

Spectrométrie de masse dans les maladies métaboliques de l'enfant

La spectrométrie de masse permet d'identifier et de mesurer avec précision des composés chimiques au sein de mélanges complexes. Elle trouve ainsi plusieurs applications dans les maladies héréditaires de l'enfant qui se traduisent par l'accumulation de métabolites normalement présents seulement à l'état de traces. En identifiant la nature chimique d'un ou plusieurs métabolites anormalement présents, elle permet de localiser le bloc enzymatique en amont duquel s'accumulent ces produits. Par sa spécificité et sa sensibilité, elle permet également de quantifier ces métabolites et trouve ainsi une application directe au conseil génétique et au diagnostic anténatal.

Francis Rocchiccioli

Remerciements

Je dédie cet article à la mémoire du professeur Pierre Cartier. Je remercie Pierre Bougnères et Patrick Aubourg pour leur collaboration et Nathalie Lepetit et Michel Auclair pour leur aide technique.

ADRESSE

F. Rocchiccioli : chef de travaux des universités, praticien hospitalier. Inserm U.188 et laboratoire de biochimie, hôpital Saint-Vincent-de-Paul, 74, avenue Denfert-Rochereau, 75674 Paris Cedex 14, France.

La plupart des maladies héréditaires dues à un déficit enzymatique interrompant une voie biochimique se traduisent par l'accumulation d'intermédiaires du métabolisme qui peut être mise en évidence, selon les cas, dans les milieux biologiques (plasma, urine, liquide céphalorachidien, liquide amniotique) ou dans les cellules de certains tissus (fibroblastes, trophoblastes, foie, muscle). Cependant, même lorsque cette accumulation est majeure (100 à 1 000 fois la normale), les échantillons biologiques à visée diagnostique ne contiennent le plus souvent que quelques centaines de nanogrammes des produits caractérisant la maladie, d'où la nécessité d'utiliser une méthode capable de

concilier une grande spécificité pour l'identification de ces molécules et une grande sensibilité pour leur détection et leur quantification précise.

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse est devenu l'outil par excellence pour l'analyse de molécules organiques [1-3]. Ses performances sont liées au traitement par l'informatique des données fournies par une méthode de séparation, la chromatographie en phase gazeuse, et une méthode d'identification, la spectrométrie de masse. Il est ainsi possible de détecter et de mesurer de toutes petites quantités de produits « anormaux » au sein de mélanges complexes. La spectrométrie de masse trouve ainsi plusieurs applica-

tions dans le domaine des maladies métaboliques de l'enfant : (1) en identifiant la nature chimique d'un ou plusieurs composé(s) accumulé(s) situé(s) en amont d'un bloc enzymatique, elle permet de localiser l'étape déficiente ; (2) par sa spécificité et sa sensibilité, la spectrométrie de masse permet de quantifier avec grande précision certains métabolites dont la mesure est difficile voire impossible avec d'autres méthodes (chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide haute performance). Nous présentons ici quelques applications médicales illustrant l'intérêt de la spectrométrie de masse dans le domaine des maladies métaboliques de l'enfant.

De la molécule au spectre de masse

L'analyse par spectrométrie de masse d'un produit organique au sein d'un milieu biologique nécessite un traitement de l'échantillon comportant : (1) une purification (déprotéinisation, chromatographie par échange d'ions) ; (2) une extraction à l'aide d'un solvant organique (éther, acétate d'éthyle) qu'il est ensuite possible d'éliminer par évaporation et (3) une dérivation par un réactif qui transforme chimiquement les fonctions polaires de la molécule (acide, amine et/ou hydroxyle) en groupements apolaires (figure 1).

La séparation des molécules est réalisée par chromatographie en phase gazeuse et les molécules éluées de la colonne chromatographique diffusent ensuite directement dans la source ou chambre du spectromètre de masse où a lieu leur ionisation par impact électronique ou ionisation chimique (figure 2).

L'ionisation par impact électronique se produit par arrachement d'un électron périphérique de la molécule et obtention d'une espèce ionique instable à nombre impair d'électrons, l'ion moléculaire, qui se fragmente en ions de plus faibles masses m_1, m_2, \dots (figure 2) par ruptures simples de liaisons et/ou réarrangements moléculaires, ce qui fournit autant d'espèces ioniques. C'est l'ensemble de ces familles d'ions (figure 2) qui constitue le spectre de masse de la molécule. Le processus de fragmentation est spécifique de la structure

