



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri  
FACULTE DE MEDECINE  
TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري  
كلية الطب  
تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵉⵎⵎⵓⵔ ⵏ ⵓⵣⵣⵓ ⵏ ⵉⵎⵎⵓⵔ ⵏ ⵓⵣⵣⵓ

Département de Pharmacie  
N° D'ordre :

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté et soutenu

Le : 09/07/2018

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème :

**Dosage de la phénylalanine dans le plasma humain par HPLC,  
Finalisation de la validation**

Réalisé par :

RAHMOUNI AMAL

OUANNOUGHI LYNDA

Encadré par

Promotrice : Dr. BELKAID NAWAL

Co-promoteurs : Dr. BENSISAID HASSAN // Dr. BOURSOUTI MOURAD

Membres du jury :

D <sup>r</sup> . DAHMANI.D	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	présidente de jury
D <sup>r</sup> .MAMOU.M	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examineur
D <sup>r</sup> .DJEDDOU.M	MAHU	Faculté de Médecine	Alger	Examinatrice

Année universitaire : 2017/2018



---

## Remerciements

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu, à **ALLAH** le tout puissant qui nous a donné la santé et la prospérité, la force et la détermination tout au long de notre cursus.*

*Nous tenons à exprimer nos profondes reconnaissances et sincères remerciements à notre promotrice **Docteur BELKAID.N** maitre assistante en Biochimie, qui nous a proposé ce travail et guidé tout au long de sa réalisation, pour sa compétence et l'intérêt qu'elle porte au travail scientifique. Merci pour votre gentillesse, disponibilité, bienveillance, vos précieux conseils et de nous permettre bénéficier de votre savoir inépuisable et de votre expérience. Nous espérons avoir mérité votre confiance.*

*Nous adressons notre profonde gratitude à nos Co-promoteurs **Docteur BENSISAIID.H** maitre-assistant en chimie analytique et **Docteur BOURSOUTI.M** résident en chimie analytique qui nous ont apporté une aide inestimable dans l'élaboration de ce travail. Merci pour le temps consacré, votre patience, le soutien et la gentillesse ainsi que les remarques avisées et le savoir-faire qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Vous trouvez ici le témoignage de notre haute considération et de notre profond respect.*

*Nos vifs remerciements à **Docteur DAHMANI.D** maitre assistante en biochimie pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider le jury.*

*Nos profondes reconnaissances s'adressent à **Docteur MAMOÛ.M** maitre-assistant en chimie analytique d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à la soutenance de ce mémoire, Hommages respectueux,*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement **Docteur DJEDDOU.M** maitre assistante en biochimie, pour l'intérêt qu'elle a immédiatement porté au sujet, vous nous faites l'honneur de juger notre travail.*

*Par ailleurs, nous ne pourrions omettre de remercier tous les volontaires des différents services de pédiatrie, néonatalogie et de biochimie pour leur aide concernant la récolte des échantillons de l'étude.*

*Nous remercions nos familles qui nous ont amené là où nous arrivons aujourd'hui, pour leur amour et leur soutien qui nous ont tant aidées durant toutes nos années d'études et dans tous les moments qui accompagnent notre vie.*

*Un grand remerciement à nos amis et toutes les personnes qui ont contribuées, de près ou de loin, à l'enrichissement de notre travail, à toute personne qui nous a encouragé par un simple mot, par un simple sourire, par un simple regard et qui nous souhaite une bonne réussite.*

*Enfin, nous remercions tous les enseignants qui nous ont suivis le long de nos études.*

*Merci à ce merveilleux métier de pharmacie, à tout ce qu'il peut offrir, nuits blanches, grands moments de solitude, choix incertains, et puis son côté humain qui nous offre d'être et de devenir.*

*Merci à tous !*



---

## Dédicaces

*Je m'incline devant Dieu tout puissant, qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail comme fruit de toutes mes études :*

*Aux être les plus chères à mon cœur mes parents qui mon transmet la vie, le courage, l'amour, le soutien moral ainsi que leurs sacrifices, leur prières et leur aide continue tout au long de mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour et ma reconnaissance. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je suis contente de réaliser une partie de ce que vous avez tant attendu de moi que dieu vous préserve, vous donne la santé, le bonheur et une longue vie.*

*A mes très chères sœurs **Nassima** et son époux, **Imane**, et particulièrement ma grande sœur **Warda** et son mari **Kamel**, à qui je leur dois ma réussite merci de m'avoir tant aidé et encouragé.*

*A mes très chers frères **Djamel** et **Mohamed**.*

*A mes nièces **Kawthar**, **Ryma** et **Hadil**.*

*A mon petit neveu **Riadh**.*

*A toute ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins, cousines.*

*A mon âme sœur, mon amie à qui j'ai passé avec elle les six ans de mes études de pharmacie, et que j'ai réalisé avec elle ce projet dans un environnement plein de motivation et du travail dur jours et nuits. En souvenir de tous les moments qu'on a vécu ensemble durant notre cursus je te remercie infiniment **Amel** ainsi que toute ta famille.*

*A mes chères amies, **Chahinez**, **Loubna**, **Mimi**, **Ahlem**, **Soumia**, **Tina**, **Meriem**, **Hayet**, **Samra** et **Mina**, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*Lynda*



---

## Dédicaces

*Je m'incline devant Dieu tout puissant, qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail comme fruit de toutes mes études :*

*Aux êtres les plus chères à mon cœur, mes parents qui m'ont transmis la vie, le courage, l'amour, le soutien moral, pour leurs sacrifices, leur prières et leur aide continue tout au long de mon parcours. Vous Récoltez dans ce travail le fruit de vos efforts, aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour et ma reconnaissance. Que dieu vous préserve, vous donne la santé, le bonheur et une longue vie.*

*A ma grande sœur, tu trouves ici mes sincères reconnaissances pour ton grand cœur, ta présence à mes côtés surtout dans les moments les plus difficiles, pour ton encouragement et tes conseils qui m'ont poussé toujours à avancer.*

*A tous mes frères qui ont toujours cru en moi et m'ont encouragés pour arriver à ce niveau, ainsi qu'à leurs femmes, que dieu vous garde.*

*Je dis merci particulièrement à mon frère **Samir**, pour son aide précieuse jusqu'aux dernières lignes du manuscrit, merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long de mon cursus et pour tous ce que tu m'as appris tous les jours.*

*A mes chers au cœur, mes nièces et mes neveux, que dieu vous protège.*

*A ma meilleure amie, ma copine, ma binôme, et ma sœur, **Lynda**, en souvenir de tous les moments de joie, de fatigue et de folie qu'on a vécu ensemble, en témoignage de l'amour et de l'affection que je porte pour toi, je te souhaite une vie pleine de santé, de bonheur et de réussite ainsi que toute ta famille, un grand merci à ta sœur **Warda**, les mots ne peuvent pas exprimer mes sincères gratitude.*

*A **Souad** ma chère et ma sœur, ainsi que toutes mes amies qui m'ont entouré ces dernières années et avec qui j'ai passé le meilleur et le pire.*

*Amel*



## Table des matières

Remerciements .....	i
Dédicaces .....	ii
Liste des abréviations .....	viii
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux .....	xii
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>

### PARTIE THEORIQUE

#### Chapitre I : Généralités sur les acides aminés

1. Les acides aminés .....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Métabolisme.....	4
1.2.1. Synthèse .....	4
1.2.2. Catabolisme .....	5
1.3. Importance biologique .....	5
1.4. Classification.....	5
1.5. Les maladies héréditaires du métabolisme des acides aminés .....	6
1.5.1. Définition .....	6
1.5.2. Classification .....	6
1.5.3. Diagnostic.....	6
1.5.4. Prise en charge .....	7
2. Les acides aminés aromatiques.....	7
2.1. Définition .....	7
2.1.1. La Phénylalanine .....	8
2.1.2. La Tyrosine .....	8
2.1.3. Le Tryptophane .....	9
2.2. Rôle physiologique .....	9
2.2.1. Phénylalanine et Tyrosine .....	9
2.2.2. Tryptophane .....	10
2.3. Métabolisme.....	10
2.3.1. Synthèse .....	10
2.3.2. Catabolisme .....	10
2.3.2.1. La Phénylalanine et la Tyrosine .....	10
2.3.2.2. Tryptophane .....	11

#### Chapitre II : Phénylcétonurie (PCU)

1. Historique .....	12
2. Physiopathologie .....	12
3. Définition de la PCU .....	13
4. La PCU maternelle .....	13
5. La PCU chez l'adulte.....	13
6. Génétique.....	14



7. Clinique .....	14
8. Diagnostic .....	15
8.1. Dépistage néonatal .....	15
8.1.1. Dosage de la phénylalanine sur sang séché à la naissance (test de Guthrie) .....	16
8.1.2. Techniques de dosage et de quantification .....	16
8.1.2.1. Spectrométrie de masse en tandem .....	16
8.1.2.2. Fluorimétrie .....	16
8.1.2.3. Technique Quantase .....	17
8.1.2.4. Electrophorèse capillaire .....	17
8.1.2.5. Chromatographies .....	17
8.1.3. Test de charge en BH4 .....	18
8.1.4. Diagnostic différentiel .....	19
8.1.5. Génotypage .....	19
8.2. Dépistage prénatal .....	19
9. Traitement .....	20
9.1. Traitement diététique .....	20
9.2. Traitements médicamenteux .....	20
10. Suivi des patients phénylcétonuriques .....	20

## Chapitre III : Finalisation de la validation d'une méthode

1. Généralités sur la validation .....	22
1.1. Définition de la validation .....	23
1.2. Objectif de la validation .....	23
1.3. Aspects réglementaires de la validation .....	23
1.4. Critères de validation .....	23
1.4.1. Critères généraux .....	24
1.4.1.1. La spécificité .....	24
1.4.1.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) .....	24
1.4.1.3. Linéarité (des résultats d'essai) .....	24
1.4.1.4. La fidélité .....	24
1.4.1.5. La justesse .....	25
1.4.1.6. Exactitude .....	25
1.4.1.7. Le profil d'exactitude .....	25
1.4.1.8. Intervalle du dosage .....	26
1.4.1.9. La sensibilité .....	26
1.4.2. Critères employés pour certaines méthodes .....	26
1.4.2.1. La stabilité .....	26
1.4.2.2. Rendement d'extraction .....	26
1.4.2.3. Effet de la dilution .....	26
1.5. Domaines d'application .....	26
2. Les critères de finalisation d'une validation .....	27
2.1. Comparaison .....	27
2.2. Etablissement des intervalles de référence .....	27
2.2.1. Terminologie .....	27



2.2.2. Définition de l'intervalle de référence .....	28
2.2.3. Stratégie de l'établissement des valeurs de référence sur une population saine .....	29
2.2.3.1. Sélection des individus de référence .....	29
2.2.3.2. Préparation des individus pour le prélèvement et collecte d'échantillon ....	29
2.2.3.3. L'analyse biochimique par des méthodes fiables .....	30
2.2.3.4. Traitements statistiques et analyses des données .....	30
2.2.3.5. Mise en évidence et élimination des valeurs aberrantes (outliers) .....	30
2.2.3.6. Intervalles de confiance .....	30
2.2.4. Utilisations et intérêts .....	31
2.2.4.1. Intérêt dans le diagnostic médical .....	31
2.2.4.2. Intérêt dans le pronostic et le suivi thérapeutique .....	31
2.2.4.3. Intérêt en épidémiologie .....	31
2.2.5. Intervalles de référence de la Phe .....	31

## PARTIE PRATIQUE

### Chapitre I : Matériels et Méthode

1. Description de l'étude .....	33
2. Population d'étude .....	34
2.1. Population de l'étude de comparaison .....	34
2.2. Populations pour l'essai d'établissement des valeurs de référence .....	34
3. Matériels et méthodes .....	35
3.1. Matériels .....	35
3.1.1. Equipements .....	35
3.1.2. Autres matériels .....	36
3.1.2.1. Verreries .....	36
3.1.2.2. Matériels accessoires et consommables .....	37
3.1.3. Matières premières .....	38
3.1.4. Réactifs .....	38
3.2. Méthode .....	39
3.2.1. Méthodes d'échantillonnage .....	39
3.2.1.1. Collecte des échantillons .....	39
3.2.1.2. Traitement et conservation des échantillons .....	40
3.2.2. Méthodes analytiques .....	40
3.2.2.1. Méthode HPLC .....	40
3.2.2.2. Analyse par HPLC .....	41
3.2.2.3. Rappel du protocole de validation .....	43
3.2.2.4. Préparation des réactifs .....	45
3.2.2.5. Etalonnage .....	45
3.2.2.6. Qualité du système .....	49
3.2.2.7. Protocole d'analyse des échantillons .....	49
3.2.3. Comparaison .....	50
3.2.4. Essai d'établissement des valeurs de références .....	53



## Chapitre II : Résultats et interprétations

1. Rappel des principaux résultats de validation .....	54
1.1. Fonction de réponse .....	54
1.1.1. Modèles étudiés .....	54
1.1.2. Choix de la fonction de réponse .....	54
1.2. Profil d'exactitude .....	54
2. Résultats de l'étude de suitabilité de la colonne .....	55
3. Résultats d'étalonnage .....	56
3.1 Exemple de chromatogramme .....	56
3.2. Moyenne des temps de rétention .....	57
3.3. Droite d'étalonnage .....	57
3.4. Lancement d'une série de contrôle .....	57
4. Résultats de l'étude de comparaison .....	58
4.1. Analyse descriptive de la totalité des résultats .....	58
4.1.1. Analyse descriptive des résultats du domaine de mesure .....	59
4.1.2. Analyse descriptive des résultats inférieurs à la limite de quantification .....	60
4.1.3. Analyse descriptive des résultats supérieurs à la limite de linéarité .....	61
4.2. Analyse qualitative des résultats et comparaison des méthodes .....	62
4.3. Analyse quantitative et comparaison des méthodes .....	63
4.3.1. Vérification de la normalité des valeurs .....	63
4.3.2. Diagrammes des différences de Bland Altman .....	65
4.3.3. Test de Passing and Bablok .....	67
5. Les valeurs de référence du dosage de la Phe par HPLC .....	69
5.1. Distribution de la population d'étude selon l'âge et le sexe .....	69
5.2. Données statistiques .....	69
5.2.1. Population adulte .....	69
5.2.2. Population pédiatrique .....	71
5.2.3. Population néonatalogie .....	72
6. Cas clinique .....	73
<b>Chapitre III : Discussion</b>	
<b>Conclusion</b> .....	78
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	



### Liste des abréviations

**AA** : Acide Aminé

**AAA** : Acide Aminé Aromatique

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**BH4** : Tétrahydrobioptérine

**BIA** : Bacterial Inhibition Assay

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CHU** : Centre Hospitalo-universitaire

**CE** : Electrophorèse Capillaire

**DHPR** : Dihydropteridine Réductase

**DNN** : Dépistage Néonatal

**DO** : Densité Optique

**DOPA** : Dihydroxyphénylalanine

**EDTA** : Acide Ethylènediaminetétraacétique

**EI** : Etalon Interne

**FDA** : Food and Drug Administration

**HMP** : Hyperphénylalaninémie Modérée

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**IEC** : Chromatographie Echangeuse d'ions

**IFCC-LM** : Fédération Internationale de Chimie Clinique et de Médecine de Laboratoire

**ICH**: International Conference on Harmonization

**ICSH**: International Council for Standardization in Haematology

**Ile** : Isoleucine

**ISO** : Organisme International de Normalisation

**Leu** : Leucine

**LCR** : liquide céphalo-rachidien

## Liste des abréviations

---



**MS-MS** : Spectrométrie de Masse en tandem

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PAH** : Phénylalanine Hydroxylase

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PCU** : Phénylcétonurie

**PE** : Prise d'essai

**PEP** : Phosphoénolpyruvate

**Phe** : Phénylalanine

**SFBC** : Société Française de Biologie Clinique

**SFSTP** : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

**SM** : Solution Mère

**SRM** : Selected Reaction Monitoring

**TCA** : Acide Trichloracétique

**Tyr** : Tyrosine

**T3** : Triiodothyronine

**T4** : Thyroxine

**Val** : Valine



## Liste des figures

Figure 1 : Synthèse des acides aminés.....	4
Figure 2 : Structure de la phénylalanine.....	7
Figure 3 : Métabolisme de la phénylalanine.....	8
Figure 4 : Structure de la tyrosine.....	9
Figure 5 : Structure du tryptophane.....	9
Figure 6 : Rôle physiologique de la Phe et la Tyr.....	9
Figure 7 : Catabolisme des acides aminés aromatique.....	11
Figure 8 : Schéma de la physiopathologie de la Phe.....	12
Figure 9 : Localisation du gène PAH au niveau du chromosome 12.....	14
Figure 10 : Principe de la méthode fluorimétrique.....	17
Figure 11 : Relation entre les principaux termes des intervalles de référence.....	28
Figure 12 : Schéma de la méthodologie du travail.....	33
Figure 13 : Schéma de la composition d'une colonne.....	41
Figure 14 : Exemple d'un chromatogramme.....	41
Figure 15 : Schéma de principe d'une chaîne HPLC.....	42
Figure 16 : Schéma du mode opératoire de la validation.....	44
Figure 17 : Les dilutions des solutions de la Phe.....	48
Figure 18 : Schéma des étapes du dosage de la Phe.....	50
Figure 19 : Profil d'exactitude de la Phe.....	55
Figure 20 : Chromatogramme d'une solution étalon de la Phe.....	56
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la Phe.....	57
Figure 22 : Analyse descriptive de la totalité des données de comparaison.....	58
Figure 23 : Analyse descriptive des résultats du domaine de mesure.....	59
Figure 24 : Analyse descriptive des résultats inférieurs à la limite de quantification.....	60
Figure 25 : Analyse descriptive des résultats supérieurs à la limite de linéarité.....	61
Figure 26 : Analyse qualitative des résultats.....	62
Figure 27 : Tests graphiques pour la vérification de la normalité «Fluorimétrie ».....	63
Figure 28 : Tests graphiques pour la vérification de la normalité « HPLC ».....	64
Figure 29 : Représentation graphique des différences entre les deux méthodes en fonction de la moyenne des concentrations.....	65
Figure 30 : Répartition des différences.....	66
Figure 31 : Représentation des différences en fonction de la moyenne.....	66
Figure 32 : Droite de corrélation des moindres carrés.....	67
Figure 33 : représentation graphique de la droite de régression des deux méthodes.....	68
Figure 34 : Répartition de la population de référence selon la catégorie d'âge et du sexe.....	69
Figure 35 : Scattergram de la distribution des valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine.....	69
Figure 36 : Histogramme de la distribution des valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine.....	70



Figure 36 : Scattergram de la distribution de la Phe chez la population pédiatrique.....71  
Figure 37 : Histogramme de la distribution des valeurs de la Phe chez la population pédiatrique.....72  
Figure 38 : Scattergram de la distribution des valeurs de la Phe chez les nouveaux nés.....72  
Figure 39 : Histogramme de la distribution des valeurs de la Phe chez les nouveaux nés.....73



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Ensemble des 20 aminoacides incorporés dans les protéines.....	3
Tableau 2 : Classification des acides aminés.....	5
Tableau 3 : Types d'hyperphénylalaninémies.....	13
Tableau 4 : Les principaux critères de la validation.....	24
Tableau 5 : Valeurs de référence de la Phe plasmatique ( $\mu\text{mol/l}$ ).....	31
Tableau 6 : Elimination urinaire de la Phe ( $\mu\text{mol/jour}$ ).....	32
Tableau 7 : Répartition de la population de référence.....	34
Tableau 8 : Equipements utilisés dans le présent travail.....	35
Tableau 9 : Verreries utilisées dans le présent travail.....	36
Tableau 10 : Matériels accessoires et consommables utilisés dans le présent travail.....	37
Tableau 11 : Matières premières utilisées dans le présent travail.....	38
Tableau 12 : Réactifs utilisés dans le présent travail.....	38
Tableau 13 : Conditions chromatographique de la méthode.....	45
Tableau 14 : Gamme d'étalonnage de la Phe pour la méthode fluorimétrique.....	51
Tableau 15 : Mode opératoire du dosage de la Phe pour la méthode fluorimétrique.....	52
Tableau 16 : RSD des airs du pic de la Phe.....	55
Tableau 17 : Nombre de plateaux théoriques, facteur de rétention et facteur du symétrie du pic de la Phe.....	56
Tableau 18 : Moyenne des temps de rétention.....	57
Tableau 19 : Résultats de la série de contrôle.....	57
Tableau 20 : Statistiques descriptives de la totalité des résultats.....	58
Tableau 21 : Statistiques descriptives des résultats du domaine de mesure.....	59
Tableau 22 : Statistiques descriptives des résultats inférieurs à la limite de quantification.....	60
Tableau 23 : Statistiques descriptives des résultats supérieurs à la limite de linéarité.....	61
Tableau 24 : Tableau de contingence de l'interprétation qualitative des résultats de comparaison.....	62
Tableau 25 : Tests statistiques pour la vérification de la normalité « Fluorimétrie ».....	63
Tableau 26 : Tests statistiques pour la vérification de la normalité « HPLC ».....	65
Tableau 27 : Test statistique de l'analyse des différences.....	66
Tableau 28 : Données statistiques du diagramme de différences.....	66
Tableau 29 : Données statistiques « valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine ».....	70
Tableau 30 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.....	70
Tableau 31 : Données de l'intervalle des valeurs de la Phe plasmatique chez la population adulte saine.....	71
Tableau 32 : Données statistiques des valeurs de la Phe chez la population pédiatrique.....	71
Tableau 33 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.....	72
Tableau 34 : Données statistiques « valeurs de la Phe chez les nouveaux nés.....	72
Tableau 35 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.....	73



### Introduction

La phénylcétonurie est une maladie héréditaire touchant le métabolisme des acides aminés, elle est causée par des mutations de l'enzyme hépatique, la phénylalanine hydroxylase. Le déficit en cette enzyme entraîne l'incapacité de convertir la Phénylalanine en Tyrosine qui conduit à une augmentation de ses concentrations dans le sang et le système nerveux central. Cette hyperphénylalaninémie est caractérisée par de graves troubles neurologiques irréversibles tels que des troubles du développement intellectuel, des troubles de l'attention et du comportement. Elle peut également engendrer des convulsions, une dépigmentation de la peau et des cheveux qui sont des troubles réversibles.

Ces troubles peuvent néanmoins être évités grâce notamment au dépistage systématique des nourrissons à trois jours de vie par dosage de la Phe, suivi d'une prise en charge adaptée [1,2].

Aucune étude statistique n'est enregistrée au niveau de notre région malgré la grande prévalence de son apparition et la gravité de ses signes cliniques.

C'est dans cette optique que le laboratoire de biochimie et chimie analytique de Tizi Ouzou se sont intéressés au développement d'une technique de dosage de la Phe. Il s'agit d'une technique basée sur la fluorescence naturelle de la Phe. Elle a été validée et optimisée selon la nouvelle approche proposée par la commission d'SFSTP 2006.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, et exact dans l'intervalle [79.19 ; 300]  $\mu\text{mol/l}$  pour la phénylalanine avec un risque d'avoir au maximum 20% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-15% ; +15%] [3].

Pour attester la validité de la méthode et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de biochimie médicale pour le dosage de la phénylalanine, nous sommes intéressés dans le présent travail au développement de cette méthode. Ainsi conformément à la norme ISO 15189, la vérification de la technique par un étalonnage et une comparaison avec une autre méthode fluorimétrique, afin d'estimer leur comparabilité et d'évaluer leur concordance, est nécessaire.

La finalité du processus de validation est l'essai d'établissement d'intervalles de référence auxquelles nos prochaines valeurs seront comparées pour être interprétées.



### Objectifs

Notre travail consiste à :

- Une vérification de la technique par étalonnage externe et comparaison à une autre méthode de routine ;
- Le deuxième objectif s'étale sur un essai d'établissement des valeurs de références ;
- Enfin, une étude des limites de la technique est nécessaire ainsi qu'une proposition d'améliorations dans le cadre de développement et d'optimisation de celle-ci.

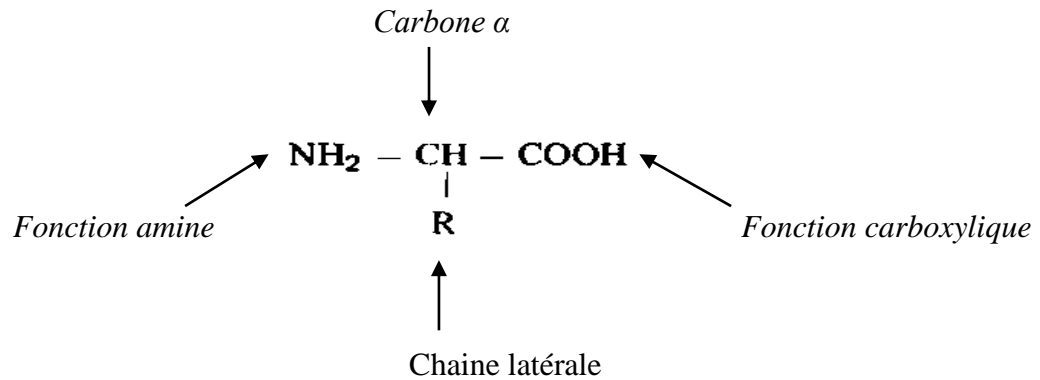


## 1. Les acides aminés

### 1.1. Définition

Les acides aminés (acides aminocarboxyliques) forment un groupe de biomolécules important aux fonctions multiples, selon la position du groupement amine, on distingue les acides  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -aminés. Les acides aminés naturels appartiennent en majorité aux acides  $\alpha$ -aminés (acides 2-aminocarboxyliques) [4].

Ils sont des molécules qui possèdent :



- Une fonction acide carboxylique
- Une fonction amine primaire portée par un même atome de carbone, l'atome de carbone  $\alpha$  (ou C2, le C1 étant l'atome de carbone carboxylique) : ce sont des acides  $\alpha$ -aminés. Ils diffèrent par la nature de la chaîne latérale (ou radicale) R.
- Parmi les acides aminés standard, une exception : la proline dont la fonction amine (secondaire) est incluse dans un cycle (acide  $\alpha$ -iminé) [5].

La plupart des micro-organismes tels que *E.coli* peuvent synthétiser tous les 20 aminoacides de base tandis que l'homme ne peut pas synthétiser 8 d'entre eux. Les aminoacides qui doivent être apportés par l'alimentation sont appelés essentiels, tandis que les autres sont dits non essentiels [6].

**Tableau 1 : Ensemble des 20 aminoacides incorporés dans les protéines [6].**

Non essentiels	Essentiels
Alanine	Isoleucine
Asparagine	Leucine
Aspartate	Lysine
Cystéine	Méthionine
Glutamate	Phénylalanine
Glutamine	Thréonine
Glycine	Tryptophane
Proline	Valine
Sérine	
Tyrosine	



Deux acides aminés, l'histidine et l'arginine sont dits semi-essentiels, car les nourrissons pendant toute la période de leur croissance ont besoin d'un apport exogène (on les trouve dans le lait maternel) [7].

## 1.2. Métabolisme

Le métabolisme des acides aminés comprend :

- Leur synthèse à partir d'intermédiaires métaboliques qui peut mener à la synthèse protéique, à la synthèse de divers acides aminés non essentiels, et de dérivés azotés non protéiques.
- Leur catabolisme, aboutissant à l'obtention de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et ATP, urée et ammoniacque. Elle a lieu en deux temps :
  - ✓ Enlèvement de l'azote aminé et son élimination sous la forme d'urée (foie) et de  $\text{NH}_4^+$  (rein) ;
  - ✓ Catabolisme du radical carboné.
- Leur utilisation comme précurseurs de molécules d'intérêt biologiques [5,8].

### 1.2.1. Synthèse

Bien que le foie soit le principal site de synthèse des acides aminés non essentiels, d'autres tissus peuvent synthétiser et dégrader les acides aminés.

Les acides aminés essentiels sont synthétisés par des voies complexes.

La plupart des voies de la biosynthèse des aminoacides sont régulées par retro-inhibition ; l'étape d'engagement est inhibée allostériquement par le produit terminal [6].

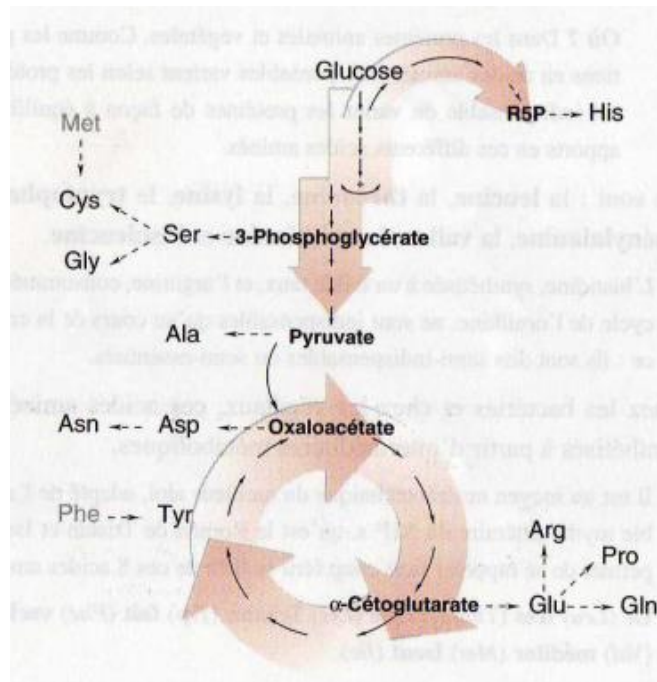


Figure 1 : Synthèse des acides aminés [9].



