

Figure IV.25. Exemple de pixel discriminant associé à un composé surreprésenté chez les enfants avec des troubles neurologiques (rouge) en comparaison aux profils des enfants sains (vert).

Figure V.1. Vue en coupe de la source d'ionisation « DART »

Figure V.2. Source d'ions DART- SVP (Ion Sense). Zoom : Orientation de la source vers le spectromètre de masse

Figure V.3. Influence de la température de l'hélium sur le signal des composés étudiés

Figure V.4. Spectre de masse *DART-MS* d'un échantillon urinaire.

Figure V.5. Extrait de spectre de masse *DART-MS* d'un échantillon urinaire: détection de l'acide cis-acotinique (ion 173.01) et l'acide N-acétylaspartique (ion 174.04).

Figure V.6. Détection des 10 composés étudiés dans les urines des enfants sains et des enfants avec des troubles neurologiques.

Figure V.7. Essais de quantification sur une urine dopée.

Figure V.8. Intensité des composés analysés en solution à pH=1 et à pH=8.

Figure V.9. Intensité du signal par rapport à la concentration des composés standards

TABLEAUX

Tableau I.1. Troubles métaboliques en acidémies organiques causés par un catabolisme anormal d'acides aminés

Tableau II.1. Différents types de modulateur de chromatographie gazeuse bidimensionnelle

Tableau III.1. Combinaison de colonnes utilisées dans la GCxGC-MS

Tableau IV.1. Couple de colonnes A

Tableau IV.2. Comparaison des acides organiques détectés en GC-MS et GCxGC-MS sans modulation

Tableau VI.3. Elution des composés sur une combinaison de colonnes DB-5/TRWAX-MS en fonction de la programmation de température choisie

Tableau VI.4. Concentration en urée d'échantillons urinaires correspondant à des enfants sains (S) et à des patients possédant des troubles neurologiques (P).

Tableau VI.5. Nombre de composés détectés dans les urines d'enfants sains avec les méthodes GC-MS et GCxGC-MS.

Tableau IV.6. Composés identifiés par GCxGC-MS dans un mélange contenant les urines provenant d'enfants sains, détectés (D) ou non (ND) en GC-MS.

Tableau IV.7. Linéarité de l'acide méthylmalonique, l'acide 3-OH-3-méthylglutaryque, l'acide phénylpyruvique, l'acide quinolinique sur 4 jours.

Tableau IV.8. Fidélité intermédiaire de la méthode GCxGC-MS sur les 5 acides organiques.

Tableau IV.9. Valeurs de LOD, de LOQ et de RE des 5 métabolites

Tableau IV.10. Concentrations d'acide quinolinique dans les échantillons urinaires des enfants sains (S) et des enfants avec des troubles neurologiques (P) suivant leur âge.

Tableau IV.11. Nombre de chromatogrammes et répétitions retenus pour l'étude du pixel discriminant.

Tableau V.1. Liste des composés standards utilisés pour l'analyse *DART-MS*.

Tableau V.2. Détection (D) ou non détection (ND) des métabolites standards en modes négatif et positif.



**LISTE DES
ABREVIATIONS**

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt	Acétate d'éthyle
ACP	Analyses de composantes principales
AED	(<i>Atomic emission detector</i>) Détecteur à émission atomique
AO	Acidurie ou Acidemie Organique
BSTFA	N,O- Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CAA	(<i>Cis-acotinic acid</i>) Acide cis-acotinique
CI	(<i>Chemical ionisation</i>) Ionisation chimique
GC	(<i>Gas chromatography</i>) Chromatographie en phase gazeuse
GCxGC	(<i>Comprehensive two-dimensional gas chromatography</i>) Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle.
D	Composé détecté
DART	(<i>Direct analysis in real time</i>) Analyse directe en temps réel
ECD	(<i>Electron capture detector</i>) Détecteur à capture d'électron
EI	(<i>Electron ionisation</i>) Ionisation électronique
EIM	Erreur innée du métabolisme
FID	(<i>Flame ionization detector</i>) Détecteur à ionisation de flamme
KYN	Kynurenine
LCR	Liquide céphalorachidien
LMCS	(<i>Longitudinal modulating cryogenic system</i>) Système cryogénique de modulation longitudinale
MS	(<i>Mass spectrometry</i>) Spectrométrie de masse
MS/MS	(<i>Tandem mass spectrometry</i>) Spectrométrie de masses en tandem
MMA	(<i>Methylmalonic acid</i>) Acide méthylmalonique
MeOH	Méthanol
ND	Composé non détecté

NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
SCD	(Sulphur Chemiluminescence detector) <i>Détecteur de soufre à chimiluminescence</i>
THF	Tetrahydrofurane
TMS	Groupe triméthylsilylé
TMCS	Trimethylchlorosilane
TOF-MS	(<i>Time-of-Flight Mass spectrometry</i>) Spectrométrie de masse en temps de vol
PHPA	(<i>Phenylpyruvic acid</i>) Acide phénylpyruvique
Psi	unité de pression
QUIN	(Quinolinic acid) Acide quinolinique
qMS	Spectromètre de masse de type quadripôle
RMN	Résonance magnétique nucléaire
U	Unité d'uréase
3-OHMGGA	(<i>3-hydroxy-3methylglutaric acid</i>) Acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique