

Dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS

Transmission au ministre : 5 novembre 2018

Publication officielle : 4 janvier 2019

Une production de l'Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux (INESSS)

Direction des services de santé et de l'évaluation
des technologies

DOSAGE DES PURINES ET PYRIMIDINES URINAIRES PAR LC-MS/MS (RÉFÉRENCE°– 2018.01.003P)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

**1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Estrie-Centre hospitalier
universitaire de Sherbrooke**

**1.2. Date de transmission de l'avis au ministre : 5 novembre
2018**

1.3. Date de publication de l'avis : 4 janvier 2019

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes chargées de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

M. Guy Fink et Mme Suzanne Bédard n'ont pas participé aux délibérations et se sont retirés au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation de même que l'exactitude du contenu en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D^r Amichai Grunbaum, biochimiste médical au CISSS de Laval.

2. RÉSUMÉ

La chromatographie en phase liquide (LC) combinée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet d'identifier un spectre de 30 métabolites grâce à la détection de molécules qui ne pouvaient l'être par le système LC-UV en raison de leur impossibilité à absorber les rayons ultraviolets. Toutefois, la question de savoir quand soupçonner une erreur innée du métabolisme des purines et pyrimidines demeure épineuse. L'analyse des purines et des pyrimidines urinaires devrait être effectuée chez tout patient présentant des symptômes tels que des troubles de développement et de comportement, des problèmes neurologiques, des calculs rénaux et des maladies associées à une déficience immunitaire inexplicée, entre autres.

Utilité et validité clinique

L'identification d'erreurs innées par LC-MS/MS a permis de confirmer la présence de mutations pathogéniques chez les enfants présentant des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines. De même, une identification des déficits enzymatiques a été effectuée chez des enfants présentant des symptômes neurologiques non spécifiques. La répartition en groupes d'âge a révélé des fluctuations dans l'excrétion de certains métabolites de pyrimidines ou purines. De ce fait, la détection de légères augmentations des produits de dégradation des pyrimidines chez les patients portant des erreurs innées nécessiterait une méthode de sélection quantitative associée à des intervalles de référence établis selon l'âge du patient. La précision, la reproductibilité et le pourcentage de récupération réalisés en utilisant un système LC-MS/MS présentent un atout pour la détection rapide de plusieurs métabolites en une analyse. Il serait néanmoins essentiel que les intervalles de référence pour chaque métabolite soient calculés par chaque laboratoire. La méthode proposée a révélé une performance analytique pour la détection de l'adénosine, de la xanthine et de l'hypoxanthine qui s'est distinguée de celles des études publiées. Toutefois, une sensibilité limitée du LC-MS/MS a été rapportée pour la détection de l'acide orotique.

Impact budgétaire

Le rehaussement technologique de la méthode de dosage des purines et pyrimidines pourrait occasionner une réduction de coûts d'environ 96 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

Positions ou orientations d'organisations d'intérêt

Le collègue américain de génétique et génomique médicale suggère une analyse des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de l'acide urique contenu dans le sérum et l'urine des patients atteints de troubles du spectre de l'autisme, tout en émettant des réserves sur la recommandation de l'analyse comme test de routine.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

L'analyse proposée est le dosage des purines et pyrimidines urinaires par le moyen de la chromatographie en phase liquide (LC) combinée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

3.2. Description de la méthode

Chaque échantillon d'urine est dilué dans de l'eau et enrichi avec un mélange de standards internes (ISTD). Les ISTD servent à normaliser les résultats en cas de perte pendant la procédure ou d'effet de matrice¹. Les échantillons dilués sont ensuite injectés sur un système LC-MS/MS pour analyse. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne de type C18. La détection par spectrométrie de masse en tandem implique plusieurs ions (annexe A). La quantification est réalisée par une courbe de calibration à partir de solutions constituées de 30 purines et pyrimidines, ainsi que de la créatinine, toutes dissoutes dans de l'eau. Les concentrations de purines et pyrimidines sont normalisées par la créatinine (information recueillie du document de procédure opérationnelle normalisée fourni par le demandeur).