### 1.2.2. Catabolisme

Le catabolisme des acides aminés varie fortement en fonction de la situation métabolique, mais on calcule qu'environ 15% de la dépense énergétique au repos provient de l'oxydation des acides aminés dans différents tissus. Il est important de garder à l'esprit que les acides aminés ne peuvent pas être stockés dans le corps [10].

Le site majeur de la dégradation des aminoacides chez les mammifères est le foie, bien que les muscles dégradent volontiers les aminoacides ramifiés (leu, ile, et val) [11].

### 1.3. Importance biologique

Les acides aminés sont les monomères des protéines qui déterminent leurs structures et leurs fonctions, ils sont ainsi des métabolites énergétiques et des précurseurs de nombreuses substances azotés comme l'hème, les amines physiologiquement actives, le glutathion, les nucléotides et les coenzymes nucléotidiques ; les courts polymères d'acides aminés appelés peptides jouent des rôles importants dans le système neuroendocrinien en tant qu'hormones, facteurs libérant des hormones, neuromodulateurs ou neurotransmetteurs [12,13].

En excès, les acides aminés ne sont pas stockés, ils sont transformés en intermédiaires courants pour être utilisés comme carburants métaboliques, comme le pyruvate, l'oxaloacétate et l' $\alpha$ -cétoglutarate. Par conséquent, les acides aminés sont aussi des substrats énergétiques car ils peuvent être les précurseurs du glucose, des acides gras et des corps cétoniques et sont donc des aliments métaboliques [7,12].

### 1.4. Classification

Tableau 2 : Classification des acides aminés [5].

Acides aminés aliphatiques				
A chaîne hydrocarbonée	A fonction alcool	A fonction soufrée	A fonction acide	A fonction basique
<b>(non polaire) :</b> Glycocolle ; Alanine ; Valine ; Leucine ; Isoleucine.	<b>(polaire ; non ionisable) :</b> Sérine ; Thréonine.	<b>(polaire non ionisable) :</b> Cystéine. (non polaire) : Méthionine.	<b>(polaire, ionisable) :</b> Acide Aspartique ; Acide Glutamique ; <b>(polaire, non ionisable) :</b> Asparagine ; Glutamine.	<b>(Polaire ionisable) :</b> Lysine ; Arginine ; Histidine.
Acides aminés cycliques				
<b>Aromatiques</b>			<b>Acide <math>\alpha</math>-iminé</b>	
<b>(non polaire) :</b> Phénylalanine ; Tryptophane. <b>(polaire non ionisable) :</b> Tyrosine.			<b>(non polaire) :</b> Proline.	



## 1.5. Les maladies héréditaires du métabolisme des acides aminés

### 1.5.1. Définition

Appelées encore erreurs innées du métabolisme des acides aminés, ou aminoacidopathies congénitales, elles regroupent un ensemble de désordres affectant le métabolisme des acides aminés, secondaires à une accumulation toxique de l'AA ou de ses métabolites, ou encore à un déficit de type énergétique. Elles sont dues à des mutations de gènes codant pour des protéines (enzymes, transporteurs ou protéines de structure) impliquées dans des voies métaboliques diverses. Ces maladies sont rares et souvent graves ; elles concernent chacune moins d'une naissance sur 10000 mais considérées dans leur globalité, elles représentent une part considérable de la pathologie néonatale et pédiatrique, elles peuvent également rester longtemps asymptomatiques et être diagnostiquées seulement à l'âge adulte. Elles s'expriment dans la période néonatale, souvent par des manifestations neurologiques et s'accompagnent de perturbations métaboliques s'ils sont présents le plus souvent dès la naissance. Certaines de ces affections sont létales. Cependant depuis plusieurs années, le nombre de maladies traitables ne cesse d'augmenter [14,15,16].

### 1.5.2. Classification

Elles peuvent être classées en deux catégories :

- Les enzymopathies touchant le catabolisme de l'azote aminé (uréogénèse) ou une étape du catabolisme de la fraction carbonée des acides aminés. Si l'anomalie se situe au niveau de l'une des premières étapes du catabolisme de l'acide aminé celui-ci s'accumulera. Si l'anomalie se situe au niveau des dernières étapes de la voie métabolique, le produit qui s'accumule est un acide organique.
- Les anomalies de transport membranaire atteignant la membrane plasmique des cellules (cellules tubulaires rénales et/ou entérocytes) ou les membranes intracellulaires (mitochondries, lysosomes) [15].
- Les déficits vitaminiques ou épilepsies vitaminosensibles qui englobent :
  - ✓ Les convulsions pyridoxine dépendantes et pyridoxalophosphate dépendantes ;
  - ✓ Les convulsions sensibles à l'acide folinique ;
  - ✓ Les déficits de la voie de la biotine [17,18].

### 1.5.3. Diagnostic

Un bilan métabolique adéquat doit être prescrit avant de débiter le traitement, ce dernier peut rétablir certains signes qui pourraient être indispensables au diagnostic ;

Le diagnostic précis et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme reposent sur des signes biologiques d'orientation :

- Acidose ou alcalose métabolique ;
- Cétonurie ou absence de cétonurie ;
- Hypoglycémie, normoglycémie ou hyperglycémie ;
- Hyperammoniémie ou non ;



- Lactacidémie ou non.

L'installation d'une hépatomégalie est un signe clinique important qui peut délimiter un groupe de MHM.

Evidemment, il faut procéder par élimination des autres causes non liées à une MHM tel que : la déshydratation, l'hypoxie...

Un bilan métabolique plus poussé permet de poser le diagnostic d'une aminoacidopathie à savoir :

- Tests d'orientation des AA : DNPH, réaction de Brand et Speather Barber ;
- Dosage spécifique des AA (Phe, His) ;
- Dosage de la succinylacétone qui est pathognomonique à la tyrosinémie type I ;
- Chromatographie des AA plasmatique sanguins et urinaires et une chromatographie des acides organique [19].

#### 1.5.4. Prise en charge

L'efficacité de la prise en charge dépend de la rapidité du diagnostic. Une collaboration étroite entre les cliniciens et les biochimistes spécialisés est indispensable pour optimiser le diagnostic et la prise en charge des patients, elle a pour but d'assurer le développement d'une intelligence normale et de prévenir l'apparition des autres complications. Le nombre de ces maladies pouvant être traitées est faible mais s'accroît régulièrement. L'objectif thérapeutique est de normaliser le phénotype biochimique de la maladie, diminuer les produits accumulés en amont du bloc et augmenter les produits manquants en aval du bloc tout en essayant de stimuler l'activité enzymatique résiduelle par apport de cofacteur vitaminique à forte dose et d'utiliser les voies métaboliques alternatives. Le cas des formes résistantes ou non accessibles à un traitement vitaminique est plus difficile et impose un régime hypo-protidique strict appauvri en un ou plusieurs des acides aminés en cause [14,15].

## 2. Les acides aminés aromatiques

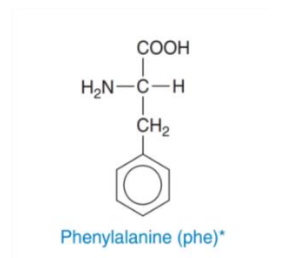
### 2.1. Définition

Les acides aminés aromatiques contiennent des systèmes cycliques stabilisés par mésomérie. Ils existent au nombre de trois : la Phe, la Tyr et le Trp.

La Phe et le Trp sont des AA indispensables, obligatoirement apportés par l'alimentation car il n'y a pas de biosynthèse endogène chez l'homme. A l'inverse, la Tyr est un AA non indispensable, synthétisé à partir de la Phe [20].



### 2.1.1. La Phénylalanine

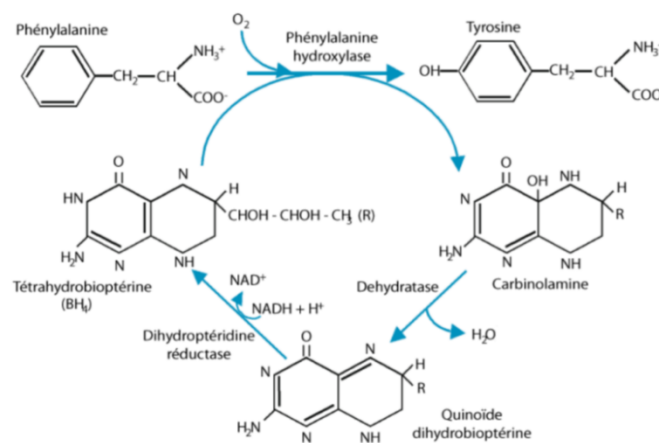


**Figure 2 : Structure de la phénylalanine [13].**

La phénylalanine a été découverte dans le lupin jaune par Schulze et Barbieri en 1879, et synthétisée par Erlenmeyer et Lipp trois ans plus tard. Dans la nature, la phénylalanine se trouve dans le lait maternel des mammifères, elle est codée pour l'ADN et les codons sont UUU et UUC [21].

C'est un acide aminé essentiel métabolisé dans le foie par une enzyme, la Phénylalanine hydroxylase, qui nécessite la tétrahydrobioptérine comme cofacteur (figure 3).

Il possède une chaîne latérale aromatique avec un radical à deux carbones possédant un groupe fonctionnel amine et un groupe fonctionnel acide, suivis d'un noyau aromatique (benzénique) très hydrophobe permettant de la classer comme non polaire. L'excès de phénylalanine dans le corps est connu comme la phénylcétonurie (PCU) [20,21,22].



**Figure 3 : Métabolisme de la phénylalanine [23].**

### 2.1.2. La Tyrosine

C'est un acide aminé aromatique, polaire, constitué d'un groupement COOH et d'un groupement NH<sub>2</sub>, qui intervient dans les liaisons peptidiques. Sa chaîne latérale est un noyau aromatique sur lequel est fixé un groupement hydroxyle. Il existe dans l'alimentation, mais l'organisme peut en produire également tout seul, à partir d'un autre acide aminé [24,25].

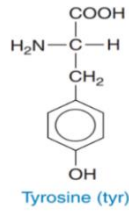


Figure 4 : Structure de la tyrosine [23].

### 2.1.3. Le Tryptophane

C'est un acide aminé aromatique, apolaire et hydrophobe, constitué d'un groupement COOH et d'un groupement NH<sub>2</sub>, qui intervient dans les liaisons peptidiques. Sa chaîne latérale est un hétérocycle indole. Il peut être apporté par l'alimentation. La carence en tryptophane se manifeste par un état anxieux, une tendance dépressive et des troubles du sommeil [24,25].

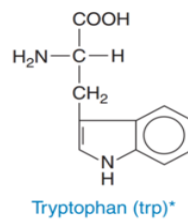


Figure 5 : Structure du Tryptophane [23].

## 2.2. Rôle physiologique

### 2.2.1. Phénylalanine et Tyrosine

La phénylalanine est utilisée comme précurseur dans la synthèse de la tyrosine à partir de laquelle sont formés d'autres composés contenant un cycle aromatique, comme la dopamine, et les composés connus sous le nom de catécholamines : épinéphrine (adrénaline), la norépinéphrine (noradrénaline) et la mélanine (pigment de la peau), ainsi que les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) [12,26]. (Figure 6).

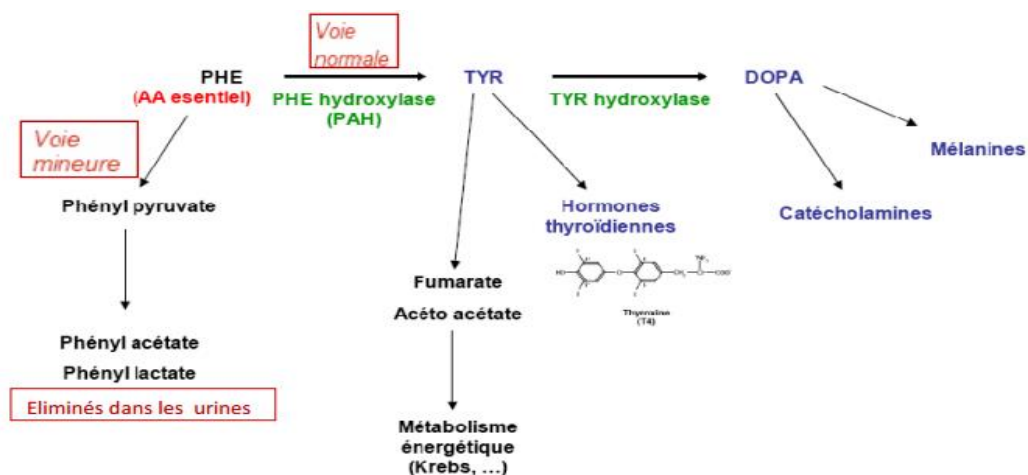


Figure 6 : Rôle physiologique de la Phe et la Tyr [9].



### 2.2.2. Tryptophane

Il participe à la synthèse de la sérotonine (= 5hydroxytryptophane : médiateur des synapses sérotoninergiques) grâce à la Trp hydroxylase et à son cofacteur : BH<sub>4</sub> selon les réactions suivantes :

- Tryptophane + O<sub>2</sub> + BH<sub>4</sub> → 5-hydroxytryptophane + BH<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O
- 5-hydroxytryptophane → Sérotonine + CO<sub>2</sub>.

C'est une hormone surnommée de la bonne humeur, a pour rôle de réguler l'humeur, l'appétit et le sommeil. Elle stimule également la production de l'hormone de croissance.

C'est le précurseur de la mélatonine par les deux réactions ci-dessous :

- Sérotonine + acetyl-CoA → N-acétylsérotonine + CoASH
- N-acétylsérotonine + S-adénosylméthionine → mélatonine + S-adénosylhomocysteine.

Ainsi que la nicotinamide-adénine di nucléotides (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) [12,12,20,24].

### 2.3. Métabolisme

Le métabolisme des AA aromatique est comparable à celui d'autres AA dans la plus part des tissus. La digestion des protéines alimentaires permet l'obtention des AA, qui transitent du sang vers les différents tissus, pour être catabolisés où permettre la synthèse de nouvelles protéines. Il existe un métabolisme spécifique des AA aromatiques dans certains tissus pour la production de protéine spécifique de diverses hormones (ex : glandes thyroïde et médullosurrénaliene), et des neurotransmetteurs [20].

#### 2.3.1. Synthèse

Les précurseurs des acides aromatiques sont l'intermédiaire de la glycolyse phosphoénolpyruvate (PEP) et l'érythrose-4-phosphate (un intermédiaire de la voie des pentoses phosphate). Leur condensation donne le 2-céto-3-désoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate, un composé en C<sub>7</sub> qui se cyclise et qui est finalement transformé en chorismate, le point de branchement pour la biosynthèse du tryptophane. Le chorismate est soit transformé en anthranilate puis en tryptophane, soit en préphénate puis en tyrosine ou en phénylalanine [10].

#### 2.3.2. Catabolisme

Le foie est le site majeur du catabolisme des squelettes carbonés d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) :

##### 2.3.2.1. La Phénylalanine et la Tyrosine

Elles sont catabolisées en acétoacétate et en fumarate ; et cela après une chaîne de différentes réactions [23] (Figure 8.A).



### 2.3.2.2. Tryptophane

La dégradation du tryptophane fait intervenir elle aussi plusieurs oxygénases. La tryptophane 2,3-dioxygénase clive le cycle pyrrole et la cynurénine 3-mono-oxygénase hydroxyle le cycle benzène restant. L'alanine est éliminée et une troisième dioxygénase clive l'acide 3-hydroxyanthranilique restant avec formation d'acétoacetyl CoA [23] (Figure 8.B).

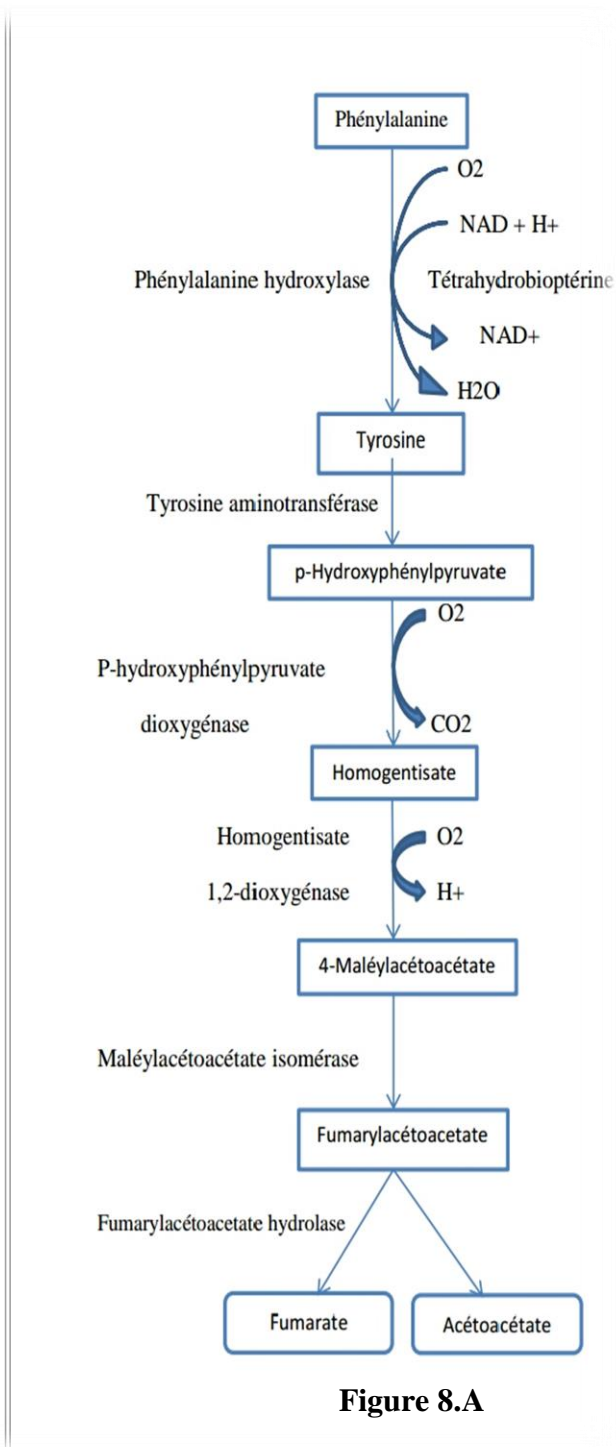
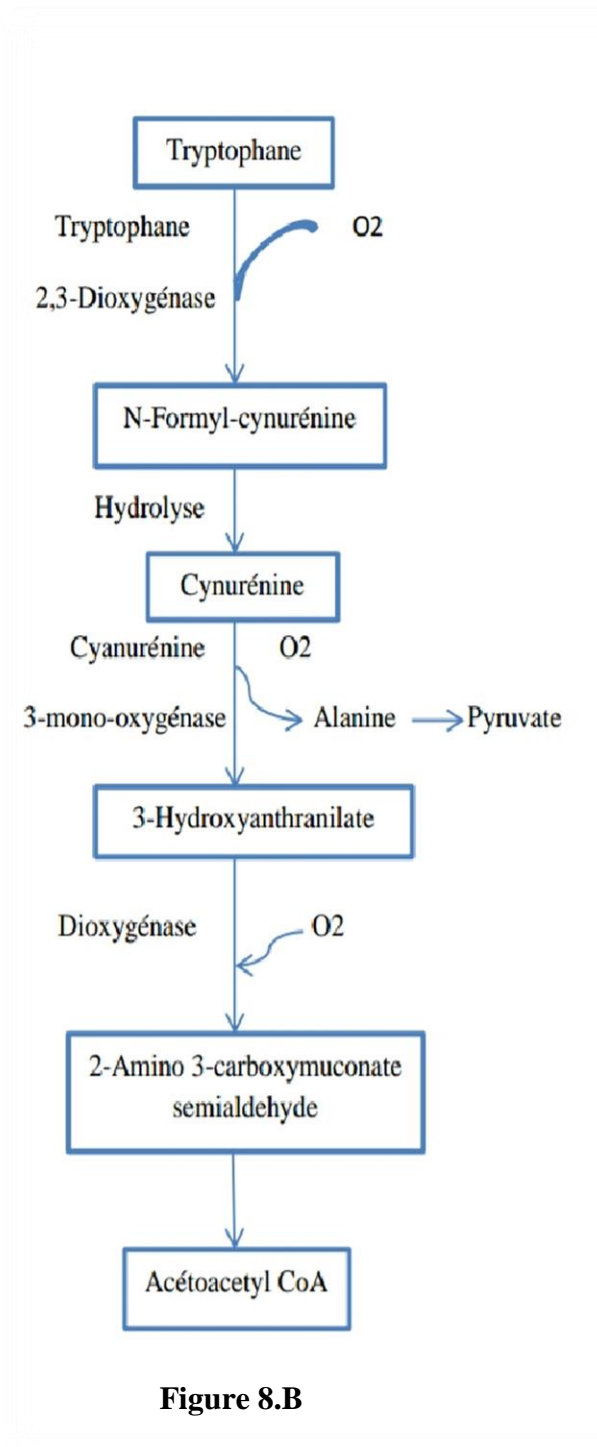


Figure 7 : Catabolisme des acides aminés aromatiques [23].



## 1. Historique

L'idiotie phénylpyruvique était le nom attribué à la PCU en 1934, par Dr Yvar Asbjorn Fölling (Norvège), qui a constaté que certains enfants atteints d'un retard mental profond avaient en commun la présence dans leurs urines d'un produit anormal (qui a été identifié des années plus tard : l'acide phénylpyruvique grâce à sa capacité de réduire le fer ferrique en fer ferreux dans les urines) ; il a montré, ensuite, que ces enfants avaient des taux plasmatiques élevés de phénylalanine. Dans les années 1950, le Pr Horst Bickel a suggéré l'exclusion de la phénylalanine de l'alimentation pour réduire son accumulation plasmatique. L'instauration d'un traitement précoce a vu le jour grâce à Robert Guthrie, en 1961, par une technique de dosage simple, peu coûteuse, de la phénylalanine dans le sang pour le dépistage [23,27].

## 2. Physiopathologie

La phénylalanine est hydroxylée en tyrosine grâce à la phénylalanine hydroxylase, enzyme dont le déficit est responsable de la phénylcétonurie. La Tétrahydrobioptérine (BH4) est le cofacteur indispensable de cette réaction d'hydroxylation, elle doit être synthétisée puis recyclée pour que la réaction d'hydroxylation puisse avoir lieu. Les déficits de synthèse ou de recyclage de ce cofacteur sont responsables de 2% des hyperphénylalaninémies [23].

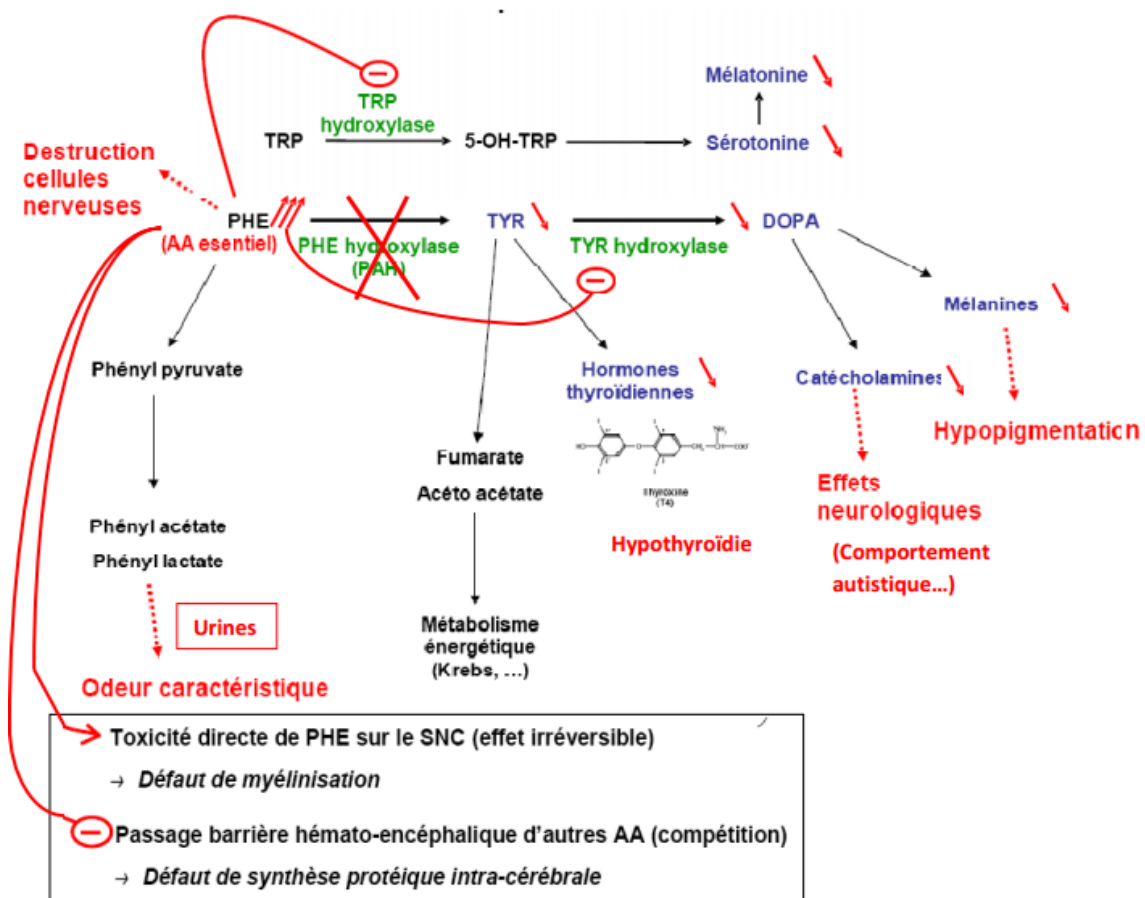


Figure 8 : Schéma de la physiopathologie de la Phe [9].



### 3. Définition de la PCU

La PCU est l'un des troubles héréditaires les plus communs du métabolisme des acides aminés et l'une des principales causes d'handicap intellectuel dans le monde entier. Elle est due pour 98% des cas à un déficit d'une enzyme exclusivement hépatique qui n'existe pas dans le cerveau : la phénylalanine-hydroxylase et qui permet la transformation de la phénylalanine en tyrosine, ou une anomalie de son cofacteur BH4 dans 1-2% des cas.

Le déficit de la PAH entraîne une augmentation de la phénylalaninémie qui est responsable de la toxicité et de la symptomatologie caractérisée par des troubles neurologiques graves, il englobe un large spectre de phénotypes, allant de l'hyperphénylalaninémie légère ne nécessitant pas de traitement à la PCU typique.

La PCU typique est actuellement définie par une concentration plasmatique de PHE > 20mg /100ml, rapidement atteinte dès la fin de la première semaine de vie et par la présence permanente et massive de métabolites urinaires [23,27,28,29,30].

Une classification a été proposée en fonction de la concentration plasmatique de Phe :

**Tableau 3 : Types d'hyperphénylalaninémies observés en fonction du taux plasmatique en Phe au dépistage [23,27].**

	Taux plasmatique en Phe au dépistage
<b>PCU typique</b>	> 20 mg/dl (1200 µmol/l)
<b>PCU atypique</b>	10 mg/dl (600 µmol/l) < <b>Phe</b> < 20 mg/dl (1200 µmol/l)
<b>Hyperphénylalaninémie modérée "HMP"</b>	6 mg/dl (180 µmol/l) < <b>Phe</b> < 10 mg/dl (1200 µmol/l)

La prévalence de la PCU varie entre 1/4000 à 1/40000 (la France et l'Islande sont les pays les plus touchés) [27].

### 4. La PCU maternelle

Des embryofœtopathies hyperphénylalaninémiques chez des femmes ayant une PCU non traitées pendant leurs grossesses ont été observées, car la phénylalanine en excès dans leur sang passe à travers le placenta et dans le sang de l'enfant, ce qui est hautement toxique pour le développement de l'embryon et du fœtus. Cette embryofœtopathie se traduit chez le nouveau-né par des malformations osseuses, cardiaques et oculaires congénitales, une microcéphalie, une hypotrophie et une arriération mentale avec un risque de fausse-couche important, Pour ces raisons, les femmes atteintes de PCU sont fortement encouragées à maintenir leur régime restreint à la phénylalanine à l'âge adulte [11,23,27].