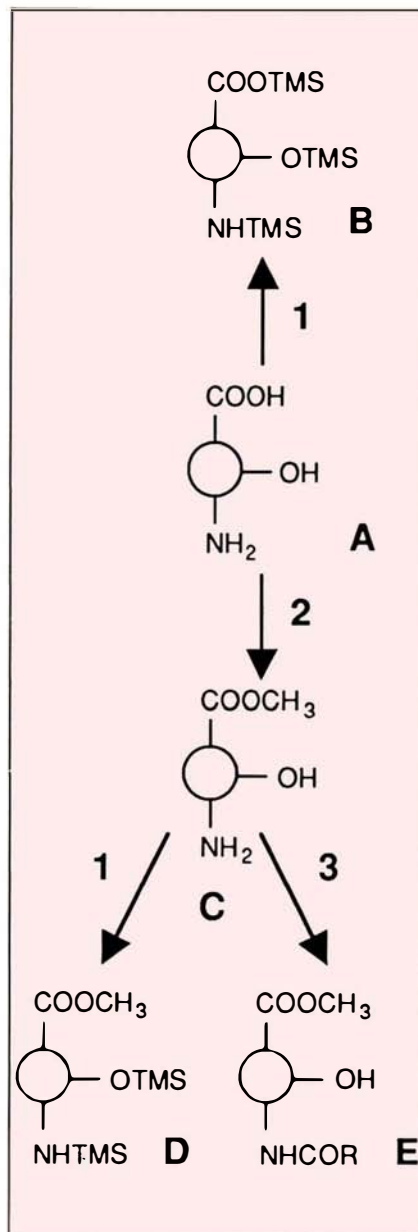
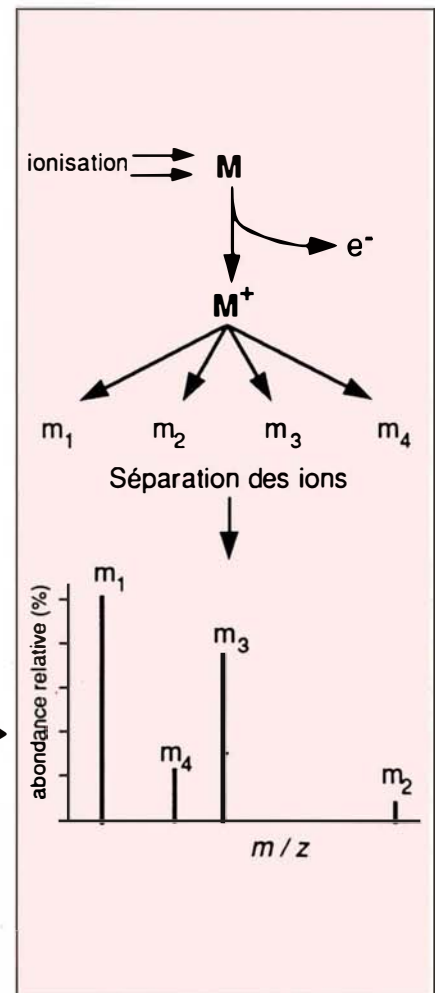


Figure 1. Principales dérivations de molécules organiques extraites d'un milieu biologique. La molécule organique extraite d'un milieu biologique est schématisée en A ; elle comporte une ou plusieurs fonctions polaires dont les plus fréquemment rencontrées sont un carboxyle (COOH), une amine (NH₂) ou un hydroxyle (OH). B est obtenu par addition d'un réactif (1) donneur de groupes triméthylsilyl (TMS). C est obtenu par chauffage en présence de méthanol chlorhydrique anhydre (2) ou par addition de diazométhane. D est obtenu par addition du réactif (1) à C. E est obtenu par traitement de C par un anhydride d'acide (3) (acétique, R = CH₃; trifluoroacétique, R = CF₃).

Figure 2. Schéma d'obtention d'un spectre de masse dans un couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. La molécule M, éluée sous forme gazeuse de la colonne chromatographique, est ionisée par un faisceau d'électrons (70 eV) avec formation de l'ion moléculaire M⁺. instable qui se fragmente en ions de plus faibles masses séparés au niveau du quadripôle.