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Un échantillon d'urine congelé d'au moins 0,5 ml est expédié directement au laboratoire de génétique biochimique du CIUSSS de l'Estrie-CHUS par le laboratoire du centre demandeur. L'échantillon est inscrit au système après réception puis analysé et quantifié. Les résultats sont interprétés, et validés avant leur transmission au médecin requérant.

3.4. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison.

3.5. Homologation

L'analyse n'est homologuée ni par Santé Canada ni par la FDA. Le centre demandeur est agréé par le Collège canadien des généticiens médicaux (CCGM).

3.6. Valeur pondérée : 15,77

¹ Phénomène caractérisé par la coélution de certains composés des milieux biologiques avec les analytes d'intérêt en altérant leur ionisation [Deville *et al.*, 2013].

4. CONTEXTE

L'analyse portant sur le dosage des purines et pyrimidines par HPLC-UV est déjà inscrite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après *Répertoire*). Le présent avis d'évaluation porte sur un rehaussement technologique visant à adapter l'analyse effectuée à une plate-forme HPLC-MS/MS.

4.1. Patients ciblés

Patients atteints de maladies rénales et neurodéveloppementales. Le demandeur estime les nouveaux cas de troubles du métabolisme des purines et pyrimidines à environ deux par année au Québec.

Il est toutefois à noter que la grande variabilité de présentations cliniques allant d'une immunodéficience sévère combinée aux symptômes neurologiques ou aux calculs rénaux justifierait l'impossibilité de limiter le dosage des purines et pyrimidines à un groupe de patients restreint [Jurecka, 2009; Duran *et al.*, 1997]. De manière générale, les antécédents familiaux de maladie non diagnostiquée dans la fratrie, de la consanguinité parentale ou encore une mort néonatale inexpliquée sont des indicateurs d'un éventuel trouble métabolique d'origine génétique [Cyr *et al.*, 2002]. L'utilisation d'un système HPLC-MS/MS serait également adéquate pour assurer le suivi de la quantité de thymidine excrétée dans l'urine d'un patient atteint de MNGIE² pendant un traitement de dialyse [La Marca *et al.*, 2006b].

4.2. Description de la maladie visée

Les purines et pyrimidines sont des précurseurs de l'ADN et de l'ARN. Leur synthèse, leur recyclage et leur catabolisme requièrent un nombre important de processus métaboliques, tous catalysés par des enzymes différentes [La Marca *et al.*, 2006a]. Un dysfonctionnement dans le métabolisme de purines et de pyrimidines engendre des concentrations anormales de celles-ci ou de leurs métabolites présents dans les fluides biologiques, et ce, en raison d'une diminution ou d'une augmentation des activités enzymatiques [Jurecka, 2009; Van Gennip, 1999]. Les purines et pyrimidines sont détectables dans le plasma, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien. Le liquide biologique de choix pour leur analyse demeure cependant l'urine, compte tenu de sa composition incluant des produits de dégradation générés par l'organisme [Van Gennip, 1999]. Le diagnostic des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines présente un défi à cause des symptômes, généralement variables, non spécifiques et susceptibles d'apparaître à tout âge. De ce fait, les désordres métaboliques des purines et pyrimidines sont souvent sous-diagnostiqués [Sun, 2016; Simmonds *et al.*, 1997].

Plus de 35 types de déficits enzymatiques associés à la synthèse de nucléotides et au métabolisme de purines et pyrimidines ont été repérés, parmi lesquels 17 à 18 pourraient avoir de sérieuses répercussions cliniques [Bakker et Bierau, 2012; Simmonds *et al.*, 1997; Simmonds, 1994]. Certaines affections associées aux

² Encéphalopathie mitochondriale neuro-gastro-intestinale, de l'anglais « Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy » (MNGIE).

anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines et qui pourraient être détectées à partir d'une analyse d'urine sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 Troubles héréditaires associés aux anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines

Déficits enzymatiques	Métabolites	Manifestations cliniques
Adénine Phosphoribosyltransférase (APRT)	Adénine (élevé) 2-8 Dihydroxyadénine (élevé)	Insuffisance rénale grave, Urolithiase
Adénosine déaminase (ADA)	Désoxyadénosine (élevé) Adénosine (parfois élevé)	Immunodéficience sévère combinée
Purine nucléoside phosphorylase (PNP)	Acide urique (bas) Désoxyinosine (élevé) Désoxyguanosine (élevé) Inosine et Guanosine (élevé)	Retard de développement, immunodéficience, diplégie, déficit neurologique
Xanthine oxydase (XOD) (XDH, xanthinurie héréditaire)	Xanthine (élevé) Hypoxanthine (élevé) Acide urique (bas)	Crises néonatales, insuffisance rénale, parfois asymptomatique, myopathie, atrophie cérébrale
Cofacteur du molybdène	Hypoxanthine (élevé) Acide urique (bas)	Crises néonatales, épilepsie, déficit neurologique
Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT)	Hypoxanthine (élevé) Acide urique (élevé)	Goutte, calculs urinaires, insuffisance rénale, déficit neurologique, automutilation, syndrome de Lesch-Nyhan
Superactivité de la phosphoribosylpyrophosphate synthétase (PRPS superactivité)	Urique (élevé) Hypoxanthine (élevé)	Néphropathie, arthrite goutteuse, déficit neurologique, dysmorphie, surdité
Adénylosuccinase (adénylosuccinate lyase)	Succinyladénosine (semi-quantitatif)	Retard psychomoteur, épilepsie, autisme
Uridine monophosphate synthase (UMPS)	Acide orotique (élevé)	Anémie, retard de croissance, immunodéficience
Ornithine transcarbamylase (OTC)	Acide orotique (élevé)	Hyperammoniémie, troubles neurologiques
Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD)	Uracile (élevé) Thymine (élevé)	Microcéphalie, épilepsie, autisme, déficit neurologique
Dihydropyrimidinase (DHP)	Dihydrouracile (élevé) Dihydrothymine (élevé)	Microcéphalie
Thymidine phosphorylase (TP) (syndrome MNGIE)	Thymidine, désoxyuridine	Troubles de motricité gastro-intestinale, neuropathie périphérique, ophtalmoplégie externe chronique progressive

Source : tableau modifié et adapté de Bakker et Bierau, 2012; Nyhan, 2005; Cyr *et al.*, 2002.

Abréviation : MNGIE : Encéphalopathie mitochondriale neuro-gastro-intestinale, de l'anglais « Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy » (MNGIE)

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Un total de 50 à 70 tests a été anticipé par année pour le CIUSSS de l'Estrie-CHUS. Une estimation de 650 à 700 tests annuels a été prévue pour l'ensemble du Québec.

La nouvelle analyse nécessitera 5 jours ouvrables et sera réalisée une fois par semaine.

4.4. Données médico administratives

Au Québec, un test au *Répertoire* permet de réaliser le dosage des purines et pyrimidines par HPLC-UV : chromatographie en phase liquide de haute performance, couplée à un détecteur ultra-violet (tableau 2). Le rehaussement technologique permettrait d'utiliser désormais une plate-forme LC combinée à la spectrométrie de masse en tandem pour la détection des purines et pyrimidines (LC-MS/MS).

Tableau 2 Volumétrie de l'analyse par LC-UV du Répertoire (code 50605)

Année administrative	Valeur pondérée	Nombre d'analyses	Total (\$)
2015-2016*	63	636	40 068
2016-2017†	63	697	43 911

Source : données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS).

* : Les tests ont été effectués par le CHU de Québec-Université Laval (n = 1) et le CIUSSS de l'Estrie – CHU de Sherbrooke (n = 635).

† : Les tests ont été effectués par le CIUSSS de l'Estrie – CHU de Sherbrooke.