### 5. La PCU chez l'adulte

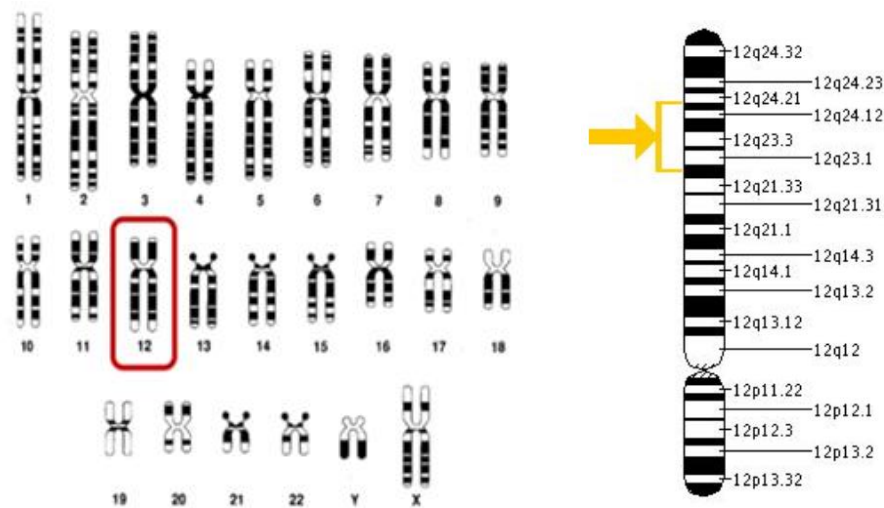
La phénylcétonurie non traitée peut se manifester chez l'adulte par des troubles neuropsychiatriques et des anomalies à l'IRM cérébrale se traduisant par des signes physiques



avec des maladies de la peau, des signes cognitifs et psychiatriques voir une diminution des émotions positives, une immaturité et un isolement social avec des attaques de panique ; ainsi que des troubles osseux. Le diagnostic des PCU chez l'adulte s'effectue généralement par un dosage des acides aminés plasmatiques [1,20].

## 6. Génétique

La PCU est une affection héréditaire transmise sur le mode autosomique récessif. Le gène de la Phénylalanine Hydroxylase est situé sur le chromosome 12q23.2 (figure 10), il est constitué de 13 exons couvrant 90 kb codant pour une protéine monomère de 452 acides aminés. Le gène en cause dans cette maladie n'est pas situé sur les chromosomes sexuels (les chromosomes X et Y), mais sur l'un des autres chromosomes, appelés « autosomes » elle peut donc apparaître aussi bien chez un garçon que chez une fille [31,32].



**Figure 9 : Localisation du gène PAH au niveau du chromosome 12 [33,34].**

## 7. Clinique

Les urines et la sueur des nourrissons ont souvent une odeur assez caractéristique (de paille mouillée ou de souris).

Pour les personnes qui n'ont pas été traitées dans l'enfance (ce qui est encore aujourd'hui le cas dans les pays où le dépistage néonatal n'est pas effectué), les manifestations de la maladie sont nombreuses et touchent principalement le système nerveux, donc elle se traduit essentiellement par des troubles neurologiques graves : retard mental, troubles du comportement, psychoses, spasmes en flexion et épilepsie. D'autres signes neurologiques peuvent apparaître comme une augmentation du tonus musculaire (hypertonie globale), des signes extrapyramidaux et des tremblements. Cette symptomatologie neurologique est associée à des troubles des phanères à type d'hypo-pigmentation globale, incluant une peau pâle, des cheveux blonds et des yeux bleus. L'eczéma semble aussi plus fréquent.



Vers l'âge de 3 ou 4 mois, l'enfant peut avoir des troubles du comportement qui se manifestent par une hyperactivité, une agressivité et des difficultés pour interagir avec son entourage et son environnement ; ces troubles ressemblent parfois à ceux de l'autisme. Le développement de son cerveau peut être insuffisant (microcéphalie), cela se traduit par un tour de tête (périmètre crânien) qui ne grandit pas aussi vite que la moyenne. L'enfant a aussi, souvent, un déficit intellectuel et psychomoteur important : par exemple, il tarde à tenir sa tête, s'asseoir, se mettre debout, marcher, attraper finement les petits objets, acquérir le langage et faire les apprentissages élémentaires (retard des acquisitions). Ce déficit se stabilise généralement après l'enfance, mais plus le diagnostic est tardif, plus il est irréversible.

Des réflexes vifs, une paraparésie spastique, des signes psychiatriques, une leucoencéphalopathie dans 93% des cas peuvent apparaître après l'arrêt du régime certains auteurs doutent que la phénylcétonurie peut causer la cataracte ou la syphilis ainsi que le surpoids et de l'obésité [21,27,31,32,35,36].

## 8. Diagnostic

Compte tenu de la possibilité de prévenir les dommages cérébraux, la détection précoce de la maladie était décisive. À partir du milieu des années 1960, le dépistage néonatal a été introduit dans de nombreux pays à travers le monde, y compris le test d'inhibition bactérienne, la fluorimétrie, dosage enzymatique, HPLC, CCM, MS-MS et électrophorèse capillaire (CE). Ils sont utilisés pour le diagnostic de la PCU, c'était le premier trouble métabolique qui pouvait être trouvé chez les nouveau-nés [37,38].

### 8.1. Dépistage néonatal

Le dépistage néonatal (DNN) a pour principe de rechercher, chez tous les nouveau-nés de la population générale ou d'une population à risque, certaines pathologies rares et graves, sans signe clinique extérieur présent à la naissance mais susceptibles d'entraîner des séquelles irréversibles. Ce diagnostic précoce permet aux malades repérés d'accéder au plus tôt à un traitement efficace pouvant modifier le cours de la maladie avant même l'apparition des symptômes. Il est réalisé en dosant la phénylalanine dans le sang (phénylalaninémie).

En 1968, Wilson et Junger définissent des critères spécifiques édités par OMS concernant les affections pouvant entrer dans le programme du dépistage néonatal cités ci-dessous :

- La maladie doit être grave et d'apparition précoce ;
- D'une fréquence suffisante (supérieure à 1/20 000 naissances) ;
- Détectable à un stade pré-symptomatique et accessible à un traitement efficace au stade préclinique ;
- Détectable par un test donnant lieu à un taux faible de faux positifs et à un taux quasi-nul de faux négatifs, peu coûteux, applicable à grande échelle ;
- Le dépistage doit être accompagné d'un protocole thérapeutique précis [27,32,39,40,41].



### 8.1.1. Dosage de la phénylalanine sur sang séché à la naissance (test de Guthrie)

Appelé couramment « dosage Guthrie » du fait de la mise en place de ce test par Robert Guthrie, en 1963, c'est un test d'inhibition de croissance bactérienne (BIA) permettant le dosage de la Phe. Ce principe repose sur la levée de l'inhibition de croissance de *Bacillus subtilis* due à la béta-2-thienylalanine (analogue de la Phe) par des pastilles, imprégnées de sang riche en Phe, déposées sur une gélose [20,21,41,42,43].

### 8.1.2. Techniques du dosage et de quantification

Plusieurs techniques d'analyse peuvent être utilisées pour l'analyse quantitative et semi-quantitative des concentrations de Phe à partir de sang capillaire ou veineux ou bien d'échantillon urinaire :

#### 8.1.2.1. Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse permet le dépistage de nombreuses maladies héréditaires du métabolisme à partir d'une seule tache de sang déposé sur carton. Elle vise essentiellement à analyser qualitativement et quantitativement différents types de mélanges complexes de métabolites biologiques. L'identification de ces métabolites repose sur la mesure de la masse des molécules et de leurs fragments ionisés, qui sont séparés et quantifiés sur la base de leur ratio masse moléculaire/charge ( $m/z$ ). Elle est basée ainsi sur la détection et la quantification d'AA et d'acylcarnitines qui s'accumulent lors du blocage métabolique.

Elle possède de nombreuses qualités dont sa spécificité, sa grande sensibilité et la grande variété de ses applications.

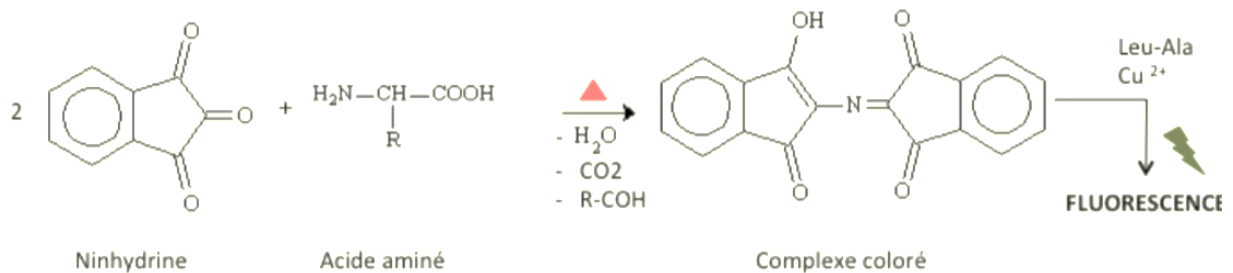
La spectrométrie de masse peut être utilisée sous divers modes analytiques :

- Mode balayage : pour détecter une gamme de ratio masse moléculaire / charge ( $m/z$ ) afin d'étudier tous les profils métabolique lié à la PCU ;
- Mode SRM : « selected reaction monitoring », mode d'analyse spécifique avec une valeur unique de  $m/z$ .

Les premières analyses du dépistage étaient faites en mode balayage. Actuellement, le dépistage utilise toujours le mode spécifique [40,44,45,46].

#### 8.1.2.2. Fluorimétrie

C'est une technique quantitative basée sur la réaction de la phénylalanine avec la ninhydrine en présence de cuivre pour former un complexe fluorescent. L'intensité de fluorescence étant en rapport avec la concentration de l'analyte, les dosages sont faits à l'aide de fluorimètres ou de spectrofluorimètres.



**Figure 10 : Principe de la méthode fluorimétrique [41].**

Comparée à la MS/MS, la fluorimétrie présente une sensibilité similaire mais une spécificité moindre, et par conséquent elle génère légèrement plus de faux positifs [15,20,47].

### 8.1.2.3. Technique Quantase

C'est une méthode enzymatique quantitative à la phénylalanine déshydrogénase qui catalyse la désamination oxydative NAD-dépendante de Phe en phénylpyruvate et ammoniac. Le NADH produit est mesuré par colorimétrie en utilisant un système de détection tétrazolium/accepteur d'électrons intermédiaire. Elle est destinée à mesurer la concentration en L-phénylalanine dans les échantillons de taches sanguines prélevées sur papier buvard, l'obtention de valeur élevée ne constituent pas en elles-mêmes un diagnostic de PCU, mais indiquent la nécessité urgente d'examiner plus en détails le nouveau-né dont l'échantillon s'est révélé à présomption positive [20,48].

### 8.1.2.4. Electrophorèse capillaire

En tant que nouvelle technique d'analyse, l'EC a pris de l'importance parmi les techniques de séparation disponibles pour l'analyse clinique, c'est une technique largement utilisée par les biochimistes essentiellement pour leurs analyses de nature protéomique. Les séparations sont principalement réalisées en présence de gels (amidon, polyacrylamide, agarose) sur des plaques. Les espèces chargées placées dans ce milieu, sont séparées sous l'action d'un champ électrique.

Certains avantages, tels que la puissance à haute résolution, le temps d'analyse court, la faible consommation de produits chimiques et d'échantillons, font de l'EC une méthode intéressante dans ce type d'investigation [37,49].

### 8.1.2.5. Chromatographies

#### - Chromatographie échangeuse d'ions

C'est une technique utilisée pour l'identification et la quantification des acides aminés à partir d'échantillons physiologique (sang, urines, liquide céphalo-rachidien) après déprotéinisation. L'analyseur automatique permet l'étude des caractéristiques chromatographique de nombreuses substances, ainsi que leur aptitude chromatiques après réaction à la ninhydrine. La détermination du profil d'acides aminés libres dans des échantillons de plasma déprotéinisé par IEC avec un AAA est considérée comme l'étalon-or pour le diagnostic et le traitement de la PCU, ainsi que d'autres troubles du métabolisme des acides aminés [20,50].



### - Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance est une technologie analytique polyvalente largement utilisée pour l'analyse de produits pharmaceutiques, de polymères de biomolécules et de nombreux composés organiques et ioniques. Elle est aujourd'hui l'une des techniques les plus utiles et les plus largement appliquées pour la séparation et l'analyse des mélanges chimiques, Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire.

Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire qui est fixe et la phase mobile dans un tube appelé colonne chromatographique [47,51,52,53].

### - Chromatographie planaire

Également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de l'HPLC, ayant sa propre spécificité. Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes.

Méthode sensible, de faible coût, pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle. L'appareillage actuel permet de maîtriser les trois étapes essentielles : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de concentration. Applicateurs et densitomètres automatiques ont ainsi conduit à la nano-CCM, une technique très sensible qui peut être couplée à la spectrométrie de masse [47].

#### 8.1.3. Test de sensibilité en BH4

Puisque la BH4 est également le cofacteur de la PAH, certains de ces troubles sont associés à une augmentation de la phénylalanine sanguine, ce qui conduit à une détection précoce par des programmes de dépistage néonatal. En effet, 20 mg de BH4 per os provoquent dans ce cas une chute de la phénylalanine dans les six heures qui suivent.

Le dépistage sélectif de la déficience en BH4, obligatoire chez tous les nouveau-nés présentant même des taux légèrement plus élevés de phénylalanine sanguine, est actuellement basé sur l'analyse de la néoptérine totale et de la bioptérine dans l'urine. Plus récemment, une méthode de mesure de Neo, Bio et ptérine dans des taches de sang séché par HPLC et détection fluorométrique a été décrite et s'est révélée efficace pour le diagnostic de patients atteints de déficiences en BH4. Aujourd'hui, la fiabilité de l'analyse en HPLC du profil urinaire des ptérines et le dosage sanguin de la DHPR sur Guthrie permettent de façon quasi absolue d'éliminer une anomalie du métabolisme du cofacteur de la PAH [54,55].



#### 8.1.4. Diagnostic différentiel

Il existe d'autres causes d'hyperphénylalaninémies hors la phénylcétonurie et les déficits des biotérines, le diagnostic différentiel se pose essentiellement devant un dépistage néonatal positif, c'est-à-dire un taux de Phe  $\geq 3$  mg/dl. Il y a un certain nombre d'hyperphénylalaninémies secondaires qu'il faut identifier :

- ✓ Avec hypertyrosinémie :
  - Hyperphénylalaninémie transitoire (prématuré +++);
  - Augmentation de la prise alimentaire de protéine ;
  - Maladie hépatique (incluant la galactosémie et la tyrosinémie).
- ✓ Sans hypertyrosinémie :
  - Hyperphénylalaninémie transitoire (prématuré +++);
  - Secondaire à un médicament (triméthoprime, méthotrexate, antifoliques) ;
  - Maladie inflammatoire sévère ;
  - Maladie rénale [23].

#### 8.1.5. Génotypage

La grande majorité de la PCU (> 95%) est causée par l'hérédité autosomique récessive des mutations inactivatrices fonctionnelles du gène de la phénylalanine hydroxylase (PAH), Plus de 950 mutations PAH ont été répertoriées. Il existe 528 variants d'ADN de la PAH, y compris des mutations faux-sens et non-sens, des mutations d'épissage introniques ainsi que de petites délétions et insertions, la plupart des patients atteints de PCU sont des hétérozygotes composites.

Un génotypage de la PAH peut être effectué mais ce n'est pas systématique. Ceci nécessite un prélèvement de 5 ml de sang sur EDTA.

L'identification des mutations du gène de la PAH des patients ayant une PCU a deux intérêts :

- Le premier est de pouvoir effectuer une corrélation génotype/phénotype dans la mesure où l'enfant est porteur de mutations dont l'effet sur le phénotype est connu. Ceci permet d'espérer une amélioration de la tolérance dans les premières années pour les enfants ayant au moins une mutation dite "faible" ;
- Le second intérêt est lié à l'analyse du caractère BH4-sensible dont on sait qu'il est lié à certaines mutations dont la liste se constitue progressivement [1,23,56].

#### 8.2. Dépistage prénatal

De manière générale, le diagnostic prénatal permet de savoir au cours de la grossesse si l'enfant à naître est ou non atteint d'une maladie afin d'éviter ses complications. Le diagnostic prénatal de la PCU n'est réalisable que par des études moléculaires des mutations familiales causales sur le gène PAH humain dans les biopsies fœtales prélevées par échantillonnage villositaire chorionique ou amniocentèse.



Actuellement, il existe deux tests de génotype : le premier est une approche alternative à l'analyse des mutations, le deuxième pouvant être utilisé est le séquençage de Sanger et l'amplification de sonde basée sur la PCR [32,56,57].

## 9. Traitement

L'objectif principal du traitement de la PCU est de maintenir la Phe sanguine à une concentration inférieure à 300  $\mu\text{mol/L}$  dans des limites sûres nécessaires aux besoins de croissance du phénylcétonurique [58].

### 9.1. Traitement diététique

Le traitement diététique débute généralement immédiatement après la confirmation du diagnostic de PCU chez les nouveau-nés et doit être poursuivi tout au long de leur vie.

Un régime oblige à limiter les sources de protéines dans l'alimentation (régime hypoprotidique). Ce régime doit être complété à l'aide d'un mélange d'acides aminés spécial de substitution des protéines, de vitamines et de minéraux.

En pratique, l'apport en phénylalanine est basé sur un système de parts, une part d'aliment naturel apportant une quantité connue de phénylalanine (20 mg) [32, 36,59]. (Annexe I)

### 9.2. Traitements médicamenteux

Le dichlorhydrate de saproptérine est une formulation synthétique de l'isomère 6R actif de BH4 qui a été homologué récemment, c'est un médicament augmentant l'activité résiduelle de la PAH, ce qui permet d'avoir un régime moins strict, voir dans certains cas, de ne pas y avoir recours. Il se présente sous forme de comprimés qui sont généralement pris une fois par jour. Ce traitement compense soit le déficit enzymatique PAH, soit l'insuffisance d'activité du cofacteur BH4 [27,32,60].

## 10. Suivi des patients phénylcétonuriques

Un suivi serré est recommandé afin de surveiller les niveaux de phénylalanine plasmatique, d'établir le niveau de tolérance à la phénylalanine dans le régime et de s'assurer de l'efficacité du traitement Il est réalisé dans des consultations pluridisciplinaires qui regroupent plusieurs professionnels de la santé. Un psychologue ou un psychiatre est impliqué dans ce suivi en cas de besoin.

La fréquence des consultations est variable : Rapprochées la première année (au moins mensuelles), elles deviennent de moins en moins fréquentes avec le temps. Les adultes sont en général suivis 1 à 2 fois par an.

Des dosages sanguins de phénylalanine sont réalisés régulièrement : généralement 1 fois/semaine avant trois ans, 2 fois/mois entre 3 et 5 ans, 1 fois/mois après 5 ans, puis 1 fois/trimestre à l'âge adulte, sauf chez les femmes enceintes ou désirant l'être. Un bilan nutritionnel est régulièrement demandé (tous les ans environ). Il se base sur les résultats



d'examens de sang et des urines (qui renseignent sur les carences éventuelles (anémie, manque de certaines vitamines...) ou les déséquilibres alimentaires.

Un suivi régulier de la minéralisation osseuse peut être utile. La technique employée est l'absorptiométrie (ou ostéodensitométrie) qui utilise des rayons X (radiographie) [32,46].



## **1. Généralités sur la validation**

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique [61].

Une analyse chimique doit suivre une procédure d'analyse (ou d'essai) écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, tests de conformité, rapport d'essai. Une procédure peut être soit :

- Quantitative permettant de mesurer la quantité d'analyte présente dans l'échantillon pour laboratoire ;
- De référence reconnue par des experts (exemple : pharmacopée) ;
- Alternative utilisée par le laboratoire à la place d'une procédure de référence [62].

Les exigences de la norme ISO 15189 précisent dans le paragraphe 5.5.2 que « le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaire pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e) »

Les méthodes utilisées peuvent être de deux types :

- Méthode reconnue et adoptée par le laboratoire : la validation et consistera en une vérification des performances au sein du laboratoire.
- Méthode développée ou adaptée par le laboratoire : la méthode devra être validée avec une évaluation des performances plus poussée [41].

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répandu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées [62].

Elle passe par différentes étapes qui visent :

- A tester la normalité de la distribution des mesures ;
- A estimer les composantes de l'incertitude de mesure, fidélité, justesse, spécificité ;
- A définir des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode ;
- La dernière caractéristique à être étudié dans le processus de validation est l'établissement des intervalles de référence [63,64].



### **1.1. Définition de la validation**

La définition de la validation analytique est donnée par plusieurs textes normatifs et réglementaires :

- **Définition selon la norme ISO/CEI 17025** : « la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [35].
- **Définition selon le guideline ICH Q2 (R1) 2015** : « ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé » [65].

### **1.2. Objectif de la validation**

L'objectif de la validation est de donner des garanties suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront suffisamment proches de la vérité.

En analyse biologique la validation a pour objectif de prouver les performances de la méthode de dosage et d'appuyer la fiabilité des résultats obtenu et ce dans des limites bien définies [62,66].

### **1.3. Aspects réglementaires de la validation**

La validation des procédures de dosage est un vaste sujet qui intéresse tant le monde scientifique que réglementaire depuis de nombreuses années.

Les principaux référentiels utilisés pour l'établissement du protocole SFSTP 2006 sont :

- Les documents ISO 5725 (Afnor X06-041) ;
- Le document ISO 17025 ;
- Les documents ICH chapitre Q2A où on a établi la définition et la terminologie de la validation finalisée en 1995, et on a décrit la méthodologie dans le chapitre Q2B finalisée en 1996 ;
- Les documents FDA (Guidance for Industry) ;
- La décision 2002/657/CEE (Sanco) de la Commission européenne ;
- Le guide SFSTP (1992) pour les analyses des spécialités pharmaceutiques ;
- Les guides SFSTP (1997 ,1998) relatif à la validation des méthodes d'analyse dans les milieux biologiques qui va nous servir de support pour notre étude ;
- Les articles relatifs à la Conférence de Washington (1990) [62].

### **1.4. Critères de validation**

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants [62] :



Tableau 4 : Les principaux critères de la validation [62].

Critères généraux	Critères employés pour certaines méthodes
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité-sélectivité ;</li> <li>- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;</li> <li>- Linéarité ;</li> <li>- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;</li> <li>- Justesse ;</li> <li>- Exactitude ;</li> <li>- Limite de détection ;</li> <li>- Limite de quantification ;</li> <li>- Intervalle de dosage ;</li> <li>- Sensibilité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilité de l'analyte ;</li> <li>- Rendement d'extraction (absolu et relatif) ;</li> <li>- Effet de dilution.</li> </ul>

### 1.4.1. Critères généraux

#### 1.4.1.1. La spécificité

Consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés,...).

Elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon [62,67].

#### 1.4.1.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

Elle traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». Elle peut être linéaire (droite). En effet, il existe des situations de non-linéarité.

Il est nécessaire que la fonction de réponse soit strictement croissante ou décroissante, c'est-à-dire monotone [62].

#### 1.4.1.3. Linéarité (des résultats d'essai)

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [62].

#### 1.4.1.4. La fidélité

La fidélité est un terme général ; exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans les conditions prescrites, elle fournit une indication sur les erreurs dues au hasard.



La fidélité peut être estimée sous plusieurs conditions, comme la répétabilité, la fidélité intermédiaire ou la reproductibilité [62,68].

✓ **Répétabilité**

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [62].

✓ **Fidélité intermédiaire**

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et en utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné [62].

✓ **Reproductibilité**

Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [62].

**1.4.1.5. La justesse**

Elle correspond à « l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essai et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée ». (Elle fournit une indication sur les erreurs systématiques) [41,62].

**1.4.1.6. Exactitude**

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [62].

**1.4.1.7. Le profil d'exactitude**

Combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance  $\beta$  calculés à différents niveaux de concentration et d'une ou plusieurs intervalles d'acceptabilité [68].

✓ **Limite de détection**

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [62].



### ✓ **Limite de quantification**

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [62].

#### **1.4.1.8. Intervalle du dosage**

C'est la région entre les niveaux supérieur et inférieur pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité [62].

#### **1.4.1.9. La sensibilité**

Elle peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte. Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse [62].

### **1.4.2. Critères employés pour certaines méthodes**

#### **1.4.2.1. La stabilité**

La stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères. Le contrôle de la stabilité s'effectue le plus souvent, en fonction de l'intervalle de dosage, à un ou deux niveaux de concentrations représentatifs de cet intervalle [62].

#### **1.4.2.2. Rendement d'extraction**

Le rendement d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue et d'autre part après l'injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner [62].

#### **1.4.2.3. Effet de la dilution**

Il doit également être testé afin de valider le protocole qui sera appliqué en routine pour diluer les échantillons dont la concentration dépasserait le seuil supérieur de l'intervalle de dosage [62].

### **1.5. Domaines d'application**

Les différents secteurs d'application visés par le présent guide sont :

- Les sociétés prestataires de services ;
- Les autorités réglementaires ;
- Les laboratoires officiels de contrôle ;
- Les industries des domaines d'activité suivants : chimie, pharmacie, biopharmacie, agroalimentaire, environnement, cosmétologie, etc... [62].



## **2. Les critères de finalisation d'une validation**

Afin de finaliser la validation, on doit passer par une première étape de comparaison par rapport à une méthode de référence et une seconde étape d'établissement des valeurs usuelles :

### **2.1. Comparaison**

La comparaison des méthodes consiste à comparer les résultats obtenus avec une méthode par rapport aux résultats obtenus avec une autre méthode. Elle permet d'estimer la comparabilité des résultats obtenus et de définir s'il existe un biais entre elles.

Elle se fait par :

- L'établissement du graphique de régression selon Passing Bablok permettant de mettre en évidence la corrélation entre les deux méthodes, avec en ordonnée la méthode de référence et en abscisse la méthode à tester ;
- La réalisation d'un diagramme des différences (différences observées en fonction du niveau de concentration) grâce à la méthode de BLAND ALTHMAN qui consiste à réaliser un graphe comportant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques, avec en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, Cette moyenne représente une estimation acceptable au plan technique en l'absence de connaissance préalable du biais existant entre les deux séries de données.

Les valeurs discordantes éventuelles devront être exploitées par le laboratoire afin de mener une analyse des causes et une analyse d'impact sur les divergences constatées entre les deux méthodes testées [41,69,70,71].

### **2.2. Etablissement des intervalles de référence**

L'intervalle de référence est la dernière caractéristique à être étudiée dans le processus de validation de la méthode. Elle est généralement étudiée en dernier lieu car l'intervalle de référence lui-même n'intervient pas dans la décision sur l'acceptabilité de la méthode et l'étude n'est pas nécessaire lorsque la performance de la méthode est inacceptable. Si la performance de la méthode est acceptable, il est important d'évaluer le (s) intervalle (s) de référence pour soutenir l'interprétation des résultats du test du patient [64].

#### **2.2.1. Terminologie**

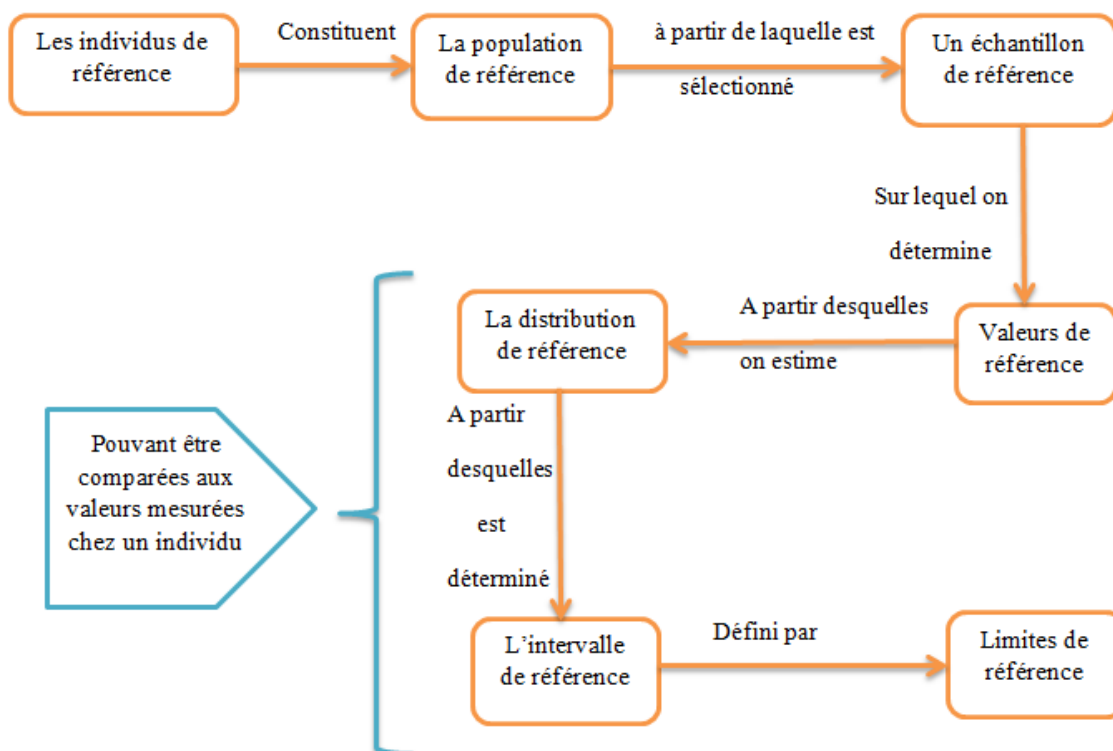
Les définitions qui suivent ont été approuvées par la Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC-LM), l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) ainsi que par l'Organisation mondiale de la santé :

- Valeur observée : valeur d'un analyte, obtenue par une observation ou une mesure d'un sujet à tester, qui doit être comparée à des valeurs de référence, une distribution de référence, des limites de référence ou un intervalle de référence ;



- Distribution de référence : la distribution des valeurs de référence ;
- Individu de référence : une personne sélectionnée sur la base de critères bien définis ;
- L'échantillon de référence : c'est un sous-ensemble formé d'un nombre adéquat d'individus issus de la population de référence ;
- Population de référence : un groupe constitué de tous les individus de référence ;
- Valeurs de référence : la valeur obtenue par l'observation ou la mesure d'une quantité définie sur un individu de référence [72,73].