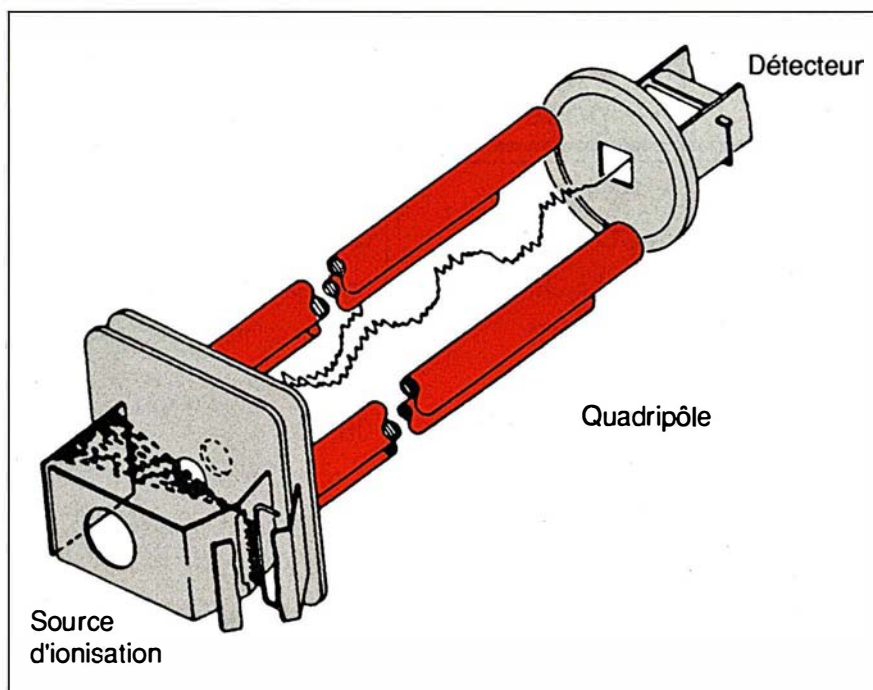


Figure 3. **Détail du quadripôle placé dans une enceinte sous un vide de 10^{-6} mmHg.** Les ions formés dans la source sont soumis à l'action conjuguée d'un champ électrique alternatif (radiofréquence) et d'un champ électrique continu produit entre deux paires de barres conductrices isolées, connectées deux à deux, en carré, à des générateurs de tensions continues et alternatives d'amplitude variable. Une paire de barres est alimentée avec un voltage continu positif et un voltage alternatif ; l'autre paire par un voltage continu identique mais négatif et un voltage alternatif en discordance de phase de 180° . On produit entre ces barres rigoureusement alignées un champ électrostatique qui fait osciller les ions. Suivant les amplitudes respectives des tensions continues et alternatives, la fréquence, la distance entre les barres et leur formes, seuls les ions d'un rapport m/z déterminé suivent une trajectoire limitée et stable et parcourent le quadripôle pour atteindre le détecteur. Les autres espèces ioniques ont des amplitudes d'oscillations trop grandes et sont collectées, déchargées sur les barres conductrices et pompées sous vide. L'impact des ions sur les barres du quadripôle peut donner lieu à l'émission de rayons X de faibles énergies. Les éléments neutres excités qu'ils peuvent induire doivent être éliminés avant de parvenir au niveau du détecteur : c'est la raison pour laquelle on défocalise légèrement celui-ci. Le spectre de masse complet s'obtient en faisant osciller à grande fréquence l'amplitude des tensions continue et alternative tout en maintenant leur rapport d'intensité constant.

chimique de la molécule et les fragments ainsi observés en constituent en quelque sorte une « empreinte digitale ». L'ion moléculaire est dans la majorité des cas tellement instable qu'il n'est pas détecté.

Lorsque l'on utilise l'ionisation chimique, les ions sont formés par des réactions entre un gaz réactionnel (ammoniac, méthane) à haute pression (10^{-2} à 10^{-1} mmHg) et les molécules non chargées du composé à analyser. L'ionisation se produit dans

la source en deux étapes : les électrons incidents ionisent d'abord les molécules du gaz réactionnel X. Cette ionisation primaire produit une ou plusieurs espèce(s) ionique(s) par réactions ions-molécules. Ces ions rencontrent ensuite les molécules de l'échantillon (M) et leur transfèrent un proton, entraînant la formation de l'ion « quasi-moléculaire » $[MH^+]$, à nombre pair d'électrons, donc stable et en règle générale le plus abondant du spectre de masse

en ionisation chimique car il correspond à la focalisation de tous les fragments observés en impact électronique sur un ion unique rendant ce signal d'autant plus intense. Le gain dans la sensibilité de détection est alors d'un facteur 10^4 . Par ailleurs, la spécificité est d'autant plus augmentée que le signal observé en ionisation chimique correspond à la molécule entière.

Les familles d'ions formés dans la source d'ionisation sont ensuite extraits, focalisés et accélérés par des lentilles successives de façon à obtenir un faisceau ionique dont toutes les particules ont la même énergie cinétique.

L'analyse des familles d'ions est réalisée selon le rapport de leur masse à leur charge (m/z) dans un filtre quadripolaire (figure 3). Les signaux obtenus sont amplifiés par un photomultiplicateur d'électrons qui enregistre aussi la collection séquentielle des faisceaux ioniques en donnant un signal dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ions qui arrivent sur la première dynode. Les valeurs des rapports m/z sont proportionnelles aux amplitudes des voltages enregistrés et sont calculées par rapport à un calibrage électronique préalable réalisée au moyen de composés de référence présentant des espèces ioniques connues dans toute la gamme des masses étudiées (perfluorokérosènes).

L'acquisition et le traitement des données provenant du spectromètre de masse nécessitent l'utilisation d'un ordinateur qui intervient à plusieurs niveaux : (a) contrôle des principales fonctions de l'instrument ; (b) sélection des paramètres d'enregistrement ; (c) acquisition des données transmises par le spectromètre : spectres de masse, courant ionique total, temps de rétention, intensités des pics, ... ; (d) traitement des informations (recherche en librairie, détection d'ions sélectionnés, calcul de droite d'étalonnage, calcul de concentrations, ...).

Du spectre de masse à la molécule

Identifier des composés anormaux dans les urines ou le sérum d'un enfant présentant des signes, aigus (coma) ou chroniques, d'une maladie

RÉFÉRENCES

- De Graeve J, Berthou F, Prost M. *Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse*. Paris : Masson, 1986.
- Watson JT. *Introduction to mass spectrometry* (2nd éd.). New York : Raven Press, 1985.
- Hill RE, Whelan DT. Mass spectrometry and clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 1984 ; 139 : 231-94.
- Rocchiccioli F, Cartier PH, Bougnères PF. Mass spectrometric identification of abnormal aromatic compounds in the urine of a child with Reye's like syndrome. *Biomed Mass Spectrom* 1984 ; 11 : 127-31.
- Tjoa SS, Fennessey PV. Acylglycines. The gas chromatograph-mass spectrometric identification and interpretation of their spectra. *Clin Chim Acta* 1979 ; 95 : 35-45.
- Poll The BT, Vamecq J, Draye JP, Saudubray JM. Un nouveau groupe d'erreurs innées du métabolisme : les maladies peroxysomiales. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 553-9.
- Rocchiccioli F, Aubourg P, Bougnères PF. Medium- and long-chain dicarboxylic aciduria in patients with Zellweger syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy. *Pediatr Res* 1986 ; 20 : 62-6.
- Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man, the analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. London - New York : Chapman and Hall, 1982 : 466-7.
- Rhead WJ, Amendt BA, Fritchman KS, Felts SJ. Dicarboxylic aciduria : deficient 1-¹⁴C octanoate oxidation and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts. *Science* 1983 ; 221 : 73-5.
- Bougnères PF, Rocchiccioli F, Kolvraa S, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in two siblings with a Reye-like syndrome. *J Pediatr* 1985 ; 106 : 918-21.
- Gregersen N, Mortensen PB, Kolvraa S. On the biological origin of C₆-C₁₀-dicarboxylic and C₆-C₁₀-(ω -1)-hydroxy monocarboxylic acids in human and rat with acyl-CoA dehydrogenation deficiencies : *in vitro* studies on the ω - and (ω -1)-oxidation of medium-chain (C₆-C₁₂) fatty acids in human and rat liver. *Pediatr Res* 1983 ; 12 : 828-34
- Rinaldo P, O'Shea JJ, Coates PM, Hale DE, Stanley CA, Tanaka K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Diagnosis by stable-isotope dilution measurement of urinary n-hexanoylglycine and 3-phenylpropionylglycine. *N Engl J Med* 1988 ; 319 : 1308-13.