4.5. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Le transfert de l'analyse des purines et pyrimidines par HPLC-UV vers un système HPLC-MS/MS comporte, selon le demandeur, les avantages suivants :

- ✓ Obtenir une meilleure sensibilité, spécificité, exactitude et reproductibilité pour le dosage de chaque métabolite inclus dans le profil;
- ✓ Éviter plusieurs interférences potentiellement causées par la prise d'un traitement ou d'un régime alimentaire spécifique du patient;
- ✓ Augmenter de 15 métabolites la capacité du test en permettant d'identifier un spectre plus large de maladies héréditaires associées au métabolisme des purines et pyrimidines, grâce à l'analyse de 30 métabolites au total.

4.6. Assurance qualité

Le demandeur participe aux deux programmes européens d'assurance qualité externe suivants :

- ✓ Le « ERNDIM³ Diagnostic Proficiency Testing », évaluant la performance analytique et l'expertise dans l'interprétation des données des laboratoires;
- ✓ Le « ERNDIM Urine Purines and Pyrimidines Scheme », qui assure la comparaison entre les résultats générés pour l'analyse des purines et pyrimidines dans différents laboratoires, en se référant aux valeurs médianes et aux données ciblées⁴. Le demandeur a mentionné la participation continue du laboratoire à ce programme (voir annexe B).

5. DONNÉES PROBANTES

5.1. Valeur diagnostique

La valeur diagnostique sera appuyée par des études cliniques dont l'objectif était d'établir ou de confirmer un diagnostic en utilisant les valeurs de référence des métabolites recherchés. Cette section décrit trois études pour lesquelles la technique HPLC-MS/MS ou RP-HPLC-ESI-MS/MS⁵ est utilisée pour établir ou confirmer un diagnostic [Mamedov *et al.*, 2017; La Marca *et al.*, 2006b; Schmidt *et al.*, 2005].

Les valeurs de références des métabolites de purines et pyrimidines et leur pertinence diagnostique.

Mamedov et ses collaborateurs [2017] ont réalisé une étude dans le but d'établir des valeurs référentielles permettant de poser un diagnostic à l'aide d'un système HPLC-MS/MS. Les échantillons d'urine sont prélevés chez 42 enfants hospitalisés et susceptibles de présenter des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines. Le groupe contrôle comptait les enfants dont l'absence de maladies métaboliques héréditaires avait été vérifiée. L'analyse du chromatogramme a révélé un pic dominant illustrant la présence d'un métabolite chez l'enfant malade tandis qu'il était inexistant chez l'enfant sain.

Les intervalles de référence de chaque métabolite urinaire n'ont pas révélé de différences majeures dans les concentrations mesurées chez les trois groupes d'âge, dont 3 à 23 mois, 2 à 8 ans et 9 à 17 ans. Les valeurs n'ont changé que pour l'adénine et la xanthine, avec des différences négligeables inférieures à 5 % entre les deux groupes plus jeunes.

Par ailleurs, les diagnostics présentés dans le tableau 3 ont été posés en utilisant les résultats produits à partir d'une méthode non spécifiée, et les tests génétiques pour confirmer la présence de mutations pathogéniques le cas échéant.

³ European Research Network for evaluation and improvement of screening, diagnosis and treatment of inherited disorders of Metabolism.

⁴ ERNDIM. Purines and Pyrimidines in Urine [site Web], disponible à : <http://cms.erndimqa.nl/Home/Purines-and-Pyrimidines-in-Urine.aspx> (consulté le 29 août 2018).

⁵ RP-HPLC-ESI-MS/MS chromatographie en phase liquide inverse à haute performance (RP-HPLC) combinée à l'électronebulisation (ESI) et à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Des 42 enfants, 18 portaient des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines (tableau 3).