La figure 1 présente les relations existant entre les différents termes définis ci-dessus : [72].



**Figure 11 : Relation entre les principaux termes des intervalles de référence [72].**

### 2.2.2. Définition de l'intervalle de référence

« Valeurs usuelles », « valeurs normales », « intervalle de référence », trois dénominations existantes pour cet outil aux intérêts multiples.

Le concept de valeurs usuelles est apparu à la fin des années 1960 grâce à des scientifiques scandinaves et particulièrement R. Gräsbeck et Saris.

Il s'est substitué au terme répandu mais peu précis de « valeurs normales ». Le mot normal peut avoir plusieurs connotations : statistiques, clinique (observer des maladies), épidémiologique.

Il correspond à l'intervalle spécifié de la distribution des valeurs obtenues à partir d'un groupe homogène d'individus en bonne santé sélectionnés en fonction de critères d'inclusion,



d'exclusion et de partition bien définis. Il est généralement défini pour un intervalle correspondant à 95 % de la population, centré sur la médiane.

L'intervalle de référence peut varier en fonction du type d'échantillon primaire retenu et de la méthode adoptée, dans certains cas, une seule limite de référence biologique peut être retenue, habituellement une limite supérieure de telle sorte que l'intervalle correspondant soit inférieur ou égal à cette valeur [72,74,75,76,77].

### **2.2.3. Stratégie de l'établissement des valeurs de référence sur une population saine**

La détermination des intervalles de référence repose sur des calculs statistiques. Ils sont purement descriptifs d'une population donnée, ils ne peuvent être adaptés systématiquement d'un pays à l'autre car les populations concernées ont des caractéristiques nutritionnelles, socio-économiques et environnementales qui les distinguent les unes des autres [73,77].

#### **2.2.3.1. Sélection des individus de référence**

La sélection impose la prise en compte de tous les facteurs de variations biologiques et pathologiques permettant de déduire les critères de partition pour les classer en différentes sous-classes (Age, sexe et la masse corporelle), et les critères d'exclusion qui visent à sélectionner des groupes d'individus en bonne santé en éliminant les individus malades ou à risques [72,73].

Elle peut être réalisée par deux techniques :

##### **✓ Technique d'échantillonnage directe (recommandée)**

Lorsque les critères d'exclusion et de partition sont bien définis avant la sélection des individus de référence, on parle de sélection a priori. Le processus de sélection sera mis en place avant le prélèvement sanguin.

Lorsque ces mêmes critères sont appliqués après que le prélèvement ait été fait on parle d'échantillonnage a posteriori [72].

##### **✓ Technique d'échantillonnage indirecte**

Les informations contenues dans une base de données d'un laboratoire ou d'un hôpital sont utilisées. Cette technique peut être employée principalement s'il est trop difficile de recueillir des échantillons de personnes en bonne santé (par ex. : pédiatrie, LCR...) [72].

#### **2.2.3.2. Préparation des individus pour le prélèvement et collecte d'échantillon**

Etape ayant pour but de préparer les individus sélectionnés pour la collecte de l'échantillon en adéquation avec les procédures habituellement utilisées pour les patients au laboratoire.

Le prélèvement peut être d'origines différentes, soit par ponction artérielle, par ponction veineuse ou un prélèvement capillaire effectué chez les petits enfants. La procédure de prélèvement doit être standardisée pour tous les individus avec la précision des conditions de stockage et de transport ainsi que les spécificités et la stabilité de certaines variables [72,73,78].



### **2.2.3.3. L'analyse biochimique par des méthodes fiables**

La fiabilité est la confiance accordée aux résultats obtenus à l'aide d'une méthode de dosage, et cela en fonction de sa sensibilité, sa spécificité, sa limite de détection, son exactitude et sa précision. Ces deux derniers critères doivent nécessairement être évalués ou réévalués de manière satisfaisante par un contrôle de qualité journalier à partir d'un sérum de contrôle [73].

### **2.2.3.4. Traitements statistiques et analyses des données**

Le but du traitement des valeurs de référence est de déterminer l'intervalle de référence de manière à pouvoir interpréter toute valeur observée ultérieurement dans les meilleures conditions [73].

Trois méthodes statistiques différentes ont été décrites dans les documents officiels de l'IFCC-LM et du CLSI :

#### **✓ La méthode paramétrique**

Cette méthode est applicable à des populations dont la distribution est normale (« gaussienne »). Elle est peu utilisée en biologie car les distributions observées étant le plus souvent asymétriques [72].

#### **✓ La méthode non paramétrique**

La méthode non paramétrique n'exige rien des lois de probabilités, elle est toujours applicable. Elle requiert cependant une sélection soigneuse des individus de référence et un nombre d'individus suffisant ( $\geq 120$ ). C'est la méthode que recommande actuellement l'IFCC-LM [72].

#### **✓ La méthode robuste**

Cette méthode a été introduite récemment dans le dernier document de l'IFCC/CLSI, décrite dans un ouvrage publié en 2005 par Horn et Pesce. Elle peut rendre des services lorsque le nombre de sujets est limité. Elle ne requiert pas que la distribution soit gaussienne. Sur le plan statistique c'est une méthode proche de la méthode paramétrique, sauf qu'elle mesure la position et la dispersion au lieu de la moyenne et de l'écart-type [72].

### **2.2.3.5. Mise en évidence et élimination des valeurs aberrantes (outliers)**

Si la sélection des individus de référence est faite correctement et si le processus analytique est bien contrôlé, il ne doit pas y avoir de valeurs aberrantes. Si leur nombre est trop élevé, la révision des critères d'exclusion et de partition s'impose [72].

### **2.2.3.6. Intervalles de confiance**

Les limites de référence calculées par l'un ou l'autre des procédés proposés précédemment ne sont qu'une estimation des centiles de la population étudiée.



Calculer les intervalles de confiance permettra à l'utilisateur de garder à l'esprit que cette variabilité est bien une réalité et donner ainsi une estimation objective de celle-ci. En conséquence, si l'intervalle de confiance paraît trop large, il est toujours possible à l'utilisateur d'élargir la taille de l'échantillon de référence pour atteindre une meilleure précision de l'intervalle de référence [72].

#### **2.2.4. Utilisations et intérêts**

##### **2.2.4.1. Intérêt dans le diagnostic médical**

L'établissement des valeurs de référence pour chaque constituant biologique permet aux cliniciens :

- ✓ De fixer une limite de décision adaptée à chaque cas particulier de patient ;
- ✓ De vérifier un état de santé chez un patient et de l'alerter sur les risques encourus ;
- ✓ De confirmer ou conforter un diagnostic médical ;
- ✓ De dépister une affection cliniquement non décelable [74].

##### **2.2.4.2. Intérêt dans le pronostic et le suivi thérapeutique**

L'étude comparative des valeurs de référence des populations saines et des valeurs des populations malades permet d'évaluer l'effet thérapeutique, et/ou de surveiller un risque dû à la prise de médicaments [74].

##### **2.2.4.3. Intérêt en épidémiologie**

- L'établissement des valeurs de référence permet de mesurer la prévalence de certaines pathologies dans une population à un échelon régional, national ou international ;
- Il permet également de suivre l'évolution à long terme des conditions de santé d'une population, de même les conditions de transmissibilité des valeurs de référence d'un laboratoire à l'autre, ou d'un pays à l'autre pourront être précisées ;
- Comparer la pertinence de plusieurs méthodes de mesure (en comparant la dispersion et l'erreur systématique de chacune d'entre elles) ;
- Comparer des populations pour apprécier des différences ethniques, de régime nutritionnel et de polymorphisme génétique ;
- Evaluer l'effet des facteurs d'environnement, par exemple un exercice intensif, les médicaments [73,76].

#### **2.2.5. Intervalles de référence de la Phe**

Les intervalles de référence de la Phe plasmatique et urinaire par rapport à la méthode HPLC sont résumés dans les tableaux ci-dessous :



**Tableau 5 : Valeur de référence de la phénylalanine plasmatique (en  $\mu\text{mol/l}$ ) [79].**

Catégorie d'âge	1 <sup>er</sup> jour de vie (N = 25)	6 à 18 ans (N) moyenne $\pm$ ET	Adultes	
			Femmes (N) moyenne $\pm$ ET	Hommes (N) moyenne $\pm$ ET
Concentration en phénylalanine	77 $\pm$ 14	(136) 58 $\pm$ 8	(102) 56 $\pm$ 8	(90) 65 $\pm$ 9

N : Nombre de patients.

ET : Ecart Type.

**Tableau 6 : Elimination urinaires de la phénylalanine (en  $\mu\text{mol/ Jour}$ ) [79].**

Catégorie d'âge	9 mois à 2 ans (N=15)		Adultes			
	Moyenne	Valeurs extrêmes	Femmes (N=9)		Hommes (N=6)	
Concentration en phénylalanine	/	/	Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyenne	Valeurs extrêmes
			80	40-250	80	50-90

N : Nombre de patients.



La Phe est un acide aminé essentiel, son excès est responsable de la PCU, maladie métabolique dont le diagnostic précoce permet d'éviter des séquelles irréversibles très graves chez les enfants atteints.

En vue d'établir un moyen efficace pour le dépistage des hyperphénylalaninémie, une méthode de dosage par HPLC fluorimétrie a été mise au point et validé selon les directives de la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) publiées dans la revue STP pharma pratique en janvier 2006.

Le premier objet de notre travail impliquant la mise en place d'une nouvelle méthode de dosage de la phénylalanine, correspond à une démarche de finalisation de la validation d'une méthode analytique. Il s'agit de l'étape de comparaison des méthodes et l'établissement des valeurs de références, exigences de la norme ISO 15189 avant la mise sur le terrain d'une nouvelle technique d'analyse [69].

## 1. Description de l'étude

Cette étude a été menée au sein du laboratoire de biochimie et de chimie analytique de la faculté de médecine de Tizi Ouzou. Elle s'est étalée sur une durée de cinq mois dans le but de compléter le chemin de validation par étude de comparaison et établissement des valeurs de référence chez la population pédiatrique et adulte.

La démarche de notre travail est ainsi agencée comme suit :

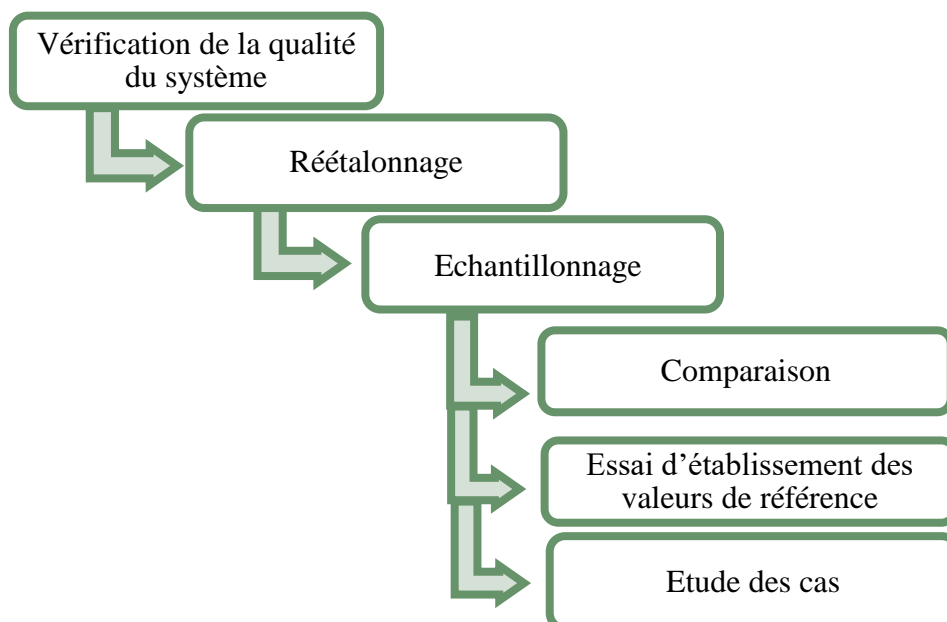


Figure 12 : Schéma de la méthodologie de travail.



## 2. Population d'étude

### 2.1. Population de l'étude de comparaison

Pour comparer les résultats de la méthode de dosage de la phénylalanine par HPLC (à tester) avec la méthode de dosage par simple fluorimétrie (prise comme référence, elle permettra ainsi de vérifier la justesse) ; nous avons établi une cohorte de 69 échantillons de patients. Selon les recommandations de la SFBC ; Cette cohorte devrait recouvrir de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré [69].

Cependant il est difficile d'avoir en cas d'une pathologie rare comme la PCU, quatre domaines de concentration en Phe plasmatique. De ce fait cette exigence n'a pas pu être respectée dans notre travail.

### 2.2. Populations pour l'essai d'établissement des valeurs de référence

La population de référence doit répondre à plusieurs critères et exigences afin d'éviter toutes interférences dans les résultats obtenus.

#### ✓ Critères d'inclusion/exclusion

Le choix de la population comporte des sujets pédiatriques, néonatalogiques et adultes indemnes de toutes pathologies hépatiques et rénales pouvant interférer dans le métabolisme du paramètre étudié, le diagnostic des médecins et les bilans biologiques ont permis de confirmer l'absence de ces pathologies.

La population choisie pour notre étude comprend 3 catégories d'âge réparties dans le tableau suivant :

**Tableau 7 : Répartition de la population de référence.**

Catégorie d'âge	Sexe	
	Féminin	Masculin
Pédiatrie	16	23
Néonatalogie	8	12
Adultes	6	27

La population pédiatrique et néonatalogique provient du service de pédiatrie et de néonatalogie du CHU de Tizi Ouzou.

#### ✓ Remarque

Plusieurs méthodes existent pour calculer l'intervalle de référence (voir chapitre III, titre 2.2.3.4) qui fixe un nombre minimal d'échantillons à respecter. Cependant selon les



recommandations SFBC quand il s'agit de la même population, le transfert de l'intervalle de référence de la méthode de référence est autorisé si les deux techniques sont comparables.






### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Matériels

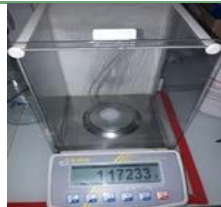


Le matériel utilisé dans le présent travail peut être résumé dans les tableaux suivants :

##### 3.1.1. Equipements

**Tableau 8 : Equipements utilisés dans le présent travail.**

Désignation		Spécification	Usage	
<b>HPLC</b>	Pompe	Lc20 at.	Séparation et Dosage	
	Injecteur automatique	SIL 20 A		
	Contrôleur	CBM-20		
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A		
	Colonne	C18 ; 15 cm		
	Détecteur	Fluorimètre		
	Logiciel d'exploitation	LC-solution		
<b>Distillateur</b>		DiaSYS Distribution France	Production de l'eau distillée	
<b>Pompe à vide</b>		Fisher bioblock scientific Pmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile	
<b>Sonicateur</b>		Advantage-LAB	Solubilisation.	
<b>Agitateurs magnétique</b>		NAHITA ModeL690-1	Homogénéisation des solutions.	










<b>Balance analytique</b>	KERN	Pesée.	
<b>Centrifugeuse</b>	Hettich-EBA20	Centrifugation et séparation.	
<b>Vortex</b>	VELP SCIENTIFIC A	Agitation et homogénéisation des échantillons.	

### 3.1.2. Autres matériels

#### 3.1.2.1. Verreries

Tableau 9 : Verreries utilisées dans le présent travail.

Verreries			
<b>Fioles jaugées de 10ml, 20ml, 25ml, 50ml, 100 ml, 1000 ml</b>		<b>Verres à montre</b>	
<b>Béchers</b>		<b>Entonnoirs</b>	
<b>Erlenmeyer</b>		<b>Vials</b>	
<b>Pipettes jaugées</b>			



## 3.1.2.2. Matériels accessoires et consommables




Tableau 10 : Matériels accessoires et consommables utilisés dans le présent travail.

Matériels accessoires			
Micropipette de 100µl, de 200 µl réglable, de 50µl et de 1000 µl		Portoirs	
Masques et lunettes de sécurité		Spatules	
Pissettes		Compte-gouttes	
Poire pro-pipette		Barreaux magnétique	
Matériels consommables			
Tubes à essai		Embouts à usage unique	
Tubes coniques		Gants	



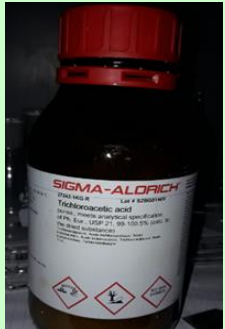
## 3.1.3. Matières premières

Tableau 11 : Matières premières utilisés dans le présent travail.





Matériau première	Provenance	Données physicochimiques	
<b>L-Phénylalanine</b>	SIFMA-ALDRECH	N° CAS : 63-91-2  Formule brute : $C_9H_{11}NO_2$  Mr : 165.19  Pureté : $\geq 99\%$	
<b>N – méthylphénylalanine Hydrochloride</b>	SIFMA-ALDRECH	N° CAS : 66866,  Formule brute : $C_{19}H_{13}NO_2$  Mr : 215.68  Pureté : $\geq 98\%$	
<b>Albumine humaine 20%</b>	Biotest	/	

## 3.1.4. Réactifs

Tableau 12 : Réactifs utilisés dans le présent travail.

Réactifs	Provenance	Données physicochimiques	
<b>Acide trichloracétique</b>	SIGMA ALDRICH	N° CAS : 76-03-9  Formule brute : $C_2HCl_3O_2$  Mr : 163.39  Pureté : $> 99\%$	



<b>Dihydrogénophosphate de potassium</b>	Fluka Chemika	N° CAS : 7778-77-0 Formule brute : $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Mr : 136.09 Pureté : > 99%	
<b>Eau distillée</b>	Préparée avec le distillateur LAB-TECH	N° CAS : 7732-18-5 Formule brute : $\text{H}_2\text{O}$ Mr : 18 g/mol $\rho$ : 1 g / $\text{cm}^{-3}$	
<b>Methanol grade HPLC</b>	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS : 67-56-1 Formule brute : $\text{CH}_4\text{O}$ Mr : 32,04 g/mol $\rho$ : 0,79 g / $\text{cm}^{-3}$	
<b>Acétonitrile grade HPLC</b>	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS : 75-05-8 Formule brute : $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ Mr : 41,05 g/mol $\rho$ : 0,8g / $\text{cm}^{-3}$	

### 3.2. Méthode

#### 3.2.1. Méthodes d'échantillonnage

##### 3.2.1.1. Collecte des échantillons

Nos échantillons ont été :

- Centrifugés dès leur réception ;
- Conservés au réfrigérateur ou au congélateur ;
- Analysés par HPLC.

Les échantillons utilisés dans l'étude de la comparaison ont été récupérés sous forme de plasmas congelés.



Concernant la détermination des valeurs de référence, les prélèvements ont été effectués essentiellement par une ponction veineuse au niveau du pli du coude pour les enfants et les nourrissons. En cas de difficultés, un prélèvement capillaire au talon a été réalisé.

Le sang est par la suite recueilli sur des tubes héparinés (contenant l'héparine de lithium comme anticoagulant), préalablement étiquetés et numérotés.

### 3.2.1.2. Traitement et conservation des échantillons

Les prélèvements servant à la détermination des valeurs de référence ont été acheminés vers le laboratoire de biochimie, centrifugés pendant 3 min à 3000 tours/ min. Par la suite, les plasmas ont été récupérés par des micropipettes et recueillis dans des tubes coniques puis conservés dans des conditions de température appropriés.

Ceux destinés à l'étude de la comparaison ont été récupéré sous forme congelé, on les a maintenu dans l'état de congélation jusqu'à leur analyse.

### 3.2.2. Méthodes analytiques

#### 3.2.2.1. Méthode HPLC

De nombreuses méthodes ont été décrites pour la quantification des taux de Phe dans le sérum ou le plasma pour le suivi des patients [80].

#### ✓ Sélection de la méthode de dosage

La chromatographie liquide à haute performance avec détecteur fluorimétrique a été choisie comme méthode de dosage de la Phe dans le plasma humain. En 2017, elle a été validée par le laboratoire de biochimie et de chimie analytique de la faculté de médecine de Tizi Ouzou.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, et exact dans l'intervalle [79.19 ; 300]  $\mu\text{mol/l}$  qui correspond à [13.08 ; 49.55]  $\text{mg/l}$  pour la phénylalanine avec un risque d'avoir au maximum 20% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-15% ; +15%] [3].

#### ✓ Principe du dosage

La méthode consiste à séparer par HPLC les acides aminés aromatiques présents dans un plasma hépariné déprotéinisé avec le TCA, et les quantifier par un détecteur fluorimétrique en présence d'un étalon interne la N- méthyl L-phénylalanine hydrochloride.

La technique met à profit la capacité des acides aminés aromatiques (Tyr et Phe) à s'exciter à une longueur d'onde de 210nm et à émettre une fluorescence à une longueur d'onde de 302 nm [3].



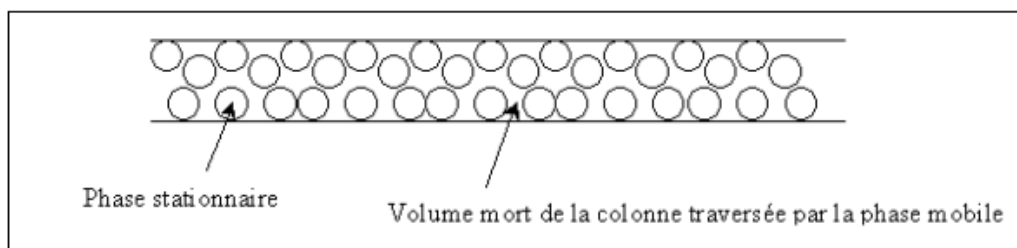
### 3.2.2.2. Analyse par HPLC

#### 3.2.2.2.1. Définition et principe

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est basée sur le partage de l'analyte entre une phase liquide mobile et une phase stationnaire solide très finement divisée [81].

L'échantillon est préalablement préparé, il est introduit dans le système par l'injecteur en tête d'une colonne remplie d'une phase stationnaire qui est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) ayant les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

L'échantillon est par la suite entraîné par la phase mobile qui est un liquide entraînant les solutés tout au long de la colonne [82].

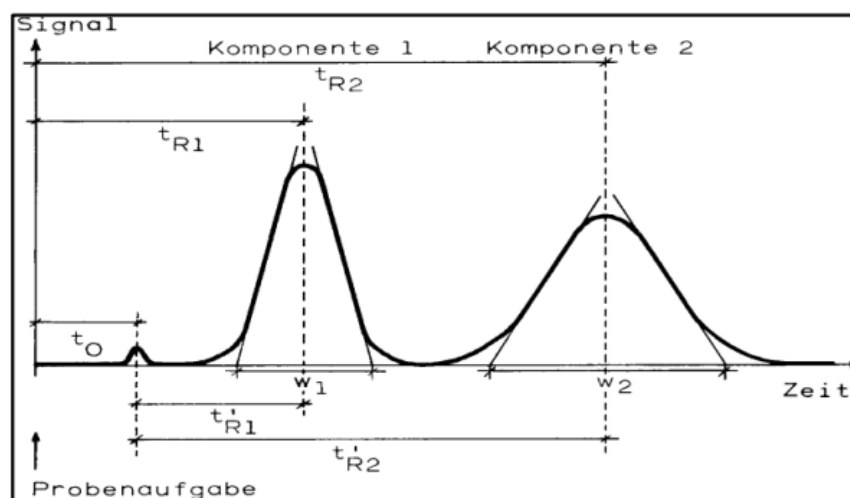


**Figure 13 : Schéma de la composition d'une colonne [82].**

Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de la colonne et grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [82].

Il existe pour chaque pic de chromatogramme une relation linéaire entre son air et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté [3].



**Figure 14 : Exemple d'un chromatogramme [81].**



### 3.2.2.2.2. Appareillage

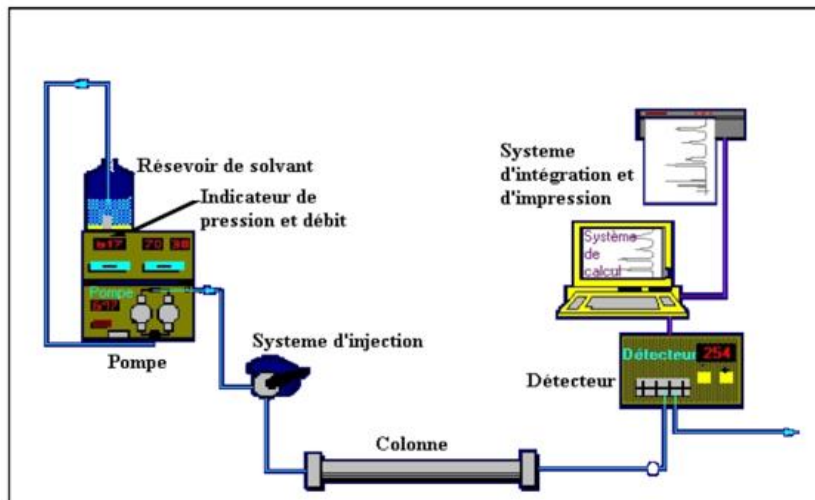


Figure 15 : Schéma de principe d'une chaîne HPLC [83].

#### ✓ Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon.

Les phases mobiles doivent être exemptes de particules donc une filtration et un dégazage sont nécessaires avant de remplir le réservoir [3,81].

#### ✓ Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile à un débit constant et à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler en mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

D'autres appareils peuvent passer au mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant en fonction du temps [84].

#### ✓ Injecteur

L'injection de l'échantillon se fait automatiquement [84].



### ✓ Colonne

C'est l'élément majeur de la chaîne HPLC puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur et de diamètre interne variants.

La colonne utilisée pour la séparation de la Phe et de la Tyr est remplie d'une phase stationnaire apolaire de type inversée, elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 atomes de carbones (C8) [84].

### ✓ Détecteur

Le détecteur est un système placé en sortie de la colonne permettant le suivi en continu de la composition de l'éluât (phase mobile + soluté du mélange). Au moment du passage de la substance par la cellule de détection, le détecteur donnera un signal d'intensité proportionnelle à la quantité de cette substance.

Il existe plusieurs détecteurs, leurs choix dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires [83,84].

Notre technique met à profit la capacité de la Phe à s'exciter à une longueur d'onde de 210 nm et à émettre une fluorescence à une longueur d'onde de 302 nm, donc le détecteur choisi dans ce cas est le fluorimètre.

### ✓ Matériels informatiques (ordinateur muni d'un logiciel d'intégration)

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de la Phe qui traverse le détecteur fluorimétrique. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Une intégration de ce dernier consiste à mesurer la surface sous pic [82,83,84].

L'identification du soluté est possible grâce à son temps de rétention qui est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant [82,83,84].

#### 3.2.2.3. Rappel du protocole de validation

Dans le but de valider la technique de dosage plasmatique de Phe et de Tyr par HPLC, un logigramme de la SFSTP a été suivi permettant de sélectionner le protocole de validation, et vu la non connaissance préalable de la procédure de dosage et la possibilité de la présence d'un effet matrice et que l'étalonnage ne se fait pas à un seul point, la sélection du protocole V4 modifié (avec cinq niveaux de concentration) proposé par la SFSTP 2006, était le choix convenable.

Le protocole exige trois jours de validation (3 séries), chaque jour comporte :



### ✓ Deux standards d'étalonnage

Un avec matrice, réalisé dans un pool de plasma hépariné ; et l'autre sans matrice préparé dans une solution d'albumine à 40g/l pour leurs faire subir les mêmes étapes de préparation de l'échantillon que le plasma, à savoir la déprotéinisation et les différentes dilutions. Chacun de ces standards d'étalonnage a subi deux répétitions.

### ✓ Un standard de validation

Réalisé dans un pool de plasma héparine, avec trois répétitions. Le choix était de travailler avec cinq niveaux de concentration.

Le choix des niveaux de concentrations de la Phe est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir les valeurs physiologiques et pathologiques de la Phe dans le plasma.

Pour le dosage en milieux biologiques, et à partir des propositions données par la SFSTP, la limite d'acceptabilité  $\lambda$  est fixée à 15% [3].

#### 3.2.2.3.1. Réactifs et matières premières utilisés

- Solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.015 M (phase mobile) ;
- Solution de HCl 0.1M ;
- Acide trichloracétique 0.33 M ;
- Solution d'albumine à 40g/L ;
- Etalon interne 6000 $\mu\text{M}$  [3].