m/z	Formule possible	Composés
26	C ₂ H ₂	hydrocarbures
28	CO	carbonyle
31	CH ₂ =OH	alcool primaire
35/37 (3:1)	³⁵ Cl/ ³⁷ Cl	dérivés chlorés
43	CH ₇	hydrocarbures
43	CH ₃ CO	CH ₃ CO-X
45	CH ₃ -CH=OH	alcool secondaire
55*	C ₄ H ₇	hydrocarbures insaturés
57*	C ₄ H ₉	hydrocarbures
73*	Si(CH ₃) ₃	dérivés triméthylsilylés
74*	CH ₂ =C(OH)OCH ₃	esters méthyliques d'acides gras ayant un hydrogène en γ (réarrangement de McLafferty)
77*	C ₆ H ₅	dérivés aromatiques
79/81 (1:1)	⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br	dérivés bromés
91*	C ₇ H ₇	dérivés aromatiques
103	C ₆ H ₅ CH=CH	dérivés aromatiques
105*	C ₆ H ₅ CO	cétone en α d'un benzène
129	C ₅ H ₉ O ₂ Si	acides gras triméthylsilylés
147*	C ₅ H ₁₅ OSi ₂	dérivés polytriméthylsilylés
149*	C ₈ H ₅ O ₃	phthalates

Figure 4. **Structure des fragments de basses masses.** La valeur des fragments de faibles masses est d'une importance diagnostique capitale pour l'interprétation des spectres de masses en impact électronique. Les fragments de m/z > 50 unités de masse atomique sont toujours très intenses et même très souvent les pics de base des spectres de masse. Le spectre obtenu est automatiquement normalisé par rapport au fragment le plus intense (pic de base).

métabolique est l'étape diagnostique majeure. L'identification d'une molécule organique inconnue peut être réalisée à partir de l'analyse des fragments de son spectre de masse, la structure de la molécule originelle étant reconstituée comme un puzzle par déduction en suivant un raisonnement par étapes : (1) identifier l'ion moléculaire M, dont la valeur

sert de point de départ pour l'étude du processus de fragmentation ; (2) si l'ion moléculaire n'est pas détectable, l'identifier par dérivation du produit (triméthylsilylation par exemple) et/ou en ionisation chimique ; (3) noter la parité de l'ion moléculaire : toute molécule organique qui a un poids moléculaire impair renferme en effet un nombre

Fragment à m/z [M-x]	Famille de molécules
[M - 1]	Aldéhyde, acétals
[M - 15]	esters méthyliques, acétal, dérivés triméthylsilylés
[M - 16]	Composés nitrés aromatiques, N-oxydes, amides aromatiques
[M - 17]	Acides carboxyliques non dérivés
[M - 18]	aldéhyde aliphatique(linéaires), alcools primaires, éthers aliphatiques, acides carboxyliques
[M - 31]	esters méthyliques, dérivés méthoxylés
[M - 34]	thiols
[M - 42]	acétates
[M - 59]	ester méthyliques, ester propyliques
[M - 117]	acides α -hydroxylés triméthylsilylés
[M - 131]	acylglycines triméthylsilylées acides β -hydroxylés triméthylsilylés
[M - 146]	acylglycines triméthylsilylées

Figure 5. **Identification des familles de molécules à partir des fragments perdus de masse X provenant de l'ion moléculaire M.** La perte de fragments neutres, provenant directement de l'ion moléculaire, permet d'identifier des fonctions chimiques présentes au sein des molécules, donnant ainsi des informations complémentaires à celles précédemment obtenues (voir figure 4).

impair d'atomes d'azote puisque sa valence est impaire (règle de l'azote) ; (4) repérer les fragments de faibles masses (figure 4) ainsi que la perte de fragments neutres provenant de l'ion moléculaire (figure 5), ce qui permet d'identifier certains groupements chimiques au sein des molécules. A titre d'exemple, nous montrerons la démarche nécessaire à l'identification d'un composé inconnu présent dans les urines d'un enfant lors d'un coma métabolique. Ce produit triméthylsilylé correspond au composé X de la figure 6, p. 650 dont le spectre de masse est présenté en encart [4]. Les dérivés triméthylsilylés se caractérisent toujours entre autres par la perte d'un méthyle (figure 5),

le fragment de plus haute masse visible à m/z 360 est donc compatible avec un poids moléculaire de 375, ce qui est confirmé par l'apparition en ionisation chimique à l'ammoniac d'un ion intense à m/z 376 [MH⁺]. La valeur impaire de ce poids moléculaire implique la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote (règle de l'azote). Les fragments à m/z 244 et m/z 229, respectivement à [M - 131] et [M - 146] (figure 5), sont en faveur d'un dérivé conjugué de la glycine [5], d'où l'hypothèse d'un composé monoazoté. L'analyse des fragments de faibles masses indique une structure aliphatique : ion à m/z 129 commun aux acides gras sous forme d'esters triméthylsilylés

(figure 4), et fragments différant de 14 ou 28 unités de masse atomique : 158, 172 et 200 d'une part, 189 et 217 d'autre part. L'ensemble de ces données conduit à la formulation d'un schéma de fragmentation correspondant à la structure de la subérylglycine. Cette hypothèse a été confirmée par hydrolyse chimique de ce composé et caractérisation de l'acide subérique (acide dicarboxylique linéaire à huit atomes de carbone) libéré. La preuve finale est apportée par confrontation du spectre de masse du produit inconnu avec celui de la subérylglycine de synthèse, et par coïncidence de leurs caractéristiques (temps de rétention) en chromatographie en phase gazeuse.