#### 3.2.2.3.2. Mode opératoire de la validation

Le mode opératoire de la validation est résumé dans le schéma ci-dessous :

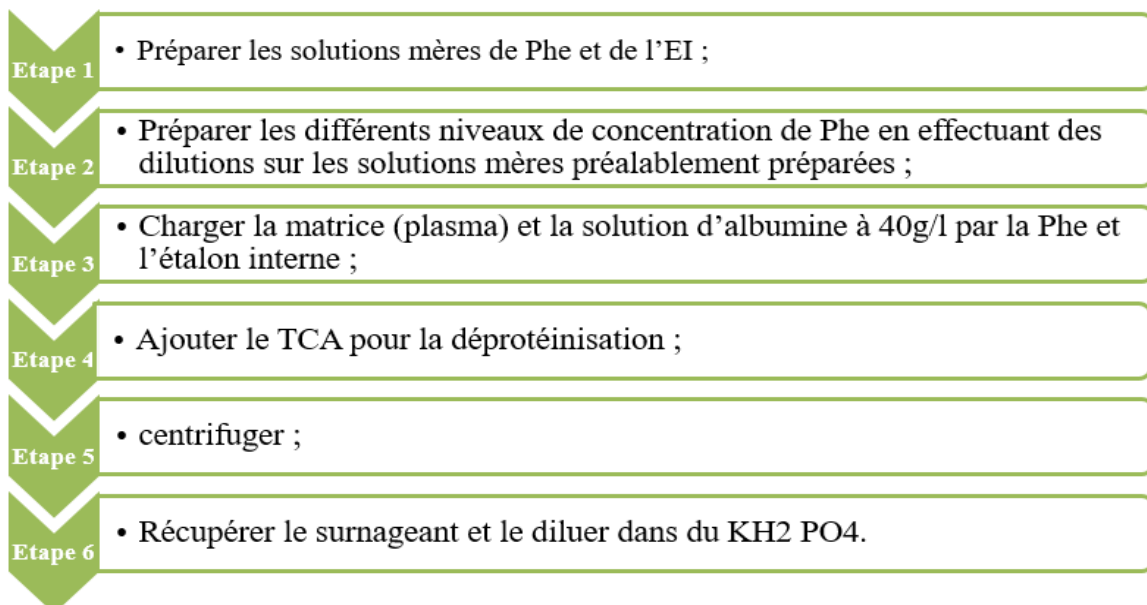


Figure 16 : Schéma du mode opératoire de la validation [3].



**Tableau 13 : Conditions chromatographique de la méthode [3].**

<b>Colonne</b>	C8, longueur 15 cm
<b>Détection</b>	$\lambda$ émission= 302nm $\lambda$ excitation =210nm
<b>Volume d'injection</b>	10 $\mu$ l
<b>Débit</b>	0,8 ml/min
<b>Température</b>	Ambiante

#### 3.2.2.4. Préparation des réactifs

##### ✓ Préparation de la phase mobile (solution de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.015 M)

Dans un verre de montre peser 4.08g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  puis les verser dans une fiole de 2L à l'aide d'un entonnoir, ajouter de l'eau distillée puis agiter avec l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale et compléter au trait de jauge par l'eau distillée.

Avant son utilisation, la phase mobile doit être filtrée et dégazée.

##### ✓ Préparation de la solution d'albumine à 40g/L

A l'aide d'une pipette, prélever 10ml de la solution d'albumine à 20% les verser dans une fiole de 50ml, ajouter de l'eau distillée et compléter au trait de jauge.

##### ✓ Préparation du TCA (Acide trichloracétique) 0.33M

Dans un verre de montre, peser 2.72g de TCA les dissoudre dans une fiole de 50ml avec de l'eau distillée, agiter avec l'agitateur magnétique et compléter avec le solvant au trait de jauge.

##### ✓ Préparation de l'étalon interne 6000 $\mu$ M

Dans une fiole de 20 ml peser 25.85 g de EI, ajouter l'eau distillée, le dissoudre au sonicateur pendant 4min, compléter avec le même solvant au trait de jauge.

#### 3.2.2.5. Etalonnage

L'étalonnage externe est une méthode de quantification basée sur la comparaison de deux chromatogrammes (étalonnage et dosage) obtenus successivement et dans des conditions chromatographiques strictement identiques.

Elle exige un étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnue, pour cela, on procède en deux étapes :

- D'abord construire la courbe d'étalonnage ;
- Puis faire des mesures sur les échantillons inconnus et calculer leurs concentrations à l'aide d'un modèle d'étalonnage [81].



Pour notre étalonnage, nous avons préparé deux solutions mères par la pesée de deux quantités différentes de la Phe, puis réalisé plusieurs dilutions à cinq niveaux de concentrations selon les étapes ci-dessous :

### **Etape 1 : Préparation des solutions mères à 3000 $\mu$ mol/l qui correspond à 495.57 mg/l.**

A l'aide d'une balance nous avons pesé deux quantités différentes de la Phe :

- SM(a) : PE = 49.60 mg.
- SM(b) : PE = 49.49 mg.

Dissoudre les masses dans deux fioles jaugées de 100 ml par l'eau distillé jusqu'au trait de jauge.

### **Etape 2 : Dilution des solutions mères**

La gamme des concentrations est obtenue par dilution des solutions mères, pour chaque solution mère de Phe, quatre dilutions sont effectuées :

#### **Dilution 4/5**

Nous avons prélevé 20 ml de la solution mère à l'aide d'une pipette graduée de 20ml et nous les avons versé dans une fiole de 25 ml, puis complété au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### **Dilution 3/5**

Nous avons prélevé 15ml de la solution mère à l'aide d'une pipette graduée de 20ml et nous les avons versé dans une fiole de 25 ml, puis complété au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### **Dilution 2/5**

Nous avons prélevé 10 ml de la solution mère à l'aide d'une pipette graduée de 10 ml et nous les avons versé dans une fiole de 25 ml, puis complété au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### **Dilution 1/5**

Nous avons prélevé 5 ml de la solution mère à l'aide d'une pipette graduée de 5 ml et nous les avons versé dans une fiole de 25 ml et complété au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### **Etape 3 : Chargement de la matrice et la solution d'albumine à 40g/l par la phénylalanine et l'étalon interne**

Nous avons préparé une série de tubes à essais, dans chaque tube préalablement étiqueté nous avons introduit 400  $\mu$ l de l'albumine à l'aide d'une micropipette, nous avons ensuite ajouté 50 $\mu$ l d'étalon interne, 50 $\mu$ l de la solution de Phe correspondant à chaque niveau de concentration, et cela à l'aide d'une micropipette, une agitation au vortex pendant 30 seconde pour finaliser cette étape.

**Etape 4 : Déprotéinisation**

A l'aide d'une micropipette, nous avons ajouté dans chaque tube à essai 1.5 ml du TCA, une formation d'un précipité blanchâtre a été observée.

**Etape 5 : Centrifugation**

Centrifugation des tubes à essai à 6000tr/min pendant 20 min.

**Etape 6 : Dilution dans du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$** 

Nous avons obtenu une séparation des composés sous forme de précipité et de surnageant, cela a facilité de récupérer 500  $\mu\text{l}$  de ce dernier à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, et les diluer par l'ajout de 4 ml (dilution 1/9) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Enfin, la méthode d'analyse exige de remplir les échantillons dans des vials appropriés, cela après une agitation au vortex pendant 30 secondes afin de les homogénéiser.

**Etape 7 : Analyse des échantillons**

Le dosage se fait par HPLC avec une détection fluorimétrique à une longueur d'onde d'excitation de  $\lambda=210\text{nm}$  et une longueur d'onde d'émission de  $\lambda=310\text{ nm}$ , avec un volume d'injection de 10  $\mu\text{l}$  et un débit de la phase mobile de 0.8ml /min, le temps d'analyse pour chaque échantillon est de 12min à température ambiante.

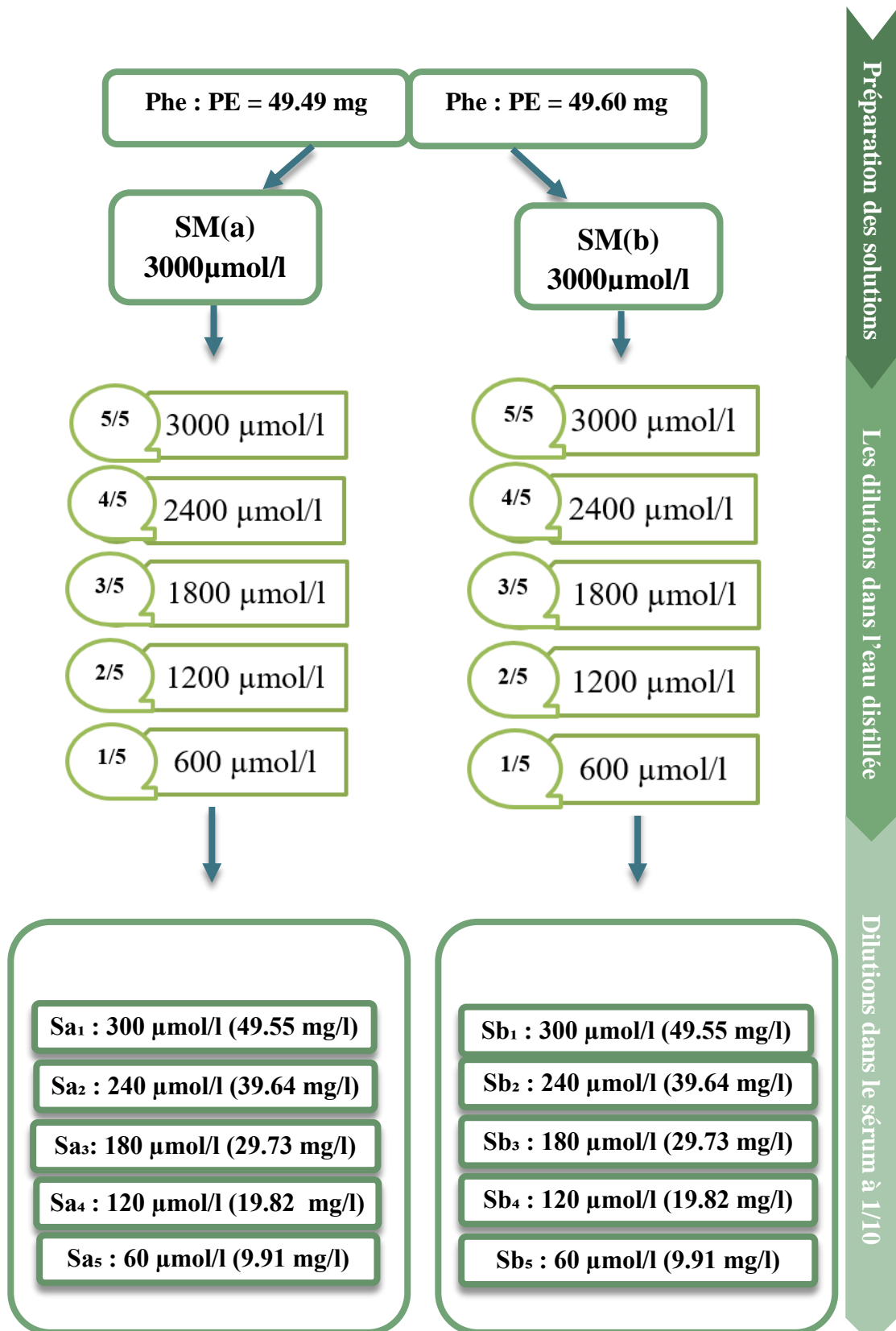


Figure 17 : Dilutions des solutions de la phénylalanine.



### 3.2.2.6. Qualité du système

#### ❖ Conformité du système chromatographique (Suitability system)

Le test suitability system renseigne sur l'aptitude du system chromatographique à effectuer l'analyse suivant des critères préétablis. Elle est démontrée en injectant 6 fois la solution standard 100% de la limite d'acceptation, soit une solution à 3000  $\mu\text{mol/l}$  en phénylalanine.

Les surfaces du pic de la phénylalanine seront enregistrées.

Les paramètres à évaluer sont :

- Ecart type relatif des aires du pic de la phénylalanine RSD ;
- Nombre de plateaux théoriques (N) ;
- Facteur de symétrie  $A_s$  ;
- Facteur de rétention  $K'$ .

### 3.2.2.7. Protocol d'analyse des échantillons

#### ✓ Mode opératoire

Le protocole de dosage comporte plusieurs étapes avant l'obtention des échantillons à analyser :

- Prélever 450  $\mu\text{l}$  de plasma hépariné dans un tube à essai à l'aide d'une micropipette réglable ;
- Ajouter 50  $\mu\text{l}$  de l'étalon interne à l'aide d'une micropipette de 50  $\mu\text{l}$ , cette étape a pour but d'améliorer la précision de la quantification et de la mesure et de palier aux problèmes liés aux erreurs de la dilution et des volumes utilisés, surtout la dernière étape de dilution avec le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , une correction par multiplication du résultat fois le facteur 10/9 est nécessaire ;
- Introduire 1.5 ml de TCA au moyen d'une micropipette ayant pour rôle la déprotéinisation ;
- Après avoir bien mélangé au vortex, une étape de centrifugation à 6000 trs/min pendant 20 min est nécessaire ;
- La séparation des deux composés du mélange conduit à l'obtention d'un surnageant et d'un précipité blanc ;
- Récupérer 500  $\mu\text{l}$  de surnageant obtenue grâce à une micropipette de 500  $\mu\text{l}$  et le diluer avec 4 ml de la phase mobile  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; puis le passer dans le vortex pendant 30 secondes ;
- Remplir les Vials et les analyser par HPLC.

Le mode opératoire est résumé dans le schéma ci-dessous :

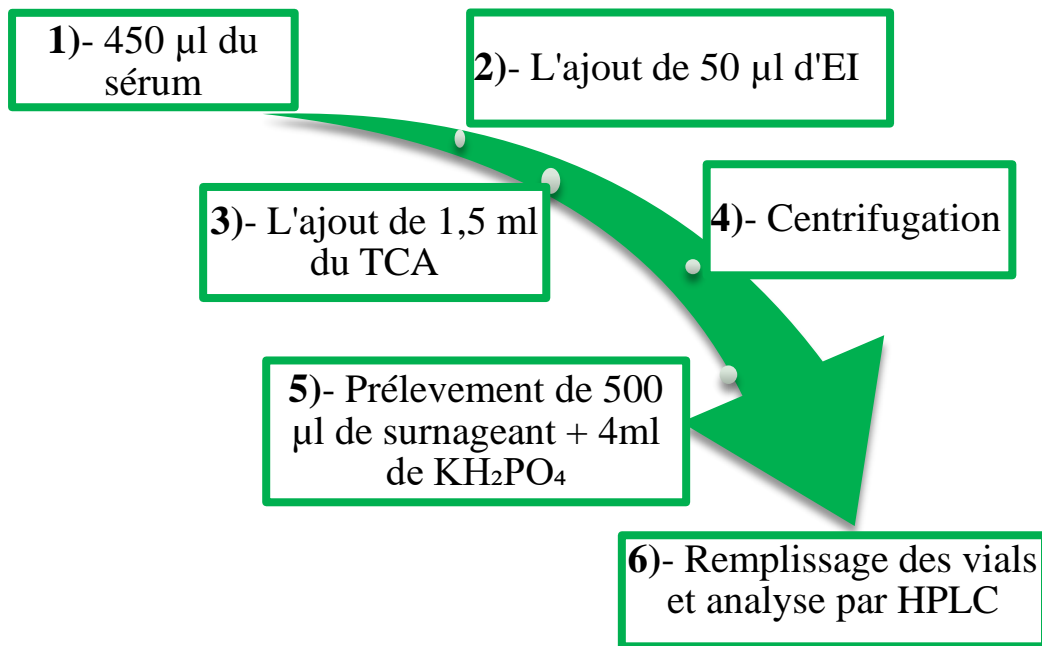


Figure 18 : Schéma des étapes du dosage de la Phe.

#### ✓ Lavage de la colonne

Cette étape a pour but d'éliminer les interférents faiblement retenus sur l'adsorbant sans altérer la rétention des solutés d'intérêt. Elle peut être multipliée ; les lavages multiples améliorent très nettement la propreté de l'extrait contribuant à la qualité de l'analyse [84].

La matière biologique est chargée, et pour cela le dosage de la Phe nécessite un lavage de la colonne utilisée au moyen de plusieurs réactifs et en passant par plusieurs étapes :

- 1)- La première étape consiste à un lavage par du méthanol pur pendant 30 minutes ;
- 2)- Ensuite, passage de l'acétonitril pur pendant 30 minutes ;
- 3)- Puis passage d'un mélange contenant du méthanol et d'eau (50/50) pendant 30 minutes ;
- 4)- Par la suite le mélange Acétonitril/eau (50/50) doit circuler ainsi pendant 30 minutes ;
- 5)- Enfin, un rinçage par de l'eau pur pendant 30 minutes est favorable.

#### 3.2.3. Comparaison

La méthode de dosage de la Phe par HPLC, nouvelle méthode mise au point, est comparée à une méthode fluorimétrique (Mac Camman-Robbins) utilisée en routine dans les laboratoires de biochimie pour le dosage de la Phe dans le plasma humain.

Dans le cadre de l'extension du dosage plasmatique de la Phe, des échantillons de patients ont été dosés en simple avec les deux techniques.

L'exploitation des résultats repose sur :



- ✓ La construction d'un graphique de Bland-Altman : Il représente les différences observées entre les résultats des deux méthodes en fonction des moyennes des résultats, permettant de définir un éventuel biais.
- ✓ Etablissement de la droite de régression des moindres rectangles [41].

### Description de la méthode fluorimétrique utilisée en routine

Le dosage de la phénylalanine sérique se fait par une méthode fluorimétrique (Mac Camman-Robbins) :

#### - Principe

La phénylalanine forme un complexe fluorescent à chaud (60°C) en présence de la ninhydrine. La réaction est optimisée dans un milieu réactionnel à pH=5.9 (tampon succinate) et de L-Leucyl-L-Alanine. Le réactif cuivrique est ajouté pour stabiliser le complexe fluorescent et favoriser le signal.

#### - Prélèvement et préparation des échantillons

Prélèvement sur tube hépariné ou papier buvard, le patient doit être à jeun.

Les prélèvements sur tube sont centrifugés et les sérums obtenus nécessitent une défécation. Le surnageant récupéré est congelé à -20°C.

#### - Gamme d'étalonnage de la phénylalanine

A partir d'une solution mère de phénylalanine à 100 mg/l on prépare les dilutions suivantes : 10, 20, 40, 80 et 100 mg/l.

Solution mère de phénylalanine : dissoudre 100 mg de phénylalanine dans 100 ml de TCA 0.3N.

**Tableau 14 : Gamme d'étalonnage de Phe pour la méthode fluorimétrique.**

[PHE] mg/l	10	20	40	80	100
VSM (ml)	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5
TCA 0.3N (ml)	4.95	4.90	4.80	4.60	4.50

#### - Mode opératoire

- ✓ Défécation volume à volume de sérum avec le TCA 0.6N ;
- ✓ Agiter au vortex, attendre 10 min puis centrifuger pendant 10 min à 3000 tours/min ;
- ✓ Récupérer le surnageant et congeler à -80°C ;
- ✓ Solution de travail (réactif extemporané).

Mélanger successivement :

- ✓ 5 volumes du tampon succinate ;
- ✓ 1 volume du dipeptide ;



- ✓ 2 volumes de la ninhydrine.

La solution peut se conserver un mois à +4°C (à l'abri de la lumière).

- ✓ Utiliser 2 témoins comme contrôle, un négatif et un positif.

**Tableau 15 : Mode opératoire du dosage de la Phe pour la méthode fluorimétrique.**

	Blanc	Étalon/ témoin / dosage
<b>TCA 0.3 N</b>	20 µl	
<b>Étalon/ surnageant de défécation (témoin/dosage)</b>		20 µl
<b>Solution de travail</b>	80 µl	80 µl

- ✓ Agiter au vortex et incuber pendant 2h au bain marie à 60°C ;
- ✓ Refroidir à -12°C pendant 5 min ;
- ✓ Rajouter 700 µl de réactif cuivrique dilué au 1/3 ;
- ✓ Mélanger au vortex ;
- ✓ Déposer 300 µl de chaque échantillon dans les puits de la microplaque de lecture (en double) ;
- ✓ Attendre 10 min puis faire la lecture au fluorimètre.

- **Lecture**

- ✓ Excitation à  $\lambda = 390$  nm.
- ✓ Emission à  $\lambda = 480$  nm.

- **Calcul des résultats**

- ✓ Calculer la moyenne des DO des 2 lectures pour le blanc, étalons, témoins, et les dosages ;
- ✓ Soustraire la DO du blanc des DO des étalons, témoins et les dosages ;
- ✓ Calculer le facteur selon la formule suivante :
 
$$F = \frac{\sum [\text{étalons}]}{\sum (\text{DO étalon} - \text{DO blanc})}$$
- ✓ Multiplier les DO des témoins et dosages par le facteur obtenu ;
- ✓ Multiplier les résultats obtenus par l'inverse de la dilution ( $\times 2$ ).

**Les valeurs usuelles : 10-40 mg/l**

- **Les limites de décision cliniques :**

- ✓ [40 – 200] mg/l : hyperphénylalaninémies modérées ;
- ✓ > 200 mg/l : PCU typique.



### **3.2.4. Essai d'établissement des valeurs de références**

Le choix de la méthode utilisée dans l'établissement des valeurs de référence est basé sur le nombre d'échantillons et la distribution des valeurs obtenues.

La distribution est déterminée par le test de normalité.

L'élimination des valeurs aberrantes est réalisée via les deux tests de Grubbs et de Dixon.



## 1. Rappel des principaux résultats de validation

### 1.1. Fonction de réponse

Dans le but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante de futures mesures qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité, il a été étudié cinq modèles reliant les rapports des surfaces des pics ( $\frac{\text{aire de phe/tyr}}{\text{aire de EI}}$ ) aux concentrations introduites.

#### 1.1.1. Modèles étudiés

- Droite :  $y = bx + a$
- Droite passante par 0 :  $y = bx$
- Logarithme népérien :  $\text{Lny} = f(\text{Lnx})$
- racine carrée :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$
- Fonction polynomiale :  $y = cx^2 + bx + a$

Avec :

- $x$  : la concentration introduite ;
- $y$  : la réponse, qui est le rapport entre l'aire du pic de l'échantillon observé et l'aire du pic de l'étalon interne.

#### 1.1.2. Choix de la fonction de réponse

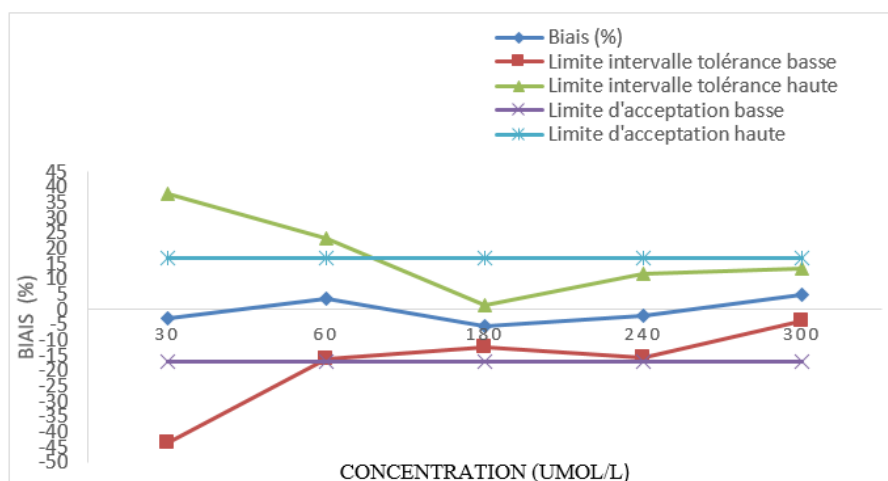
L'objectif c'était de choisir une fonction de réponse qui donne un intervalle de tolérance le plus étroit, c'est-à-dire avoir le maximum des résultats entre les limites d'acceptabilité, pour cela il a été choisi le profil d'exactitude qui donne l'intervalle de dosage le plus large à savoir :

La fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  : **un étalonnage sans matrice « absence d'effet de matrice »** .

### 1.2. Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation toutes les données obtenues ont été collectées pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, tous dans une courbe reliant l'exactitude (%) en fonction des concentrations introduites.

Le profil d'exactitude obtenu en utilisant la fonction choisie est représenté ci-dessous :



**Figure 19 : Profil d'exactitude de la Phe.**

Avec la fonction d'étalonnage choisie, on peut dire que la méthode analytique étudiée est valide dans des limites de quantification entre [79.19 ; 300]  $\mu\text{mol/L}$  qui correspond à [13.08 ; 49.55]  $\text{mg/l}$  et que dans cet intervalle, 80% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité de  $\lambda = \pm 15$ .

## 2. Résultats de l'étude de suitabilité de la colonne

Une étude des performances de la colonne par étude de la suitabilité est recommandée après une période d'utilisation.

Les valeurs obtenues seront reprises dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 16 : RSD des aires du pic de la phénylalanine.**

Injection N°	Aire du pic de phénylalanine
1	461943
2	470198
3	470789
4	473132
5	478159
6	450392
Y'	<b>469102,167</b>
$\Sigma$	<b>6773,96066</b>
% RSD	<b>1,4 %</b>

**Avec :**

Y' : moyenne des aires du pic de phénylalanine ;



$\sigma$  : écart type des aires de pic de phénylalanine ;

% RSD : écart type relatif en pourcentage ; % RSD =  $100 \sigma/Y'$ .

**Tableau 17 : Nombre de plateaux théoriques, facteur de rétention et facteur de symétrie du pic de la Phe.**

Paramètres	Résultats
N	3019,863
As	1,3
K'	3,13

#### ✓ Critères d'acceptation

- Le % RSD pour les six injections doit être inférieur ou égale à 2.0 % ;
- Le nombre de plateaux théoriques doit être supérieur ou égale à 1500 ;
- Le facteur de symétrie doit être compris entre 0.8 et 1.5 ;
- Le facteur de rétention K' doit être supérieur ou égale à 2.

#### ✓ Interprétation des résultats

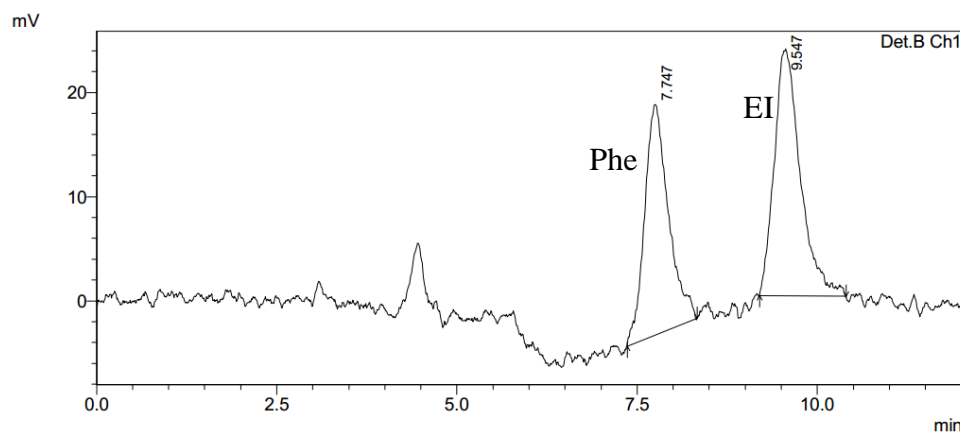
- % RSD = 1,4 % donc il est  $\leq 2.0$  % ;
- N = 3019,863 donc il est  $\geq 1500$  ;
- As = 1,3 donc il est compris dans l'intervalle d'acceptation  $0,8 < 1,3 < 1,5$  ;
- K' = 3,13 donc il est  $\geq 2$ .

#### ✓ Conclusion

Les résultats obtenus répondent aux critères de suitabilité, donc notre système est apte à effectuer les analyses.

### 3. Résultats d'étalonnage

#### 3.1 Exemple de chromatogramme



**Figure 20 : Chromatogramme d'une solution étalon de la Phe.**



### 3.2. Moyenne des temps de rétention

Tableau 18 : Moyenne des temps de rétention.

Composé	Moyenne des temps de rétention de dosage (min)	Moyenne des temps de rétention de validation (min)
Tyrosine	4.232	4.300
Phénylalanine	7.561	8.208
Etalon interne	9.371	10.305

#### ✓ Interprétation

Les temps de rétentions sont légèrement bas à ceux de l'étape de validation.

### 3.3. Droite d'étalonnage

$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$
5,48	0,30729
5,48	<b>0,28764</b>
5,47	0,30578
7,74	<b>0,41357</b>
7,75	<b>0,42844</b>
7,75	<b>0,42844</b>
13,43	<b>0,65361</b>
13,4	<b>0,64091</b>
13,43	<b>0,65361</b>
15,5	<b>0,7416</b>
15,51	<b>0,74799</b>
15,5	<b>0,76003</b>
17,34	<b>0,81676</b>
17,32	<b>0,79287</b>
17,33	<b>0,80365</b>
Pente	<b>0,0424</b>
Ordonnée à l'origine	<b>0,0806</b>

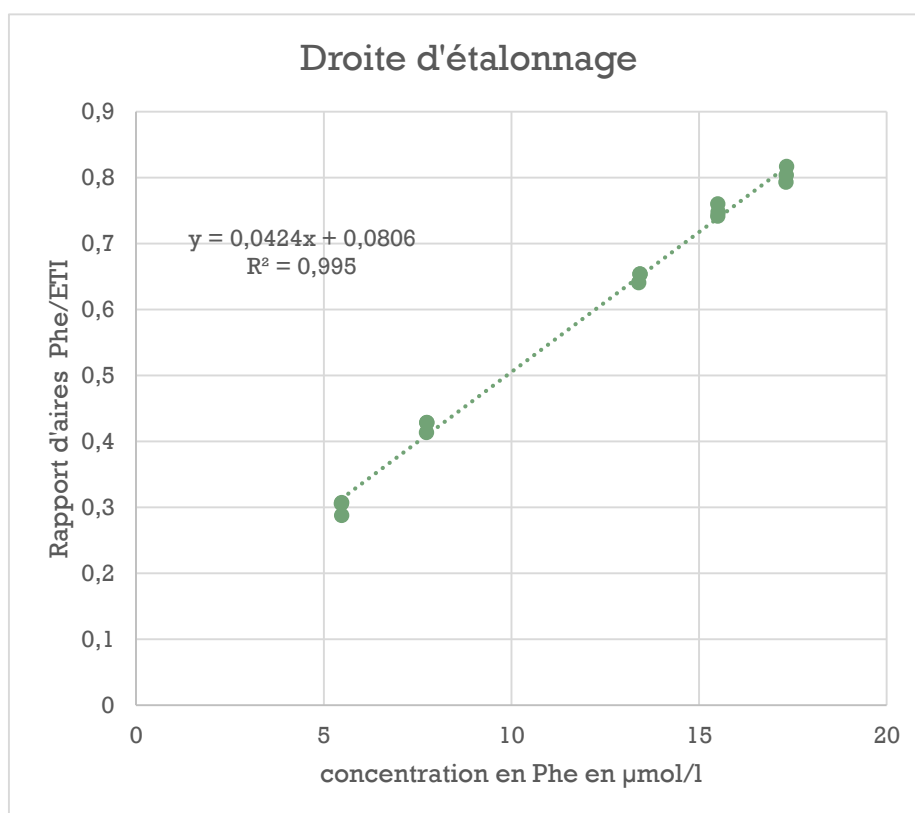


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la Phe.

La formule de calcul est :  $X = ((\sqrt{y} - 0,0806)/0,0424)^2$  où X la concentration de Phe en  $\mu\text{mol/l}$  et Y le rapport aire de pic Phe/EI.

### 3.4. Lancement d'une série de contrôle

Tableau 19 : Résultats de la série de contrôle.

Etalons prédosés par fluorimétrie mg/l	Résultats HPLC mg/l
40 mg/l	47,0
25 mg/l	30,0



Les résultats des étalons, utilisés comme contrôle, valide la courbe d'étalonnage.

## 4. Résultats de l'étude de comparaison

### 4.1. Analyse descriptive de la totalité des résultats

Les données utilisées dans cette étude sont de 69 valeurs.

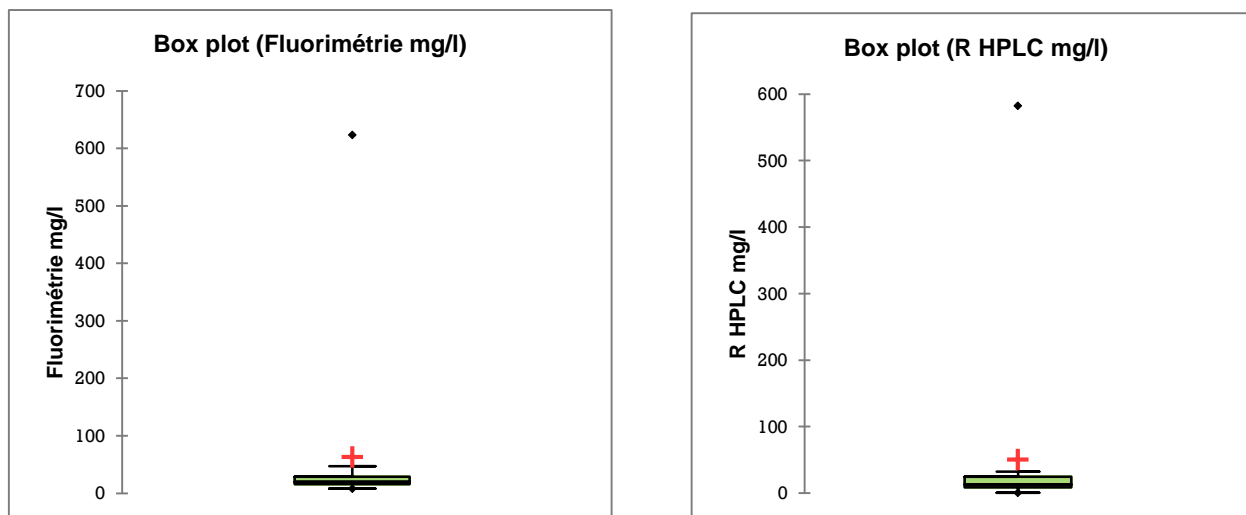


Figure 22 : Analyse descriptive de la totalité des données de comparaison.

Les données quantitatives de l'analyse descriptive sont détaillées dans les tableaux suivants :

Tableau 20 : Statistiques descriptives de la totalité des résultats.

Statistique	Résultat fluorimétrie mg/l
Nombre d'observations	70
Minimum	8,000
Maximum	623,000
1 <sup>er</sup> Quartile	16,000
Médiane	20,000
3 <sup>ème</sup> Quartile	28,750
Moyenne	63,171
Variance (n-1)	11985,738
Ecart type (n-1)	109,479

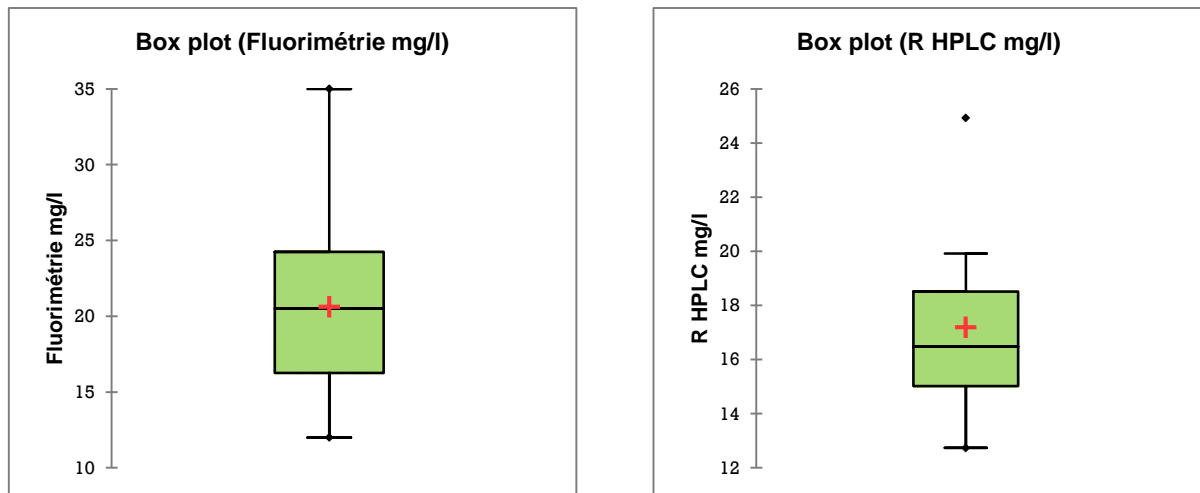
Statistique	Résultat HPLC mg/l
Nombre d'observations	70
Minimum	0,367
Maximum	582,031
1 <sup>er</sup> Quartile	8,615
Médiane	13,227
3 <sup>ème</sup> Quartile	24,833
Moyenne	50,586
Variance (n-1)	10441,202
Ecart type (n-1)	102,182

### ✓ Interprétation

Les valeurs obtenues par HPLC se répartissent d'une façon similaire à celle de la méthode de comparaison en incluant même les domaines hors intervalle de mesure validé sur HPLC.



#### 4.1.1. Analyse descriptive des résultats du domaine de mesure



**Figure 23 : Analyse descriptive des résultats du domaine de mesure.**

Les données quantitatives de l'analyse descriptive des résultats du domaine de mesure sont détaillées dans le tableau suivant :

**Tableau 21 : Statistiques descriptives des résultats du domaine de mesure.**

Statistique	Résultat Fluorimétrie mg/l
Nombre d'observations	18
Minimum	12,000
Maximum	35,000
1 <sup>er</sup> Quartile	16,250
Médiane	20,500
3 <sup>ème</sup> Quartile	24,250
Moyenne	20,611
Variance (n-1)	33,781
Ecart type (n-1)	5,812

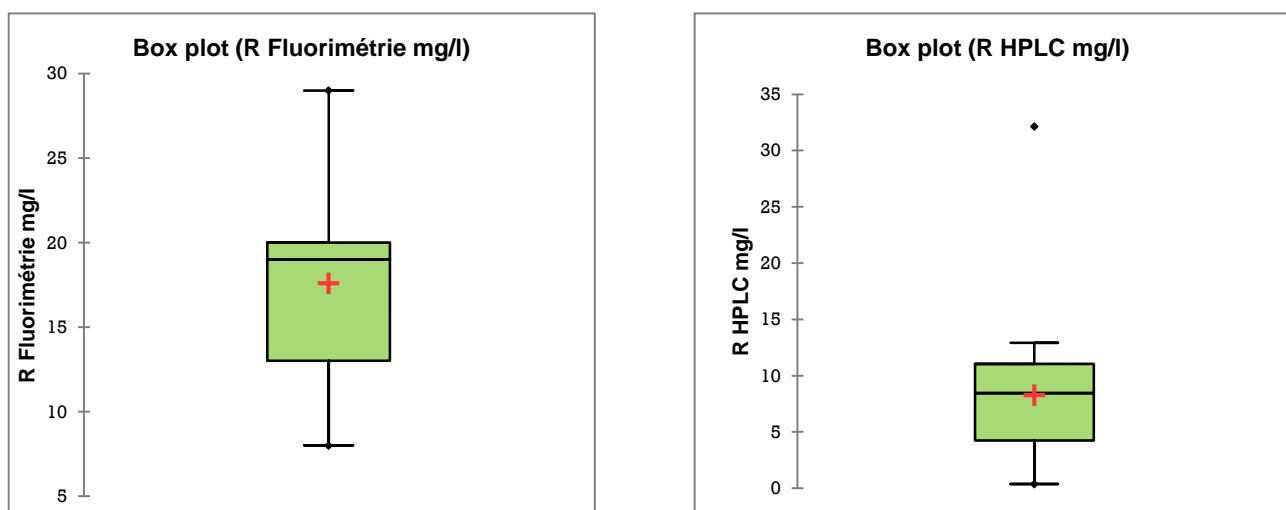
Statistique	Résultat HPLC mg/l
Nombre d'observations	18
Minimum	12,737
Maximum	24,930
1 <sup>er</sup> Quartile	15,020
Médiane	16,479
3 <sup>ème</sup> Quartile	18,512
Moyenne	17,192
Variance (n-1)	11,340
Ecart type (n-1)	3,367

#### ✓ Interprétation

Quand on compare uniquement les valeurs situées dans le domaine de mesure [13.08 ;49.55] mg/l, on remarque que les résultats tendent légèrement vers le bas pour la méthode HPLC.



#### 4.1.2. Analyse descriptive des résultats inférieurs à la limite de quantification



**Figure 24 : Analyse descriptive des résultats inférieurs à la limite de quantification.**

Les données quantitatives de l'analyse descriptive des résultats inférieurs à la limite de quantification sont détaillées dans les tableaux suivants :

**Tableau 22 : Statistiques descriptives des résultats inférieurs à la limite de quantification.**

Statistique	Résultat HPLC mg/l
Nombre d'observations	35
Minimum	0,367
Maximum	32,146
1 <sup>er</sup> Quartile	4,232
Médiane	8,460
3 <sup>ème</sup> Quartile	11,045
Moyenne	8,279
Variance (n-1)	31,432
Ecart type (n-1)	5,606

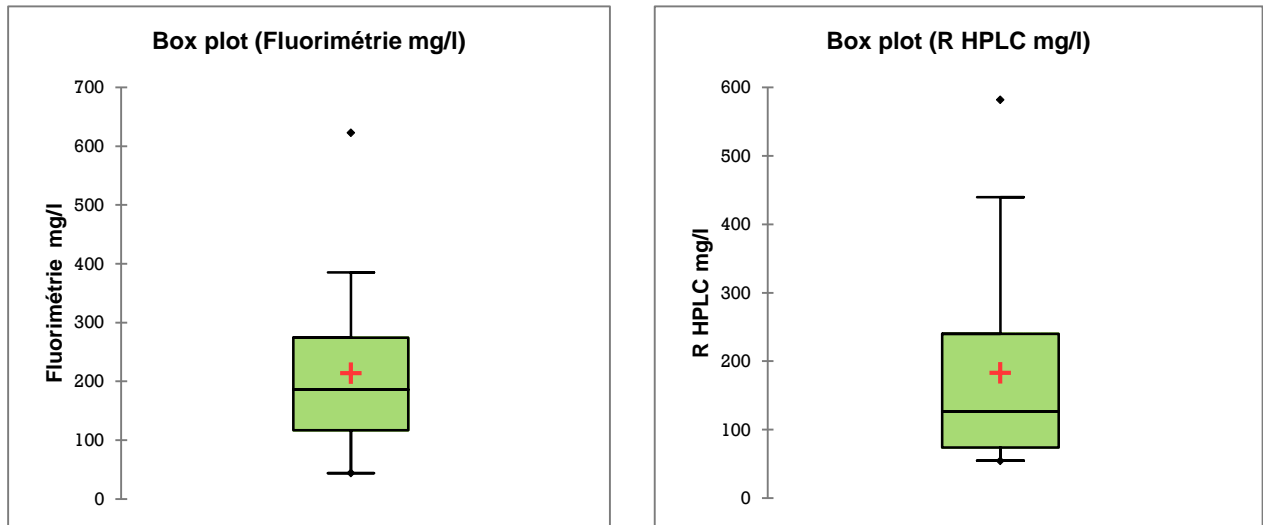
Statistique	Résultat fluorimétrie mg/l
Nombre d'observations	35
Minimum	8,000
Maximum	29,000
1 <sup>er</sup> Quartile	13,000
Médiane	19,000
3 <sup>ème</sup> Quartile	20,000
Moyenne	17,600
Variance (n-1)	29,953
Ecart type (n-1)	5,473

#### ✓ Interprétation

Les valeurs de 35 échantillons sont revenues inférieures au domaine de mesure validé sur HPLC, l'analyse descriptive montre que la répartition des données n'est pas très différente par rapport à la méthode de comparaison.



#### 4.1.3. Analyse descriptive des résultats supérieurs à la limite de linéarité



**Figure 25 : Analyse descriptive des résultats supérieurs à la limite de linéarité.**

Les données quantitatives de l'analyse descriptive des résultats supérieurs à la limite de linéarité sont détaillées dans le tableau suivant :

**Tableau 23 : Statistiques descriptives des résultats supérieurs à la limite de linéarité.**

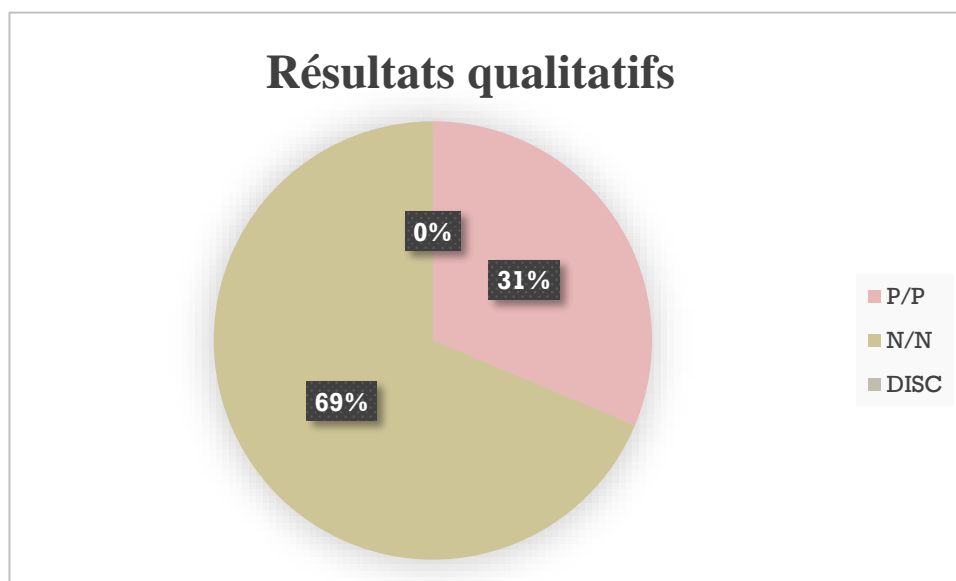
Statistique	Résultat fluorimétrie mg/l	Statistique	HPLC mg/l
Nombre d'observations	16	Nombre d'observations	16
Minimum	44,000	Minimum	54,564
Maximum	623,000	Maximum	582,031
1 <sup>er</sup> Quartile	117,000	1 <sup>er</sup> Quartile	73,893
Médiane	186,000	Médiane	126,441
3 <sup>ème</sup> Quartile	274,250	3 <sup>ème</sup> Quartile	239,762
Moyenne	214,188	Moyenne	183,319
Variance (n-1)	23479,629	Variance (n-1)	23525,350
Ecart type (n-1)	153,231	Ecart type (n-1)	153,380

#### ✓ Interprétation

Les valeurs de 16 échantillons sont revenues supérieures au domaine de mesure validé sur HPLC, l'analyse descriptive montre que la répartition des données n'est pas très importante par rapport à la méthode de comparaison.



#### 4.2. Analyse qualitative des résultats et comparaison des méthodes



**Figure 26 : Analyse qualitative des résultats.**

Sur la série de 69 échantillons comparés, aucun résultat discordant n'a été trouvé.

Les résultats de notre population de comparaison sont en majorité dans le domaine des valeurs normales de la méthode de référence.

On remarque que les résultats sont plus faibles par rapport à la méthode de comparaison, néanmoins, la signification qualitative est la même, on n'a enregistré aucun résultat discordant.

#### ✓ Remarque

Pour les résultats dépassants le domaine de linéarité haute, et vu la quantité faible de nos échantillons nous n'avons pas pu les refaire après les dilutions.

**Tableau 24 : Tableau de contingence de l'interprétation qualitative des résultats de comparaison**

	Phe comparaison P	Phe comparaison N
Phe HPLC P	26	0
Phe HPLC N	0	57

L'application du test de Khi 2 «  $P = 10^{-6}$ , <<<< à la limite  $\alpha = 0,05$  » montre une concordance parfaite dans l'interprétation qualitative des résultats.



### 4.3. Analyse quantitative et comparaison des méthodes

L'exploitation des résultats est réalisée par le logiciel XLSTAT offrant la possibilité de réaliser la comparaison selon les recommandations de SFBC :

- Régression linéaire de Passing Bablock ;
- Diagramme de différences de Bland Altman avec les limites d'interprétation et de suivi de SFBC.

Les recommandations de Bland Altman permettent d'estimer les relatives différences entre deux méthodes en fonction des moyennes des concentrations mesurées pour chaque méthode.

Cela permet de définir le biais entre les deux techniques, son écart type et son IC 95%.

Le graphe  $x/y = f(x_i)$  donne des informations complémentaires au diagramme des différences.

La comparaison se déroule ainsi en deux étapes :

- Vérifier la discordance et porter l'interprétation et la correction adéquate ;
- Etablir la formule reliant les résultats des deux méthodes à partir de la droite de régression.

#### 4.3.1. Vérification de la normalité des valeurs

##### ✓ Données obtenues par la méthode fluorimétrique

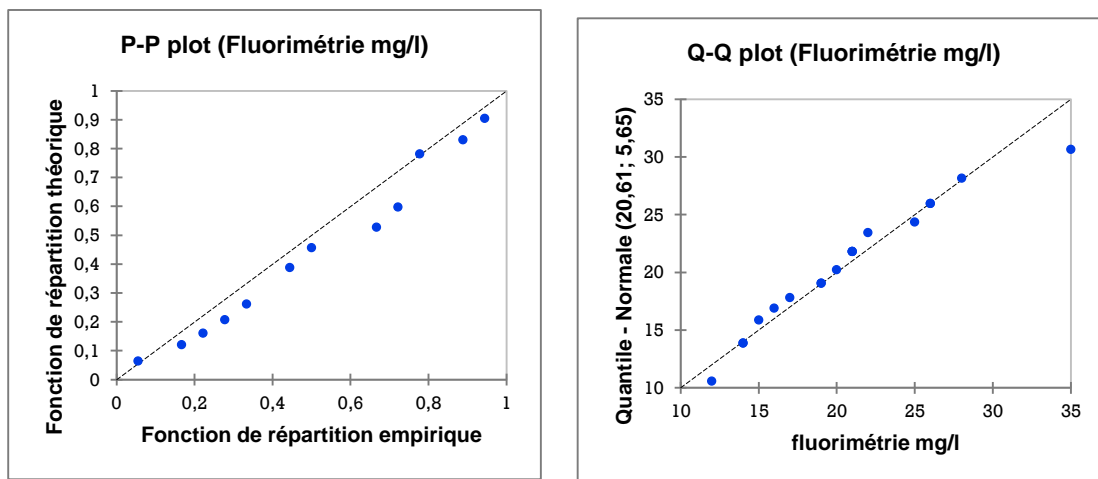


Figure 27 : Tests graphiques pour la vérification de la normalité « Fluorimétrie ».

Tableau 25 : Tests statistiques pour la vérification de la normalité « Fluorimétrie ».

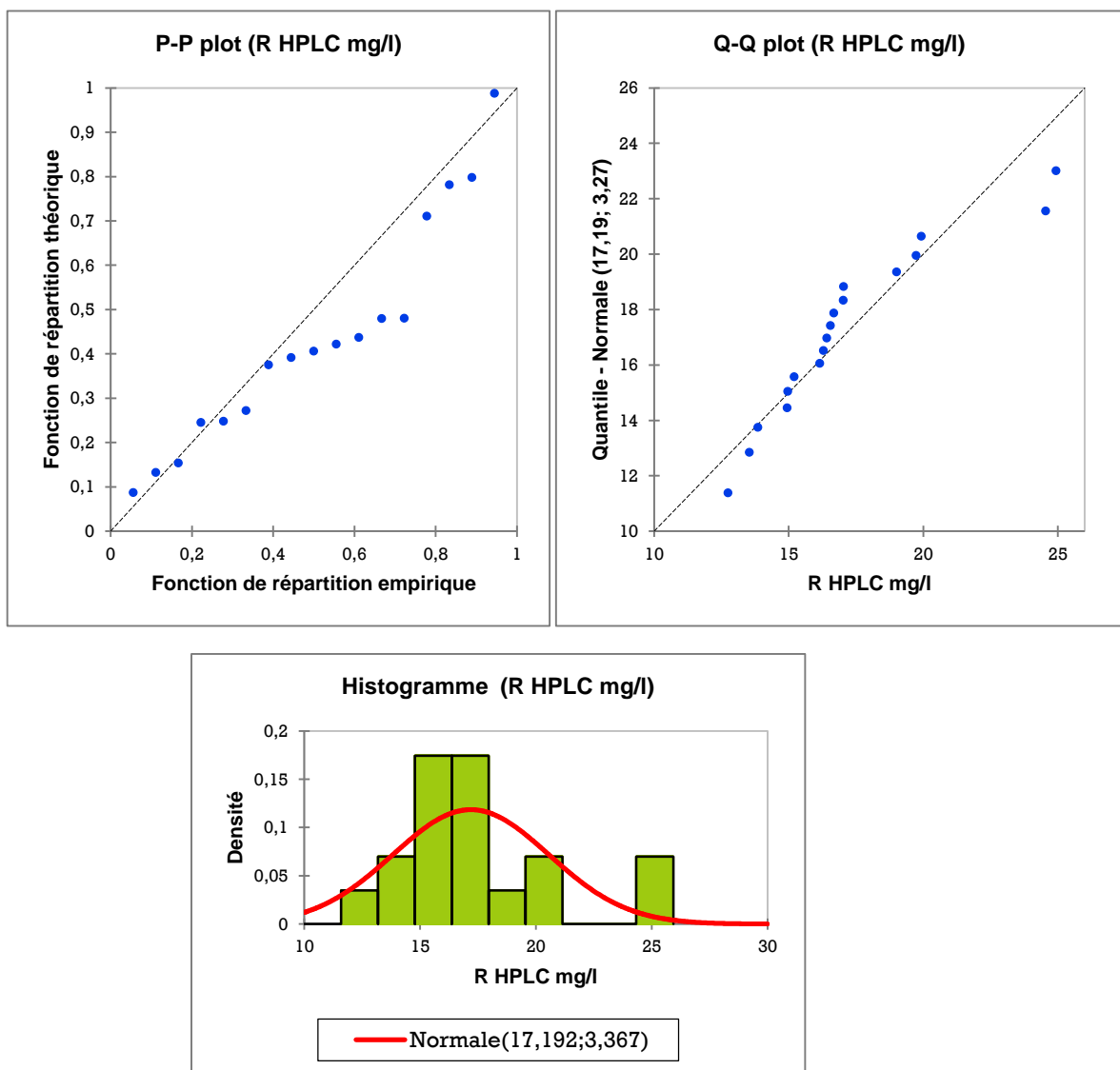
Variable/test	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera
R fluorimétrie mg/l	0,472	0,482

✓ **Interprétation du test statistique**

**H<sub>0</sub>** : La variable dont provient l'échantillon suit une loi normale.

**H<sub>a</sub>** : La variable dont provient l'échantillon ne suit pas une loi normale.

Etant donné que la p-value est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha = 0,05$ , on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub>.

✓ **Données obtenues par la méthode HPLC**

**Figures 28 : Tests graphiques pour la vérification de la normalité «HPLC».**



Tableau 26 : Tests statistiques pour la vérification de la normalité « HPLC ».

Vaible\test	Shapiro-Wilk	Anderson-Darling	Lilliefors	Jarque-Bera
R HPLC mg/l	0,025	0,025	0,007	0,143

#### ✓ Interprétation du test statistique

**H<sub>0</sub>** : La variable dont provient l'échantillon suit une loi normale.

**H<sub>a</sub>** : La variable dont provient l'échantillon ne suit pas une loi normale.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub>.

#### ✓ Interprétation des tests de vérification de la normalité

La normalité des valeurs est bien vérifiée via les tests graphiques et statistiques pour les deux séries de comparaison. La distribution est plus gaussienne pour la méthode fluorimétrique par rapport à l'HPLC.

#### 4.3.2. Diagrammes des différences de Bland Altman

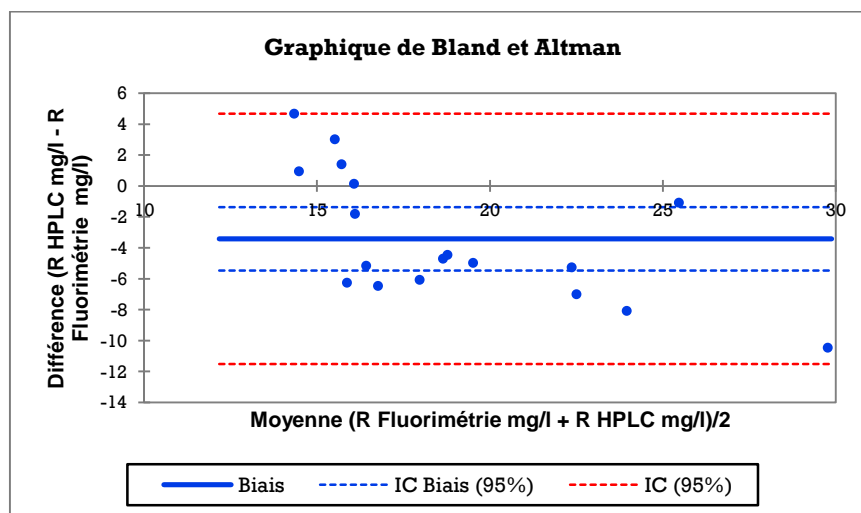


Figure 29 : Représentation graphique des différences entre les deux méthodes en fonction de la moyenne des concentrations.

Intervalle de confiance à 95% autour de la différence des moyennes : ] -5,474 ; -1,363 [.



Tableau 27 : Test statistique de l'analyse des différences.

Différence	-3.419
t (valeur observé)	-3.509
t (valeur critique)	2.110
DDL	17
p-value (bilatérale)	0.003
Alpha	0.05

✓ **Interprétation du test**

**H<sub>0</sub>** : La différence entre les moyennes est égale à 0.

**H<sub>a</sub>** : La différence entre les moyennes est différente de 0.

Etant donné que la p-value calculée est inférieure au niveau de signification  $\alpha=0.05$ , on doit rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub>, et retenir l'hypothèse alternative H<sub>a</sub>.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub> alors qu'elle est vraie est inférieur à 0.27%.

On peut conclure qu'il existe des différences entre les deux techniques mais qui reste dans l'intervalle de tolérance, donc acceptables.

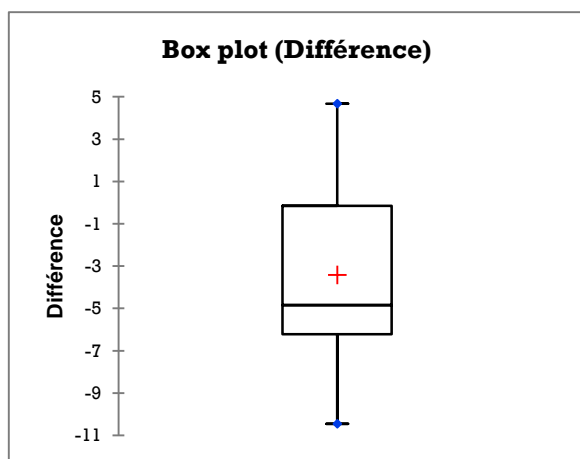


Figure 30 : Répartition des différences.