Un autre exemple est l'identification d'un composé inconnu présent dans les urines d'un patient atteint d'un syndrome de Zellweger, maladie caractérisée par un défaut des fonctions peroxysomiales [6]. Ce dérivé triméthylsilylé correspond au produit inconnu Y de la figure 7 [7]. Le fragment de plus haute masse visible à m/z 419 (figure 7) est compatible avec un poids moléculaire de 434 (figure 5), confirmé par ionisation chimique [MH⁺ = 435]. Le fragment à m/z 147 est caractéristique d'un dérivé polytriméthylsilylé (figure 4). L'ion intense à m/z 317 [M - 117] peut correspondre à un dérivé d'acide gras hydroxylé en α , puisque ce type de fragmentation se retrouve également dans des composés triméthylsilylés plus simples comme l'acide lactique ou l'acide hydroxy-2-butyrique [8]. Le fragment à m/z 391 [M - 43] peut correspondre à la perte d'un carbonyle (CO = 28) à partir de l'ion à m/z 419 [M - 15]. Cette hypothèse est également en accord avec la structure d'un acide α -hydroxylé, par analogie avec la fragmentation des acides β -hydroxylés qui perdent un méthylène-carbonyle (CH₂CO = 42) à partir du [M - 15]. Enfin, le fragment à m/z 301 provient de la migration, sur le côté opposé de la molécule, d'un groupe triméthylsilyle de l'ion à m/z 317 avec perte simultanée d'un atome d'oxygène. L'hypothèse de cette structure, celle d'un acide dicarboxylique à dix atomes de carbone présentant une fonction hydroxyle en α d'un des deux carboxyles, est fortifiée par le comportement chro-

RÉFÉRENCES

13. Aubourg P, Robain O, Rocchiccioli F, Dancea S, Scotto J. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: lamellar lipid profiles in adrenocortical, hepatic mesenchymal, astrocyte cells and increased levels of very long chain fatty acids and phytanic acid in the plasma. *J Neurol Sci* 1985; 69: 9-25.
14. Chalmers RA, Spellacy E. A method for the pre- and post-natal detection of defects of isovalerate metabolism. *Clin Sci* 1979; 57: 25.
15. Sweetman L, Weyler W, Shafai T, Young PE, Nyhan WL. Prenatal diagnosis of propionic acidemia. *JAMA* 1979; 242: 1048-52.
16. Zinn AB, Hine DG, Mahoney MJ, Tanaka K. The stable isotope dilution method for measurement of methylmalonic acid: a highly accurate approach to the prenatal diagnosis of methylmalonic acidemia. *Pediatr Res* 1982; 16: 740-5.
17. Goodman SI, Gallegos DA, Pullin CJ, et al. Antenatal diagnosis of glutaric aciduria. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 695-9.
18. Mitchell G, Saudubray JM, Benoit Y, et al. Antenatal diagnosis of glutaric aciduria type II. *Lancet* 1983; i: 1099.
19. Jakobs C, Kvittingen EA, Berger R, Haagen A, Kleijer W, Niermeijer M. Prenatal diagnosis of tyrosinaemia type I by use of stable isotope dilution mass spectrometry. *Eur J Pediatr* 1985; 144: 209-10.
20. Solish GI, Moser HW, Ringer LD, Moser AE, Tiffany C, Schutta E. The prenatal diagnosis of the cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger. *Prenat Diagn* 1985; 5: 27-34.
21. Rocchiccioli F, Aubourg P, Choiset A. Immediate prenatal diagnosis of Zellweger syndrome by direct measurement of very long chain fatty acids in chorionic villus cells. *Prenat Diagn* 1987; 7: 349-54.
22. Moser HW, Moser AE, Trojak JE, Supplee SW. Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr* 1983; 103: 54-9.
23. Beavis RC, Chait BT. Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989; 3: 233-7.
24. Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Bohan TP, Kahler SG, Chalmers RA. Diagnostic and therapeutic implications of medium-chain acylcarnitines in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1985; 19: 459-66.