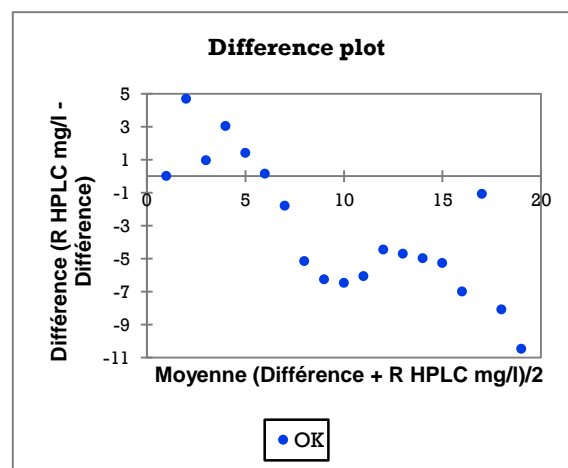


Figure 31 : Représentation des différences en fonction de la moyenne.

Tableau 28 : Données statistiques du diagramme des différences.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart -type	Couple « hors bornes »
REF mg/l	18	12,000	35,000	20,611	5,812	-----IC (95%) : 0
R HPLC mg/l	18	12,737	24,930	17,192	3,367	-----IC biais (95%) : 10



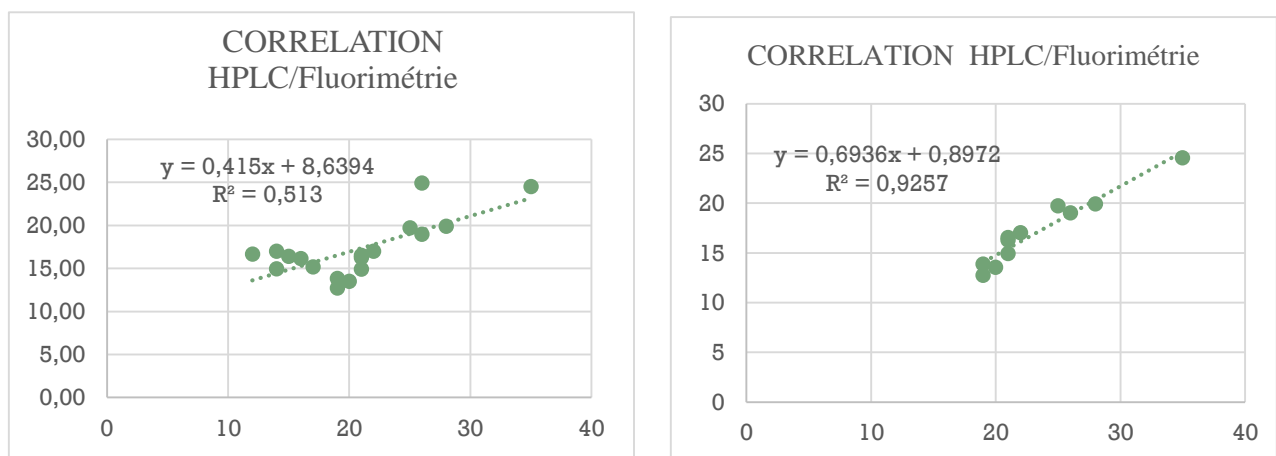
La majorité des différences sont réparties d'une façon homogène dans IC 95%, la moyenne des différences est négative ce qui montre que la technique HPLC a donné des résultats légèrement bas par rapport aux résultats fournis par la technique de comparaison.

Les normes SFBC de comparaison méthode recommandent de valider la technique par rapport à des limites d'interprétation et de suivi ; celles-ci ne sont pas disponibles pour la phénylalanine.

On remarque aussi que l'erreur est proportionnelle à la concentration (en valeur absolue) pour les grandes concentrations inférieures au domaine de la linéarité.

Les différences entre les résultats des deux techniques sont donc acceptables, elles oscillent en majorité dans le domaine de mesure  $]-5,474 ; -1,363[$ .

#### ✓ Corrélation des données selon les droites des moindres carrés



**Figure 32 : Droite de corrélation des moindres carrés.**

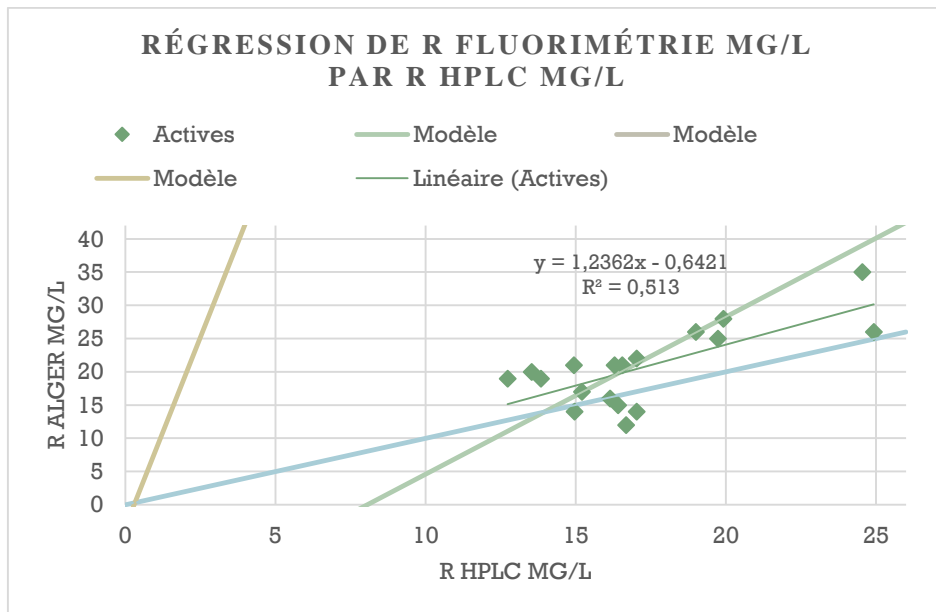
La droite de corrélation selon les moindres carrés montre une corrélation  $R = 0,96$ .

#### ✓ Interprétation

La corrélation entre les données selon les droites des moindres carrés est moyenne pour toutes les valeurs, elle est très satisfaisante après enlèvement des valeurs aberrantes par le test de Dixon et de Grubbs.

#### 4.3.3. Test de Passing and Bablok

Le test de Passing Bablok n'est pas applicable car le nombre des échantillons après enlèvement des valeurs aberrante n'est pas suffisant, son application sur la totalité des valeurs montre les résultats suivant :



**Figure 33 : Représentation graphique de la droite de régression des deux méthodes.**

✓ **Interprétation du test**

**H<sub>0</sub>** : La relation entre les deux variables est linéaire ;

**H<sub>a</sub>** : La relation entre les deux variables n'est pas linéaire.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil  $\alpha=0,05$ , on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub>.

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H<sub>0</sub> alors qu'elle est vraie est de 14,66%.

P-value > alpha ; les deux droites ne sont pas corrélées, la relation entre les variables est non linéaire.

Il existe une erreur aléatoire indépendante de la concentration.

Selon les normes SFBC, l'exactitude est à vérifier pour les concentrations basses et élevées, cependant l'erreur d'exactitude peut atteindre 15% pour les valeurs biologiques.



## 5. Les valeurs de référence du dosage de la Phe par HPLC

### 5.1. Distribution de la population d'étude selon l'âge et le sexe

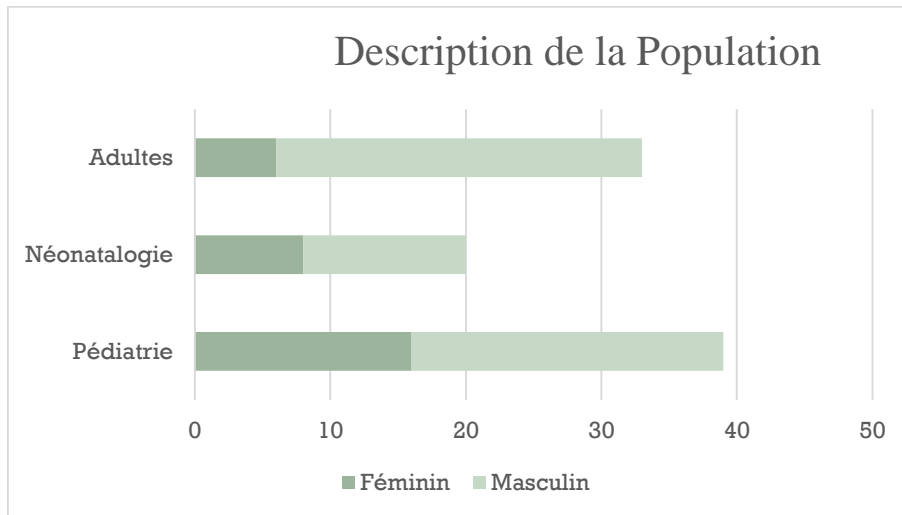


Figure 34 : Répartition de la population de référence selon la catégorie d'âge et le sexe.

#### Trois populations ont été étudiées :

La population de néonatalogie et pédiatrie provient du service de la pédiatrie du CHU Tizi Ouzou, après sélection en collaboration avec les pédiatres de chaque unité du service, ainsi que la population adulte.

### 5.2. Données statistiques

#### 5.2.1. Population adulte

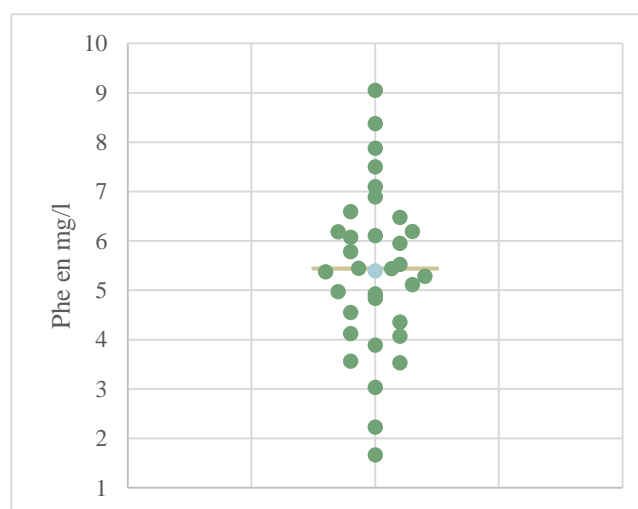
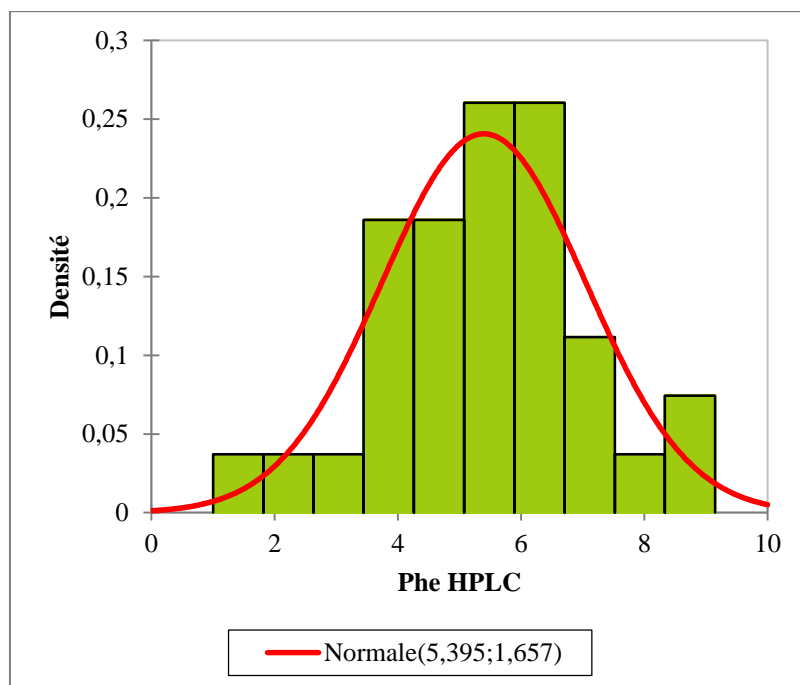


Figure 35 : Scattergram de la distribution des valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine.



**Tableau 29 : Données statistiques « valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine ».**

Statistique	X 10/9
Nb. d'observations	33
Minimum	1,665
Maximum	9,049
1er Quartile	4,357
Médiane	5,440
3ème Quartile	6,187
Moyenne	5,395
Variance (n-1)	2,747
Ecart-type (n-1)	1,657



**Figure 36 : Histogramme de la distribution des valeurs de la Phe chez la population adulte présumée saine.**

**Tableau 30 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.**

Variable\Test	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera
Phe HPLC adulte	0,999	0,994



**Tableau 31 : Données de l'intervalle des valeurs de la Phe plasmatique chez la population adulte saine.**

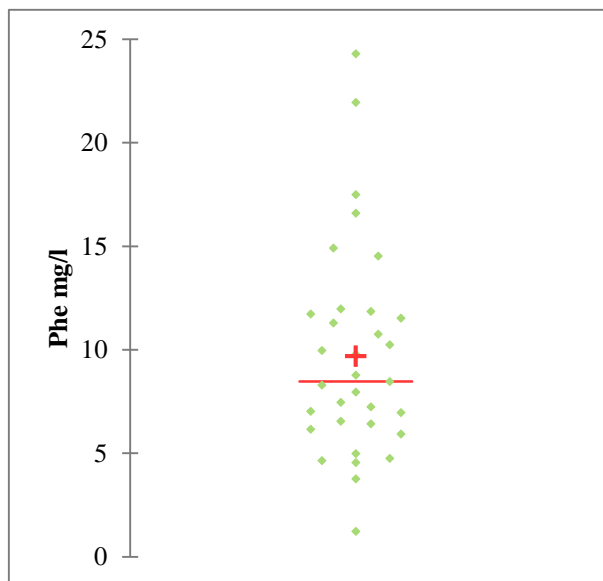
Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
Phe HPLC	33	1,665	9,049	5,395	1,657

✓ **Interprétation :**

La distribution des valeurs de la Phe plasmatique dosées par HPLC est gaussienne selon les tests graphiques et statistiques. Cependant toutes les valeurs sont inférieures au domaine validé qui est de [13,08 ; 49,55] mg/l. Donc on ne pourra pas utiliser comme intervalle de référence que la limite de quantification de la technique.

La valeur de référence chez l'adulte s'écrivera ainsi : < 13,08.

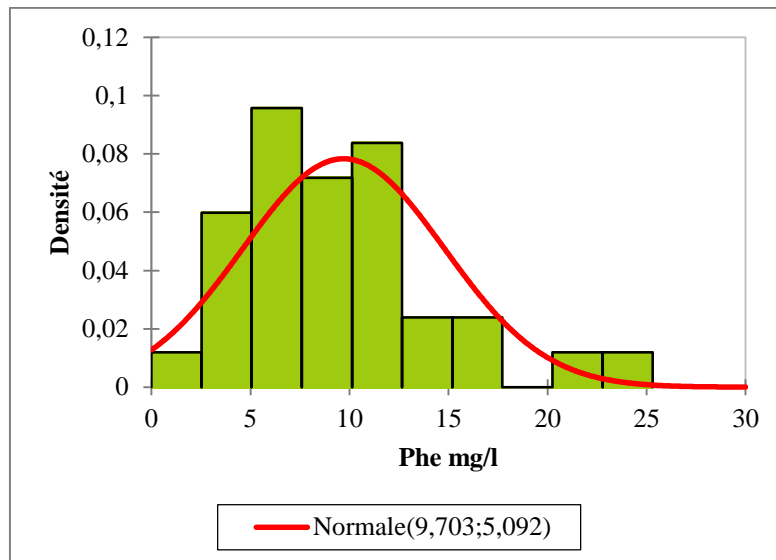
### 5.2.2. Population pédiatrique



**Tableau 32 : Données statistiques des valeurs de la Phe chez la population pédiatrique.**

Statistique	Phe mg/l
Nb. d'observations	33
Minimum	1,235
Maximum	24,311
1er Quartile	6,432
Médiane	8,476
3ème Quartile	11,727
Moyenne	9,703
Variance (n-1)	25,929
Ecart-type (n-1)	5,092

**Figure 37 : Scattergram de la distribution des valeurs de la Phe chez la population pédiatrique.**



**Figure 38 : Histogramme de la distribution des valeurs de la Phe chez la population pédiatrique « HPLC ».**

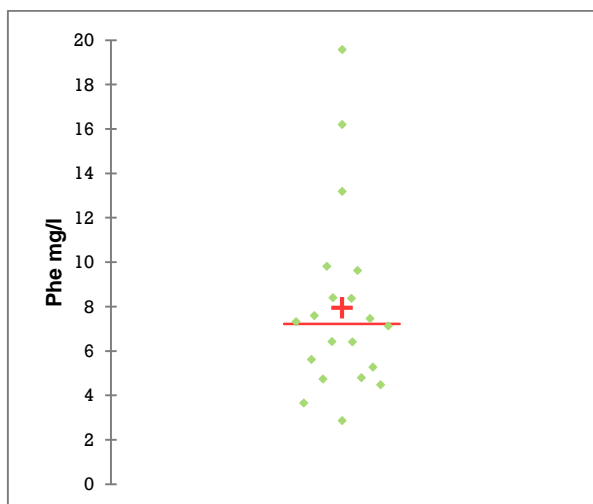
**Tableau 33 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.**

Variable\Test	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera
Phe mg/l	0,019	0,018

### ✓ Interprétation

La distribution des valeurs de la Phe plasmatiques dosées par HPLC n'est pas gaussienne selon les tests graphiques et statistiques. Cependant la majorité des valeurs sont inférieures au domaine validé qui est de [13,08 ; 49,55] mg/l. Donc on ne pourra pas les utiliser pour le calcul de l'intervalle de référence.

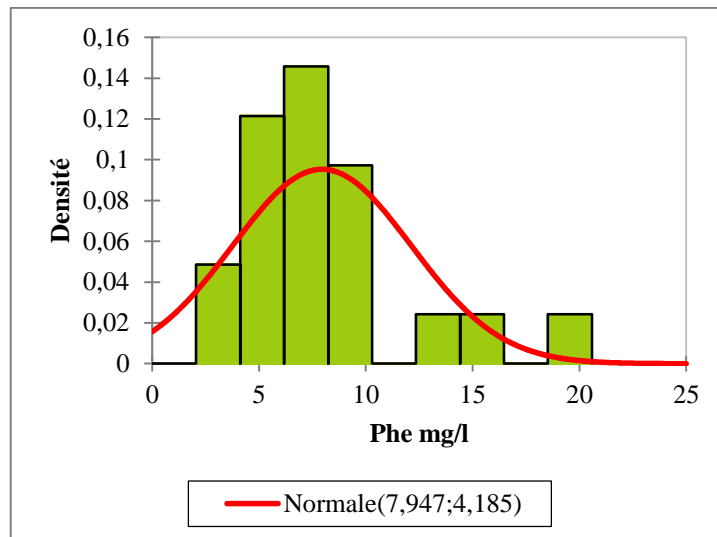
### 5.2.3. Population néonatalogie



**Figure 39 : Scattergram de la distribution des valeurs de la Phe chez les nouveaux nés.**

**Tableau 34 : Données statistiques « valeurs de la Phe chez les nouveaux nés ».**

Statistique	X 10/9
Nb. d'observations	20
Minimum	2,865
Maximum	19,582
1er Quartile	5,151
Médiane	7,221
3ème Quartile	8,704
Moyenne	7,947
Variance (n-1)	17,517
Ecart-type (n-1)	4,185



**Figure 40 : Histogrammes de la distribution des valeurs de la Phe chez la population chez les nouveaux nés « HPLC ».**

**Tableau 35 : Tests statistiques de la vérification de la loi normale.**

Variable/Test	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera
Phe mg/l	0,007	0,012

#### ✓ Interprétation

La distribution des valeurs de la Phe plasmatique dosées par HPLC n'est pas gaussienne selon les tests graphiques et statistiques. Cependant la majorité des valeurs sont inférieures au domaine validé qui est de [13,08 ; 49,55] mg/l. Donc on ne pourra pas les utiliser pour le calcul de l'intervalle de référence.

#### ✓ Conclusion

Selon les recommandations iso 15189, l'intervalle de référence déterminé sur une méthode différente mais sur la même population est basé sur les résultats de la comparaison des deux techniques.

Etant donné que la linéarité est faible entre les deux techniques, il est difficile d'établir une équation de correction qui permettrait le transfert de l'intervalle de référence de la technique de référence sur la technique HPLC.

## 6. Cas clinique

Il s'agit de G.S âgé de 3 jours. 2 cas index dans la famille.

Dépistage à j3, le taux de Phe = 240 mg/l.

Mis sous régime ; la Phe reviens à 80 mg/l après 3 jours du régime et se normalise au bout d'une semaine.



**Ce cas clinique montre :**

- ✓ D'un côté l'intérêt du dosage plasmatique de la Phe dans le diagnostic et le suivi des hyperphénylalaninémies essentiellement la PCU.
- ✓ La possibilité de l'utilisation de la technique HPLC dans le diagnostic et le suivi de la PCU.



## Discussion

- Les concentrations sériques ou plasmatiques de Phe et Tyr sont habituellement mesurées par des méthodes HPLC pour les acides aminés totaux. L'inconvénient de ces méthodes est que la dérivation est nécessaire et qu'une analyse pourrait durer jusqu'à 85 min. Récemment, plusieurs méthodes qui sont basées sur la chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse (LC / MS) et détection UV ont été créées. Certaines de ces méthodes sont spécifiquement consacrées à l'utilisation de taches de sang séché adaptées au dépistage néonatal de la phénylcétonurie (PCU).
- Toutefois, pour des explorations spécifiques, telle que la PCU, seulement des concentrations de Phe, mais pas tous les autres acides aminés, sont intéressent à doser.
- Par conséquent, une méthode HPLC phase inversée a été développée et validée, au sein du laboratoire de biochimie et de chimie analytique de l'université de Tizi Ouzou pour la détermination de la Phe plasmatique.
- En effet, cette présente méthode utilise la fluorescence naturelle de la Phe pour l'identifier et la quantifier. C'est une technique fiable, simple, rapide, et pas couteuse. Le plus intéressent, à la différence des autres méthodes HPLC, est qu'elle présente l'avantage de l'absence de l'étape de dérivatisation qui nécessite des étapes pré-analytiques fastidieuses.
- Il s'agit de l'optimisation d'une technique mère, basée sur une méthode créée plus tôt pour le dosage du tryptophane et l'analyse des kynurénines, pour qu'elle soit applicable sur la phénylalanine plasmatique [85].
- Après une de longues étapes d'optimisation du protocole en 2017, la méthode a pu être validée et qualifiée pour le dosage de la Phe dans le plasma humain hépariné selon les recommandations de SFSTP 2006.
- D'après les profils d'exactitude élucidés et les intervalles de dosage calculés, les choix a été porté sur la fonction de réponse qui donne l'intervalle du dosage le plus élargi à savoir :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ . Et cela sur la base des critères de validation SFSTP 2006 validant un intervalle de [79 ; 300 $\mu$ mol/l] qui correspond à [13,08 ; 49,55 mg/l], cet intervalle est jugé restreint pour qu'il puisse être appliqué à la toute gamme des valeurs physiopathologiques, sachant que : les valeurs normales de la Phe sont inférieures à 40 mg/l, les hyperphénylalaninémies qui n'atteignent pas la PCU typique sont entre 40 et 200 mg/l, et les valeurs des hyperphénylalaninémies en faveur d'une PCU typique sont supérieures à 200 mg/l.



- Cette contrainte du domaine de mesure n'est pas vraiment une limite puisque elle est solutionnée par l'application des dilutions au-delà de la limite supérieure, et la remise de résultat qualitatif au-dessous de la limite inférieure.
- Le but de notre travail est de finaliser la validation du dosage de la Phe par HPLC, par comparaison des méthodes et établissement des valeurs de référence, deux exigences de la norme ISO 15189.
- Le chromatogramme obtenu par cette méthode, montre bien que les temps de rétention sont similaires à ceux de l'étude de la validation. Il est de 7,56 mn pour la Phe et de 9,37 pour l'étalon interne. A noter que la tyrosine apparaît aussi à 4,23 mn.
- Rappelant que malgré que l'appareillage ne dispose pas d'une précolonne, nécessaire pour maintenir les performances de la colonne, l'étude de la suitabilité a montré que le système est apte à effectuer des analyses.
- Après avoir effectué un étalonnage externe, une courbe linéaire est obtenue dans la totalité de l'intervalle testé, avec formule de calcul :  $X = ((\sqrt{y} - 0,0806)/0,0424)^2$  où X la concentration de Phe en  $\mu\text{mol/l}$  et Y le rapport aire de pic Phe/ETI, permettant la détermination des concentrations en micromole/l.
- Une correction par un facteur de dilution de 10/9 ainsi qu'une conversion en mg/l est nécessaire « le mg/l est l'unité la plus fréquemment utilisée par les cliniciens ».
- L'application de la présente méthode sur des échantillons préalablement dosés par une autre technique fluorimétrique non chromatographique a montré les résultats suivants :
  - ✓ Une corrélation selon la droite des moindres carrées est satisfaisante et les différences analysées par le graphique de Bland Altman « recommandé par SFBC » sont aussi acceptables et oscillants dans l'intervalle ]-5,474 ; -1,363[. En effet les valeurs obtenues par la technique HPLC sont légèrement basses. Ceci pourrait être expliqué par la phase de défécation qui pourrait engendrer des pertes.
  - ✓ La comparaison des deux méthodes n'a pas pu être réalisée dans des conditions optimales, essentiellement de couvrir le domaine des valeurs physiopathologiques. Néanmoins l'étude descriptive montre une concordance parfaite dans l'interprétation des résultats.
  - ✓ Quantitativement, malgré que les différences ne sont pas significatives, les domaines hors l'intervalle validé ne peuvent pas être exploités.
  - ✓ Les valeurs de référence de la population saine sont revenues inférieures dans la totalité à la limite de quantification [13,08 ; 49,55] mg/l pour la population adulte, et



successivement 81% et 85% sont ainsi inférieures à la limite de quantification pour la population pédiatrique.

- ✓ Les valeurs obtenues restent inférieures au domaine des valeurs de référence de la technique de comparaison, mais ils sont beaucoup plus proches de celui d'une méthode chromatographique similaire, où la seule différence est le tampon utilisé qui est l'éthanol à la place de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , où l'intervalle de référence est de  $11,48 \text{ mg/l} \pm 2,2$  [85].
- En attendant d'un vrai établissement des valeurs de référence, l'usage de l'intervalle de référence de la méthode de comparaison reste correct.
- Notre doute a été bien enlevé par une série de contrôle lancée, dont les résultats sont revenus très acceptables.

### Limites de la technique HPLC

- La limite la plus importante est l'étroitesse de l'intervalle de mesure dû au manque de la sensibilité aux valeurs basses et élevées au même temps. Cela rend difficile son amélioration et implique des résultats qualitatifs au-dessous de la limite de quantification et des dilutions au-delà de domaine de linéarité.
- La non disponibilité de la précolonne expose au risque de saturation et étalement des pics. Cela peut être réglé par des lavages courants qui sont pénible sur le plan pratique.



## Conclusion

La PCU est une maladie métabolique héréditaire pouvant être responsable de séquelles neurologiques graves et irréversibles, Ces troubles peuvent néanmoins être évités grâce notamment au dépistage systématique qui a permis la prise en charge rapide des nourrissons par la mise en place d'un régime pauvre en PHE.

La réalisation de cette étude se justifie avant tout par le besoin de connaître les taux de la Phe dans le cadre du dépistage de la PCU par le développement d'une technique chromatographique HPLC, qui a été validée selon les recommandations SFSTP 2006.

Afin de finaliser cette validation, ce présent travail est basé sur une étude comparative et un essai d'établissement des valeurs de référence.

L'application de la présente méthode sur des échantillons préalablement dosés par une autre technique fluorimétrique non chromatographique montre une concordance parfaite dans l'interprétation des résultats, malgré qu'elle n'a pas pu être réalisée dans des conditions optimales, essentiellement de couvrir le domaine des valeurs physiopathologiques.

Dans l'étude quantitative, les domaines hors l'intervalle validé ne peuvent pas être exploités malgré que les différences ne sont pas significatives.

L'essai d'établissement des valeurs de référence donne des résultats inférieurs dans la totalité à la limite de quantification [13,08 ; 49,55] mg/l, Donc on ne pourra pas les utiliser pour le calcul de l'intervalle de référence.

La remise d'un résultat qualitatif au-dessous de la limite inférieure de quantification, et l'application des dilutions au-delà de la limite supérieure peuvent être des solutions de cet intervalle restreint.