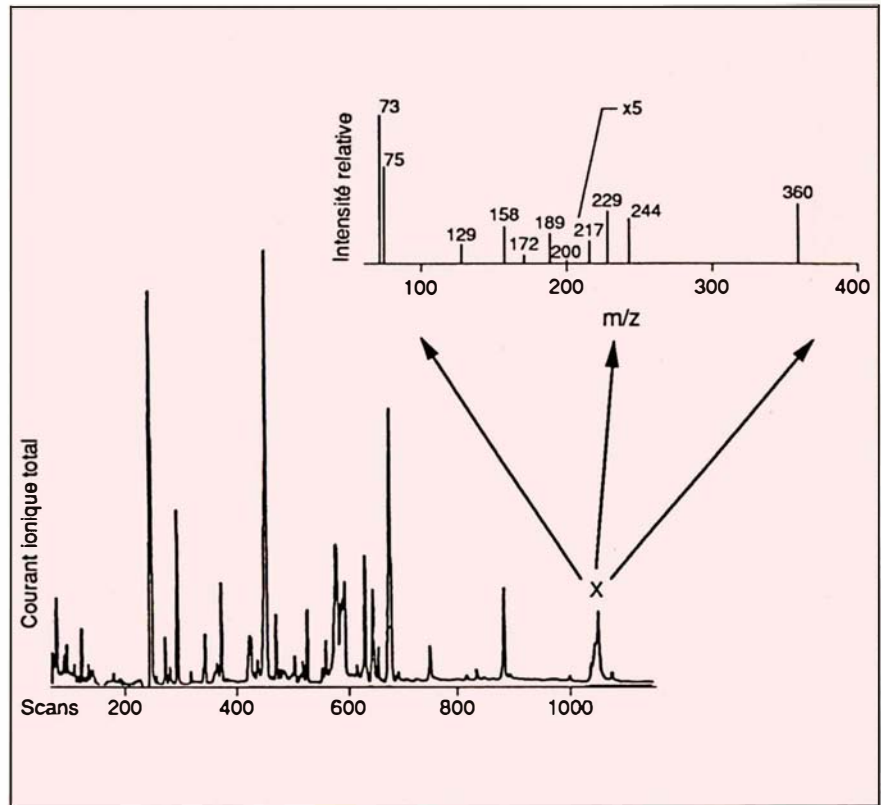


Figure 6. Profil des acides organiques extraits de l'urine recueillie au cours d'un coma hypoglycémique chez un patient présentant une déficience en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne. La séparation est réalisée sur une colonne capillaire apolaire. Le « scan » correspond à l'unité de temps d'enregistrement des informations (de l'ordre de 0,5 seconde), chaque scan étant stocké indépendamment des autres et pouvant être visualisé séparément par le traitement de données. Le profil chromatographique ou courant ionique total est reconstitué automatiquement par la somme de tous les ions formés. Chaque pic chromatographique correspond à un produit distinct. Les spectres de masse des différents produits sont obtenus par traitement informatique. A titre d'exemple, le spectre de masse du composé X (subéryl-glycine), un des marqueurs de la maladie, est présenté en encart.

matographique de ce produit qui est élué juste avant son isomère, l'acide hydroxy-3-sébacique (produit Z de la figure 7). En effet, les acides hydroxylés et triméthylsilylés sont élués d'autant plus tardivement que l'hydroxyle est plus éloigné de la fonction carboxylique. La preuve finale est apportée par superposition du spectre de masse du produit inconnu avec celui de l'acide hydroxy-2-sébacique authentiquement pur.

L'identification d'une substance par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse ne peut être certaine que dans la mesure où les spectres de masse et les com-

portements chromatographiques du produit à identifier et du produit authentiquement pur sont rigoureusement superposables.

Du métabolite au déficit enzymatique

Les maladies qui touchent la β -oxydation des acides gras représentent un exemple parmi d'autres où l'analyse des métabolites urinaires anormaux s'intègre dans un schéma physiopathologique cohérent permettant de caractériser le déficit enzymatique. L'une de ces maladies, le déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne [9], se caracté-

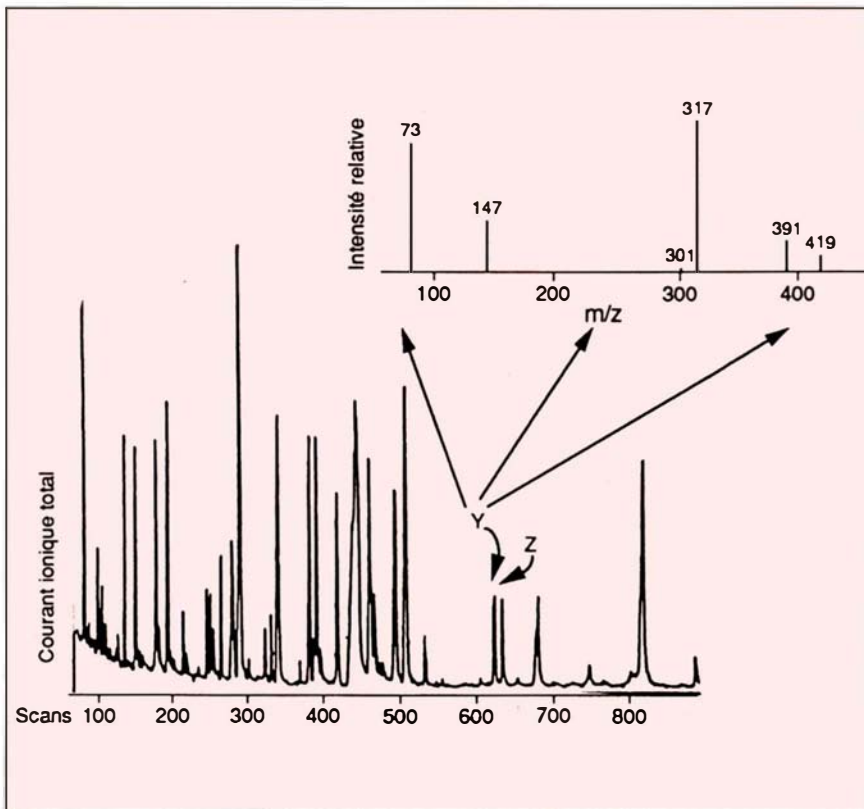


Figure 7. **Profil des acides organiques extraits d'une urine d'un patient présentant un syndrome de Zellweger.** Le spectre de masse du composé Y (acide hydroxy-2-sébacique) est présenté en encart. Le composé Z correspond à l'acide hydroxy-3-sébacique.

térisé par un profil particulier de métabolites urinaires [4, 10] (figure 6) parmi lesquels des acides dicarboxyliques à chaîne moyenne, des acides hydroxylés en (ω -1) et des conjugués de la glycine, la subéryl- et la phénylpropionyl-glycine.

Dans le cas rapporté ici, le patient présentait une acidurie dicarboxylique majeure dont le profil est commun à l'ensemble des maladies dues à un déficit de la β -oxydation mitochondriale. Cependant, l'identification de deux autres produits accumulés, les acides hydroxy-5-hexanoïque et hydroxy-7-octanoïque, permettait de suspecter un déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne : ils proviennent de l'oxydation en ω -1 dans le réticulum endoplasmique des mêmes intermédiaires de dégradation des acides gras [11]; la prépondérance de l'excrétion de l'acide hydroxy-7-octanoïque par rapport à celle de l'acide hydroxy-5-hexanoïque laissait sup-

poser un blocage de la β -oxydation au niveau d'une longueur de chaîne de huit atomes de carbone. Le dosage précis des acides dicarboxyliques à chaîne moyenne permettait d'aboutir à la même conclusion [10], celle d'une déficience en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne expliquant que les métabolites à huit atomes de carbone (acide subérique, acide hydroxy-7-octanoïque et subéryl-glycine) étaient majoritaires par rapport aux acides adipique (C_6) et sébacique (C_{10}). En outre, la présence de dérivés aromatiques anormaux (phénylpropionyl-glycine, acides hydroxy-3- et 4-phénylpropioniques, acide méthoxy-3-hydroxy-4-phénylpropionique) laissait prévoir une perturbation du métabolisme de l'acide phénylpropionique [4]. Par la suite il a été montré que l'acide phénylpropionique est également métabolisé par la déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne, ce qui explique l'accumulation de ce pro-

duit, marqueur du déficit enzymatique au même titre que la subéryl-glycine [12].

Sans entreprendre une revue exhaustive des maladies métaboliques de l'enfant qu'il est possible de détecter ou d'étudier par spectrométrie de masse, la figure 8, p. 652, donne quelques exemples sur des voies métaboliques aussi diverses que celles des acides aminés, des lipides, ou de la néoglucogenèse. Le plus souvent l'analyse par spectrométrie de masse permet de localiser le déficit enzymatique. Dans certains cas toutefois, elle ne le fournit pas directement, mais est une étape d'orientation diagnostique très importante conduisant à la mesure des activités enzymatiques correspondantes dans le foie et/ou les fibroblastes.

De la molécule au dosage

La très haute spécificité de la spectrométrie de masse peut être mise à profit pour le dosage précis de métabolites, particulièrement à très faibles concentrations dans le plasma ou le liquide céphalorachidien. L'exemple le plus typique est celui de l'acide phytanique : les valeurs déterminées en chromatographie en phase gazeuse simple sont considérées comme pathologiques lorsqu'elles sont supérieures à 60 $\mu\text{mol/l}$, alors que la normale plasmatique obtenue en spectrométrie de masse est inférieure à 3 $\mu\text{mol/l}$ [13]. Cette discordance peut entraîner des erreurs de diagnostic par défaut quand l'acide phytanique est dosé par chromatographie en phase gazeuse seule. Cela n'a pas d'incidence particulière pour l'établissement du diagnostic de la maladie de Refsum adulte (déficit en phytanate oxydase), où les valeurs sont habituellement de l'ordre de 150 à 600 $\mu\text{mol/l}$, mais devient crucial dans le cas des maladies peroxysomiales de l'enfant, où les valeurs les plus pathologiques ne dépassent pas 50 $\mu\text{mol/l}$ [6].

Ce type de dosage nécessite la comparaison du produit à doser avec un « standard interne » qui est le plus souvent un analogue de structure. Toutefois, dans certains cas comme celui de l'acide pipécolique ou l'acide glutarique, il est nécessaire d'utiliser la technique de « dilution

isotopique » par addition aux échantillons d'une quantité définie des mêmes produits marqués par ^{13}C et/ou par ^{15}N . Ces standards internes ont strictement le même comportement chimique que les produits naturels au cours de l'extraction et de la dérivation, et le rapport obtenu entre le produit naturel et celui marqué par ^{13}C et par ^{15}N permet d'obtenir de façon très précise la concentration du composé naturel.

Application au diagnostic anténatal

En raison de ses qualités de sensibilité et de spécificité, la spectrométrie de masse est aussi devenue une méthode de choix pour le diagnostic anténatal de certaines maladies métaboliques. C'est le cas de l'acidémie isovalérique [14], de l'acidémie propionique [15], de l'acidémie méthylmalonique [16], des aciduries glutariques de type I [17] et II [18], de la tyrosinémie de type I [19] et des maladies peroxysomiales [20]; le diagnostic anténatal de ce dernier groupe de maladies peut être réalisé par une analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras à très longue chaîne obtenus à partir des amniocytes. Il faut alors mettre ceux-ci en culture pour obtenir une quantité suffisante d'acides gras cellulaires permettant l'analyse. La spectrométrie de masse rend le diagnostic plus facile et plus rapide: il suffit en effet d'une faible quantité (5 à 10 mg) de villosités chorales prélevées entre 10 et 12 semaines de grossesse (figure 9) dont on mesure directement le contenu en acide hexacosanoïque [21].

La spectrométrie de masse permet aussi de reconnaître les patientes hétérozygotes pour l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X qui ont une élévation modérée des acides gras plasmatiques à très longue chaîne (figure 9) [22], ce qui a une répercussion importante au niveau du conseil génétique.