### Références bibliographiques

1. Audrey C. La phénylcétonurie, du dépistage aux nouvelles thérapeutiques [Thèse]. France : Université de Limoges; 2011.
2. Kose E, Aksoy B, Kuyum P, Tuncer N, Arslan N, Ozturk Y. The Effects of Breast feeding in Infants With Phenylketonuria. *Journal of pediatric nursing*. 2018 Jan-Feb ;(38) : 27-32.
3. Ameyoud O, Seddaoui M. Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané de la phénylalanine et de la tyrosine par HPLC [mémoire]. Tizi Ouzou : université Mouloud Mammeri ; 2017.
4. Koolman J, Röhm KH .Atlas de poche de biochimie humaine ; 4e éd entièrement remaniée et mis à jour 48p.
5. Moussard C. Biochimie structurale et métabolique ; 3e éd.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. biochimie 6e éd ; 764p.
7. Cousin A. Quantification des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang séché par spectrométrie de masse tandem couplée à une chromatographie liquide haute performance Intérêt dans le suivi de la leucinose [Thèse]. France : Université Bordeaux –Victor Segalen U.F.R des sciences pharmaceutiques ; 2014.
8. Fafa. Les acides aminés. Cours Médecine info[en ligne]. [Dernière mise à jour 01 fev 2016 ; consulter le 10 jan 2018]. Disponible sur : <http://www.cours-medecine.info/biochimie/acides-amines.html>
9. Ould Bessi N. Biochimie des aminoacidopathies. Cours de résidanat de biochimie clinique. Université d'Alger ; 2009.
10. Andrea T, Miguel D. Integrative human biochemistry. Media New York; 2015; 248p.
11. Miriam D, Rosenthal R, Glew H. Medical biochemistry; Human metabolism in health and disease .United States of America; 2009; 308p.
12. Voet D, Judith G. Biochimie, 2 éd.
13. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's illustrated biochemistry; 28e éd.
14. Riquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique. *Médecine et science*. 21(5) :512-16.
15. Thioulouse E, Berthe MC, Couderc R. Les aminoacidopathies héréditaires (AAH) ; revue francophone des laboratoires. Sep-Oct 2010 ; (425) : 53p.
16. Saudubray JM, Sedel F. Les maladies héréditaires du métabolisme à l'âge adulte. *Annales d'endocrinologie*. 2009 ; 14-24.

## BIBLIOGRAPHIE

---



17. Lyon G, Evard P. Neuropédiatrie. 2e édition. Paris : Masson ; 2000. ISBN :2-225-83753-8.
18. Bahi-Buisson N, Mention K, Léger PL, Valayanopoulos V, Nabbout R, Kaminska A et al. Epilepsies néonatales et erreurs innées du métabolisme Neonatalepilepsy and inborn errors of metabolism. Archives de pédiatrie. 2006 ;13 :284-92.
19. Arnaux JB. Quand évoquer une maladie métabolique. Service maladies héréditaires du métabolisme. Hôpital Necker-Enfants malades, Paris, France.
20. Laure M. Dépistage et suivi au long terme, d'une cohorte de phénylcétonurie et hyperphénylalaninémie modéré permanente en Normandie [thèse]. France : université de ROUEN UFR de médecine et de pharmacie. 03 Déc 2015 ; 23p.
21. Williamson D; Phenylalanine dietary sources functions and health effects, by nova science publishers ; 2015.
22. Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. Mol Genet Metab ; 2010.
23. Feillet F ; Phénylcétonurie Service de médecine infantile III. Vandœuvre les nancy (54) ; 2006 ; 2p.
24. Futura Santé [en ligne]. [Consulté janvier 2018]. Disponible sur : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-tyrosine-8606/>
25. Horde P. Tyrosine- Tryptophane – Définition ; Sante-Médecine ; juin 2014.
26. Litwack G. Human biochemistry and disease; Los Angeles, California; 547p.
27. Seddiki A, Rkain M, Lashaf A, Benajiba N. La phénylcétonurie ; le fardeau d'une famille marocaine Plaidoyer pour un dépistage systématique ; Médecine des maladies Métaboliques. Mars 2015.9(2): 148-50.
28. Yıldız I, Dursun A, Tokatlı A, Coşkun T, Serap Sivri H. Pediatric metabolic diseases unit. Department of pediatrics; Hacettepe University : Ankara, Turkey ; the turkish journal of pediatrics 2016.
29. Contreras J MS, Alonso E, Lisset E. HPLC for Confirmatory Diagnosis and Biochemical Monitoring of Cuban Patients with Hyperphenylalaninemia ; Jan 2015.
30. Storme B. Phénylcétonurie ; Prise en charge des maladies rares en anesthésie et analgésie obstétricale ; 2015.
31. Liu et al. Spectrum of PAH gene variants among a population of han chinese patients with phenylketonuria from northern China ; 2017.
32. Feillet F, De Parscau L. La phénylcétonurie. Encyclopédie orphanet grand public ; mai 2012.

## BIBLIOGRAPHIE

---



33. Genetics home reference ; U.S. national Library of medicine ; [Reviewed: January 2008, published January 23, 2018; consulter le 29-01-2018]. Disponible sur: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH>
34. James N, Parker MD, Philip M. phenylketonuria. A bibliography and dictionary for physicians patients, and genome researchers.2007 8p.
35. Daelmana L, Ewenzcykb C, Feillet F, Amourad Z, Tourbaha A, Sedelb F.Phénylcétonurie de l'adulte, manifestations neurologiques et modalités évolutives a Service de neurologie. CHU de Reims,France.
36. Moretti F, Pellegrini N, Salvatici E, Rovelli V, Banderali G, Radaelli G et al. Dietary Glycemic index, Glycemic load and metabolic profile in children with Phenylketonuria ;Nov 2016.
37. Dongli Z, Wenli L, Junbo Z, Wanrong T, Chenxu Q, Minghao F et al .Study on urinary metabolic profile of phenylketonuria. Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai ; 2011.
38. Bókay J, Kiss E, Simon E, Szónyi L. Phénylcétonurie maternelle ; Université Semmelweis, Faculté de médecine : Clinique pédiatrique, Budapest ; mar 2013.
39. Colloque AFDPHE (association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant) ; 40 ans de dépistage néonatal Ministère des Affaires sociales et de la Santé (Salle Pierre Laroque) ; dossier de presse ; 10 jan 2013.
40. Roselyne G. Spectrométrie de masse et dépistage néonatal. Laboratoire de biologie et de recherche pédiatriques. American Memorial Hospital ; CHU de Reims ; France. Jan-fév 2015.73(1) :107.
41. Navoni C .validation d'une méthode Fluorimétrique de dosage de la phénylalanine dans le cadre du dépistage néonatal selon la norme NF en ISO 15189[thèse]. France: Université Claude Bernard– Lyon 1 ; 2014 23-7.
42. American college of medical genetics and genomics. Phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis and management guideline. Genetics in medicine; Jan 2014.
43. William JM, Stephen KB .Biochimie médicale, physiopathologie et diagnostic.
44. Makni H, St-Hilaire C, Robb L, Larouche K, Blancquaert I ; La spectrométrie de masse en tandem et le dépistage néonatal sanguin au Québec. Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en Santé. Mar 2007 ; 9p.
45. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme : le point sur les utilisations actuelles. Hôpital Debrousse, Lyon. mai-juin 2004. 62(3) : 270p.
46. Aymé S, Burllet C, Chabrol B, Cheillan D, Feillet F, Garnotel R, et al. Évaluation a priori de l'extension du dépistage néonatal à une ou plusieurs erreurs innées du métabolisme par la



technique de spectrométrie de masse en tandem en population générale en France. Jui 2011 (1) : 28p.

47. Rouessac F, Rouessac A, Cruché D, Ourisson G. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6e éd. 36, 119, 205p.

48. Rivero A, Allué JA, Grijalba A, Palacios M, García Merlo S. Comparison of two different methods for measurement of phenylalanine in Dried Blood Spots ; clinical chemistry service, hospital de Navarra : Spain ; 2000.

49. Mokaddem M. Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique [thèse]. Maroc : université pierre et marie curie et université 7 novembre à Carthage.21 Oct 2008.

50. Bridget M, Stroup A , Patrice K, Held B , Williams P , Murray K. Clayton C , Sangita G. Murali A et al. Clinical relevance of the discrepancy in phenylalanine concentrations analyzed using tandem mass spectrometry compared with ion-exchange chromatography in phenylketonuria. Molecular genetics and metabolism reports.2016; 16p.

51. Dong MW. Modern HPLC for practicing. Synomics Pharmaceutical Services. 2006; 2p.

52. Snyder LR, Kirland J, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography, third edition.

53. Haddou M ; Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène [thèse]. France: université de Toulouse. Fév 2010.

54. Santagata S, Di Carlo E, Carducci C, Leuzzi V, Angeloni A, Carducci C. Development of a new UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of biopterin and neopterin in dried blood spot.2017 Jan 18.

55. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, Ogier H et al. Consensus national sur la prise en charge des enfants dépistés avec une hyperphénylalaninémie. Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia : the french guidelines ; 7 fév 2005 ; 596p.

56. Huikun D, Ning L, Zhenhua Z, Yiqian L, Yin W, Zhifeng L et al ; Non-invasive prenatal testing of pregnancies at risk for phenylketonuria . Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2018; F1–F6.

57. Liu N, Kong XD, Zhao DH, Wu QH, Li XL, Guo HF et al. Prenatal diagnosis of Chinese families with phenylketonuria ; 14616p.

58. La phénylcétonurie validée par le Conseil médical des feux follets [en ligne]. [Consulté le 18-01-2018]. Disponible sur :

<file:///C:/Users/NTICTrading/Desktop/phenylcétonurie/La%20phénylcétonurie%20-%20Les%20Feux%20Follets.html>

## BIBLIOGRAPHIE

---



59. Ouvrage : « La phénylcétonurie. Pas à pas » rédigé par des diététiciens liés aux Centres pour les maladies métaboliques héréditaires.
60. Maureen AC. Phenylketonuria, Pediatrics and child Health; 2010.63p.
61. Ducauze C, Baillet-Guffroy A et Thanh X. Bui ; Choix et validation d'une méthode d'analyse.
62. Hubert JJ, Nguyen-Huu B, Boulanger E, Chapuzet P, Chiap N. Cohen et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches ; STP PHARMA PRATIQUES. Mai-Juin 2003 ; 13(3) 101-7 et 112-19p.
63. Mayor M, Bourrié G. Validation d'une méthode de chimie analytique, Application au dosage des anions fluorure, chlorure, nitrite, bromure, nitrate, phosphate et sulfate par chromatographie ionique ; 2010 ; 117p.
64. Patricia L. Barry BS, James O. Validation de la méthode de base, Transfert d'intervalle de reference.
65. Aouaitia A. Rezki M. Porphyrie : Dosage de la Protoporphyrine IX Dans le Sang total par Spectrofluorimétrie, Mise au Point et validation de la méthode [mémoire]. Université d'Alger Centre ; 2016.
66. Bouklouze A, Cherrah Y. Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (profil d'exactitude) ; les techniques de laboratoire. Mar-Avr 2009 ;(14) :6p.
67. Bouaïssia W, Abidb M et Ben Hamida N. Optimisation et validation d'une méthode du dosage par HPLC/DAD d'un antihypertenseur le ZOFENOPRIL ; Journal de la société chimique de Tunisie, 2013, 41p.
68. Feinberg M, Laurentie M. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude ; Le Cahier des Techniques de l'Inra. 2010 ; 18p.
69. Vassault A, Hulin E, Chapuzet J, Arnaud C, Giroud et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse ; Qualité et accréditation en biologie médicale Ann Biol Clin 2010; 68(1):247-94.
70. Damien J. Comparaison de méthodes pour le dosage de la Transferrine déficiente en carbohydrate. Laboratoire Future Lab BBR-LTC. Mar 2011 ; 24p.
71. Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique Méthode de Bland et Altman ; France. 2004 ; 128p.
72. Henny J. Établissement et validation des intervalles de référence au laboratoire de biologie Médicale. Mar-Avr 2011 ; 69(2). Disponible sur : [http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/etablissement\\_et\\_validation\\_des\\_intervalles\\_de\\_reference\\_au\\_laboratoire\\_de\\_biologie\\_medicale\\_287828/article.phtml?tab=texte](http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/etablissement_et_validation_des_intervalles_de_reference_au_laboratoire_de_biologie_medicale_287828/article.phtml?tab=texte)

## BIBLIOGRAPHIE

---



73. Bouabre EA. Contribution à l'établissement des valeurs de référence de paramètres biologiques chez le burkinabe adulte [Thèse].2003.
74. Miegerville M. Biochimie clinique et hématologie chez des chevaux de sport : Etablissement de valeurs usuelles et étude des effets de l'Age et du sexe [thèse]. Lyon : Université Claude-Bernard-Lyon I.11 Déc 2015.
75. Pierre N, Jousserand G. Valeurs de référence de l'électrocardiogramme chez le singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*) [thèse]. Toulouse : Université Paul-Sabatier de Toulouse. 2013.
76. Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, Hyltoft Petersen P, Queraltó JM, Schiele F et al. Réviser le concept de valeurs de référence : une nécessité, jui-aou 2001; 59(4).
77. Henny J, Arnaud J, Giroud C, Vassault A, et les membres du sous-groupe 2 analytique Groupe de travail SFBC « Accréditation des laboratoires de biologie médicale ». Intervalles de référence : détermination et vérification ; Qualité et accréditation en biologie médicale. Ann Biol Clin ; 2010 ; 68 (1) : 305-13.
78. Fauchon E. Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques mesurées par le sysmex XT-2000iV pour des spécimens sanguins collectés dans des microtubes contenant de l'EDTA chez le chat [thèse]. 2011.
79. Kamoun P. Frejaville JP. Guide des examens de laboratoire. Paris : 4<sup>ième</sup> éd. Médecine et science Flammarion.
80. Pecce R, Scolamiero E, Ingenito L, Parenti G, Ruoppolo M. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine, quantization in dried blood spot. 2013; 1p.
81. Ben ziada A, Cherfouch OK. Optimisation et validation d'une méthode de dosage du methotrexate par HPLC\_DAD en vue du suivi thérapeutiques des patients [mémoire].Alger : université d'Alger centre ; 2016.
82. Extract of Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen ; HPLC Principe et appareillage ; jan 2010.
83. Zerrouni S, Zemmouri LS. Dosage du 5-HIAA urinaire, comparaison entre la chromatographie liquide à haute performance et la chromatographie sur colonne [mémoire]. Alger : université d'Alger ; 2014.
84. Serrai HE, Tedjar M. Développement et validation d'une méthode d'analyse - HPLC de la ribavirine [mémoire]. Setif : université Ferhat Abbas. Mai2017.
85. Roman K, Pavla Z. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. Journal of chromatography B, 877(2009) 3926-29.

**Annexe I** : Teneur en acides aminés et en phénylalanine de différents aliments et quantité d'aliments pour une portion contenant 20 mg de Phe.

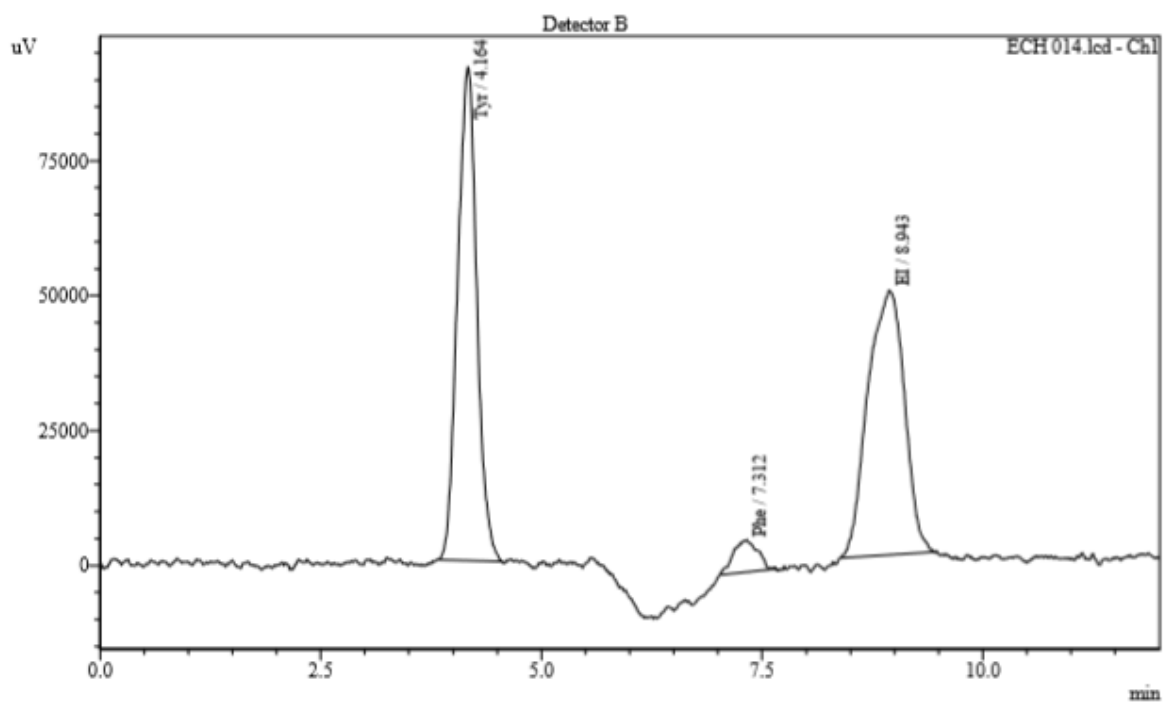
Il existe des tableaux d'équivalence entre les parts de phénylalanine et les quantités des aliments naturels. Chaque personne doit adapter la quantité des aliments naturels qu'elle mange en fonction du nombre de parts de phénylalanine qu'elle est autorisée à prendre et qui dépend de sa tolérance en phénylalanine

La tolérance en phénylalanine (quantité de phénylalanine par jour) est relativement constante avec l'âge pour atteindre un même objectif de Phe plasmatique. Cette tolérance va augmenter avec l'élargissement du régime après l'âge de 10 ans.

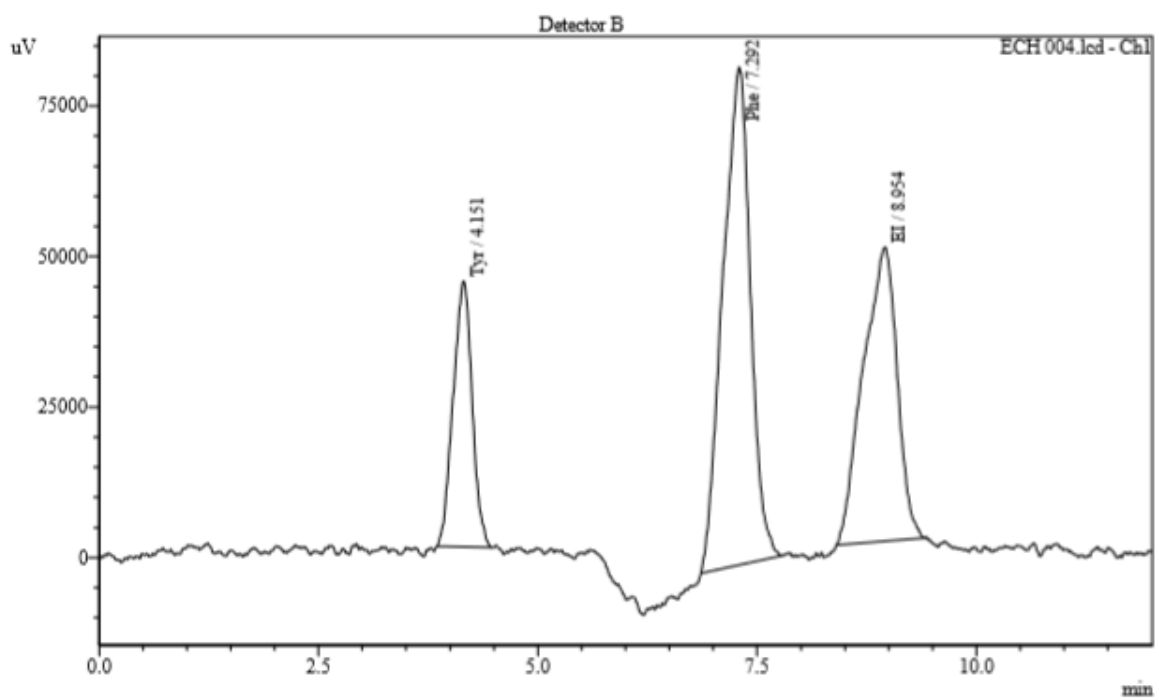
Aliment	AA totaux (%)	Phé (mg/100 g)	1 portion en g = 20 mg de Phé
<b>Interdits</b>			
Viande	4	970	2,06
Riz	4,90	390	5,12
Lait	4,90	170	11
<b>À peser</b>			
Choux	3,30	140	14,3
Haricots verts	3	73	28
Carottes	3,10	31	64
Pomme	3,50	9	222
<b>Sans restriction</b>			
Beurre	0,00	0	
Sucre	0,00	0	

## Annexe II : Exemples de chromatogrammes.

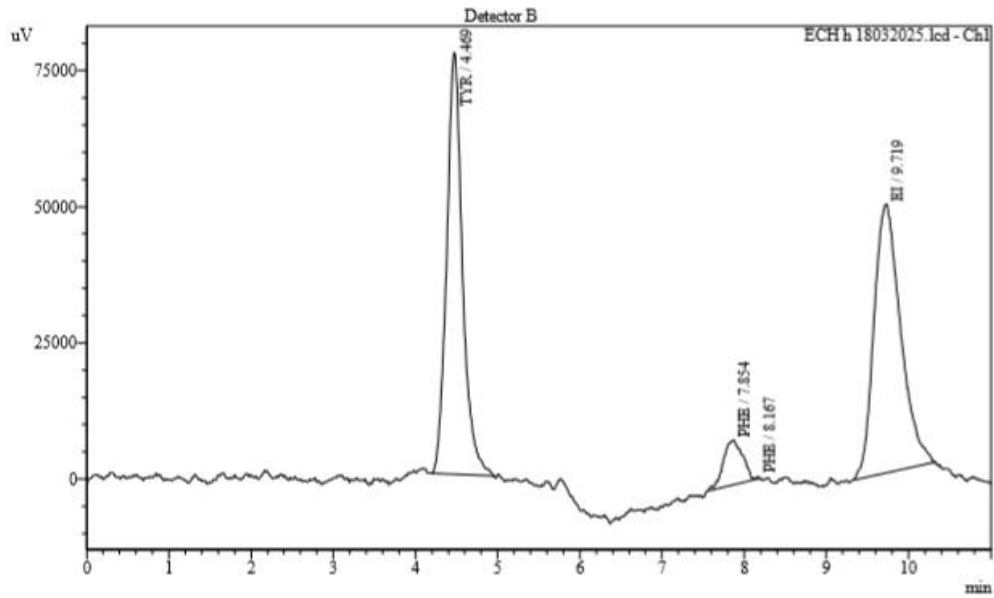
### 1. Exemple de chromatogramme négatif de la population de comparaison



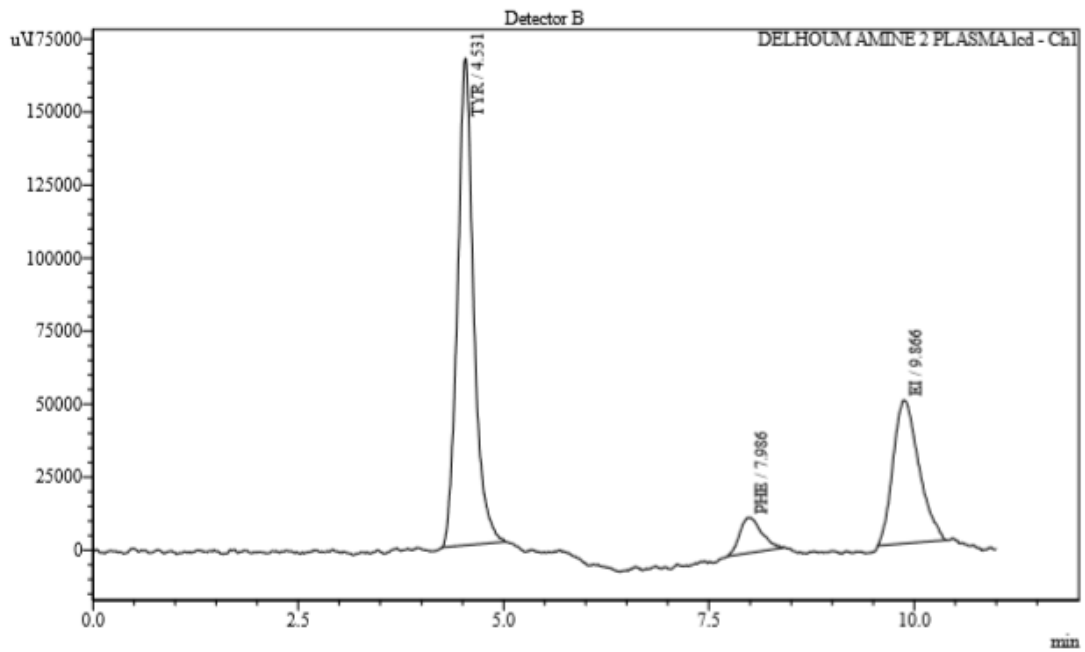
### 2. Exemple de chromatogramme positif de la population de comparaison



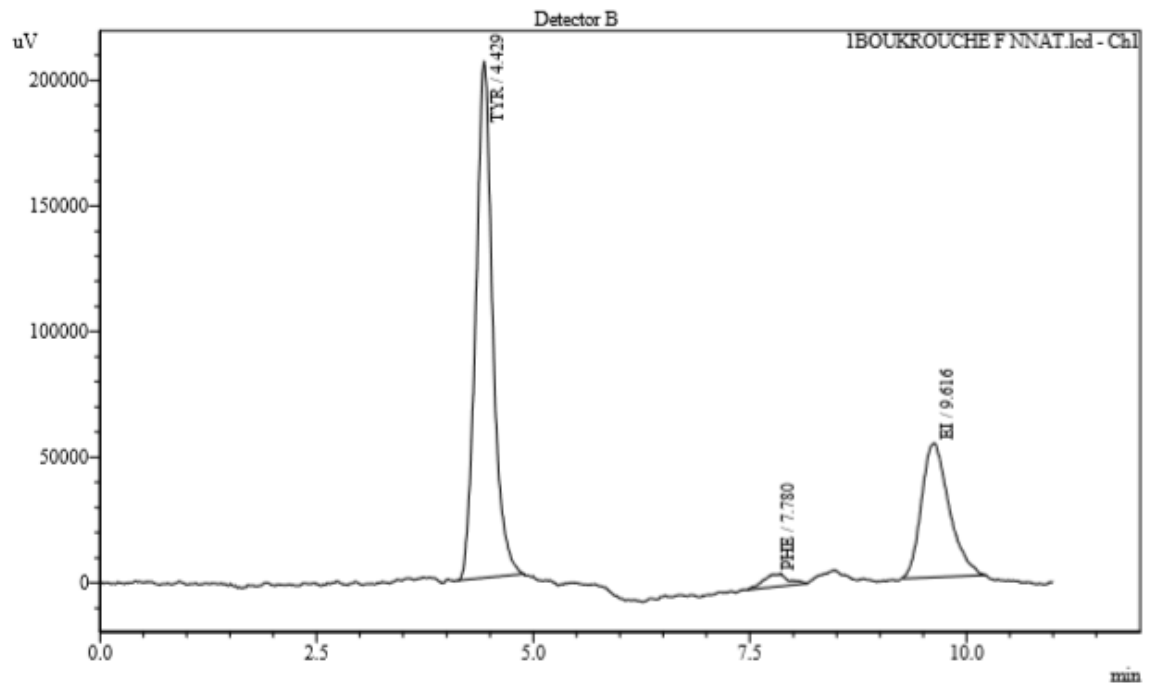
### 3. Exemple de chromatogramme de la population adulte



### 4. Exemple de chromatogramme de la population pédiatrique.



## 5. Exemple de chromatogramme de la population de néonatalogie



## Résumé

Une méthode HPLC en phase inversé a été développée pour le dosage de la Phe plasmatique basée sur la fluorescence naturelle des cycles aromatiques.

Après une étape de validation analytique ; la finalisation par comparaison des méthodes et établissement des valeurs de référence était l'objectif de notre travail.

L'étude descriptive montre une concordance parfaite dans l'interprétation des résultats. La comparaison des méthodes selon les recommandations de SFBC prouve que les différences entre les deux techniques sont acceptables ; néanmoins la relation mathématique liant les résultats n'a pas pu être établie.

Les valeurs de référence des trois populations étudiées « adulte, pédiatrique et néonatalogues » saines sont revenues dans la majorité inférieures à la limite de quantification 13,08 mg/l et au domaine des valeurs de référence de la technique de comparaison. Raison pour laquelle on a préféré garder l'intervalle de la technique de comparaison vu qu'elles sont identifiées sur la même population de référence.

La technique est donc jugée apte à être utilisée en routine. Les limites enregistrées n'entravent pas la valeur clinique du dosage, mais il reste souhaitable de perfectionner la technique pour qu'elle devienne plus sensible avec une limite de linéarité plus élevée.

Mots clés : HPLC, acides aminés, Phe, C8, PCU.

## Abstract

An inverted phase HPLC method has been developed for the determination of plasma Phe based on the natural fluorescence of aromatic cycles.

After an analytical validation step, finalization by comparison of methods and establishment of reference values was the objective of our work.

The descriptive study shows a perfect concordance in the interpretation of the results. The comparison of methods according to the SFBC recommendations proves that the differences between the two techniques are acceptable; nevertheless, the mathematical relationship linking the results could not be established.

The reference values of the three studied healthy populations "adults, paediatric and neonatal" were mostly below the limit of quantification of 13.08 mg/l and the range of reference values for the comparison technique. Therefore we preferred to keep the interval of the comparison technique since they are identified on the same reference population. The technique is therefore considered suitable for routine use. The limits recorded do not interfere with the clinical value of the assay, but it remains desirable to improve the technique so that it becomes more sensitive with a higher linearity limit.

Keywords : HPLC, amino acids, Phe, C8, PCU.