Perspectives

Nous n'avons abordé ici que les applications du couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. En raison de sa complexité, de son prix, et de l'expé-

Déficits du métabolisme	Produit(s) accumulé(s) dans le plasma et/ou l'urine
des acides aminés acidurie 3-hydroxy-3-méthyl-glutarique β -méthylcrotonylglycinurie acidurie 2-cétoadipique acidémie isovalérique tyrosinémie de type I déficience en β -cétotliase acidémie N-acétyl-aspartique	acide 3-hydroxy-3-méthyl-glutarique β -méthylcrotonylglycine acide 2-cétoadipique isovalérylglycine succinylacétone acides méthyl-2-hydroxy-3-butyrique et méthyl-2-céto-3-butyrique, tiglyl-glycine acide N-acétyl-aspartique
des lipides déficiences en carnitine maladie peroxysomiales acidémie glutarique type I et II aciduries dicarboxyliques acidémie éthylmalonique-adipique	acides dicarboxyliques acides gras à très longue chaîne acide phytanique acides biliaires acide pipécolique acides dicarboxyliques acide glutarique acides dicarboxyliques acides éthylmalonique et adipique
du cycle de Krebs et de la néoglucogenèse acidurie fumarique acidurie glycérique acidémie propionique acidémie méthylmalonique	acide fumarique acide glycérique acide propionique acide méthylmalonique

Figure 8. Exemples de maladies métaboliques détectables par spectrométrie de masse.

rience analytique nécessaire, l'implantation de ce couplage en milieu hospitalier reste encore très limitée; à notre connaissance, deux ou trois laboratoires français spécialisés dans le domaine des maladies métaboliques de l'enfant sont équipés d'un tel matériel.

Les spectromètres de masse « de paille » semblent depuis quelques années s'implanter plus facilement en milieu hospitalier de par leurs prix plus accessibles. Bien que moins performants car ne disposant pas de l'ionisation chimique, ils peuvent néanmoins servir à de nombreux

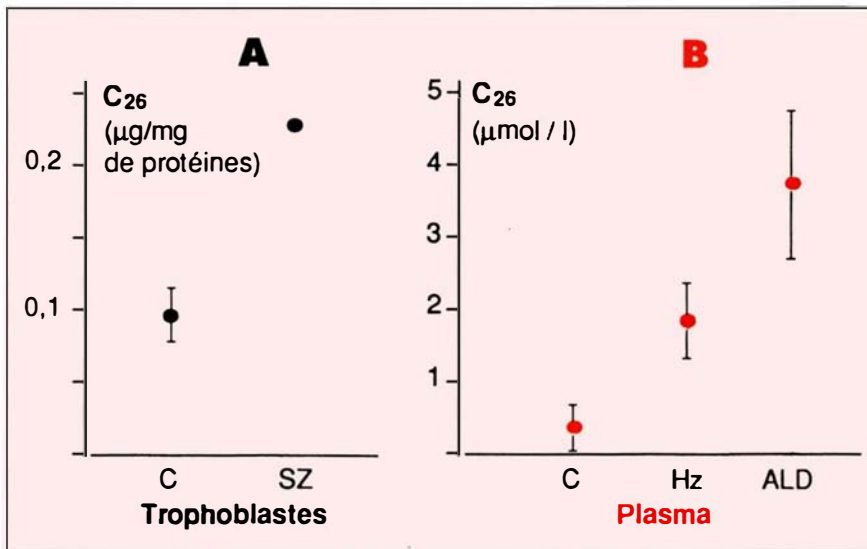


Figure 9. **Contenu en acide hexacosanoïque des trophoblastes (A) et du plasma (B) exprimé respectivement en µg/mg de protéines et en µmol/l.** C : contrôles ; SZ : fœtus atteint d'un syndrome de Zellweger ; Hz : patientes hétérozygotes pour l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X ; ALD : patients atteints de l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X.

dosages.

Les perspectives les plus prometteuses paraissent réservées aux nouvelles techniques d'ionisation développées depuis peu. La désorption par laser permet de caractériser avec une très grande sensibilité (quelques centaines de fmoles) des protéines de poids moléculaire supérieur à 100 000 [23]. Le *fast atom bombardement* (FAB) permet de mesurer très rapidement, et sans nécessité de purification importante ni de dérivation de l'échantillon, le poids moléculaire de composés polaires thermolabiles non volatils ou de composés à haut poids moléculaire. Cette technique s'est récemment révélée particulièrement utile pour l'analyse des acylcarnitines qui s'accumulent dans les maladies de la β -oxydation mitochondriale [24]. Le couplage en tandem de trois quadripôles (tandem MS/MS) représente un niveau encore supérieur de complexité analytique. Cette technique a une spécificité encore supérieure à celle de la spectrométrie de masse simple avec une sensibilité égale, ce qui peut permettre d'éliminer l'étape chromatographique. Elle donne également plus d'informations en moins de temps ■

m/s n° 9 vol. 5, novembre 89

Summary

Mass spectrometry and inherited metabolic diseases

Mass spectrometry, an established sensitive and specific tool for the structural characterization and quantitation of organic molecules, has today many important developments in the management of the inherited metabolic diseases. The extended range of organic molecules that can be analysed allows to localize the primary enzyme defect in many situations. His remarkable sensitivity is also particularly valuable for precise quantitation of abnormal compounds and finds direct application in the prenatal diagnosis of several metabolic disorders.

TIRÉS A PART

F. Rocchiccioli.