Tableau 3 Diagnostic et caractéristiques des patients portant des anomalies métaboliques de purines et pyrimidines

Nombre de patients (total : n = 18)	Affections	Métabolites	Concentrations (mmol/mol de créatinine)
2	Déficits en DPD	Uracile	325 et 228
3	Déficit en DHP	Dihydrouracile	189, 202, et 263
		Thymine	12 à 23
		Uracile	36, 82
3	Syndrome de Lesch-Nyhan	Acide urique	958, 1 325, et 1 411
1	Hyperactivité de PRPS type 1	Xanthine	64
3	Xanthinurie héréditaire, XOR	Xanthine	44, 58 à 98
2	Déficit en PNP	Inosine	15 et 29
		Guanosine	23 et 39
		Désoxyguanosine	24 et 26
4	Acidurie orotique héréditaire	Acide orotique	Augmentation prononcée 380 à 1 540

Source : Mamedov *et al.*, 2017.

Abréviations : DPD : Dihydropyrimidine déshydrogénase, DHP : Dihydropyrimidinase, PNP : Purine-nucléosyle-phosphorylase, PRPS : Phosphoribosyl pyrophosphate synthase, XOR : Xanthine oxydoréductase.

Les auteurs ont rapporté des incohérences entre les intervalles de référence indiqués par une étude rétrospective et leurs calculs en ce qui concerne la Xanthine, l'uracile, la thymine, l'acide orotique et le dihydrouracile. Leurs limites supérieures pour ces métabolites étaient 1,5 à 5 fois plus élevées que celles de valeurs de référence calculées dans cette étude.

La différence observée dans les échantillons venant de patients contribuerait selon les auteurs aux incohérences entre les valeurs référentielles des laboratoires. Ils recommandent donc que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles de référence pour l'analyse des marqueurs de maladies métaboliques héréditaires. Les résultats obtenus ont révélé l'importance pour les laboratoires de scruter davantage les métabolites ayant des concentrations pathologiques très étendues, afin d'établir des diagnostics d'erreurs innées du métabolisme des purines et pyrimidines [Mamedov *et al.*, 2017].

Détection des pyrimidines urinaires et leurs produits de dégradation chez des patients atteints de troubles neurologiques non spécifiques

Dans une étude observationnelle de Schmidt et ses collaborateurs [2005], les produits de dégradation des pyrimidines ont été recherchés par RP-HPLC-ESI-MS/MS (chromatographie en phase inversée) chez les patients atteints de différents troubles neurologiques non spécifiques, d'un retard de croissance ou de malformations physiques. Les métabolites détectés étaient notamment : le dihydrouracile (DHU), la dihydrothymine (DHT), β -uréidopropionate (β -UP), β -uréidoisobutyrate (β -UIB), β -alanine (β -ALA), β -aminoisobutyrate (β -AIB).

Une comparaison entre deux cohortes d'enfants du même groupe d'âge (nouveaux-nés à 18 ans) malades (n = 450) ou sains (n = 200) a révélé des différences significatives dans l'excrétion de trois métabolites. La thymine avait une concentration moins élevée chez les patients que chez les sujets sains ($p = 0,002$). Tandis que la concentration de DHU était plus élevée chez les patients ($p = 0,0065$). Les différences observées entre les autres métabolites détectés chez les deux groupes n'étaient pas significatives [Schmidt *et al.*, 2005].

Parmi les 17 patients présentant une excrétion urinaire élevée de pyrimidines ou autres métabolites, une déficience en dihydropyrimidine déshydrogénase a été rapportée chez un garçon et une fillette qui avaient des taux d'uracile et de thymine pathologiquement élevés (tableau 6). Les valeurs anormales d'uracile et de thymine du garçon culminaient spécifiquement pendant les périodes d'infections combinées à des crises épileptiques, puis redevenaient normales pendant la rémission du patient [Schmidt *et al.*, 2005].

Tableau 4 Déficience et symptômes des patients atteints d'affections neurologiques

Nombre de patients (total : n =°17)	Déficits enzymatiques (métabolites)	Concentration de métabolites ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine)	Présentations cliniques
1 (fille de 3 ans)	DPD présence de mutation DPYD*2A (uracile et thymine élevés)	Uracile : 269 Thymine 387	Crises d'épilepsie toniques, développement psychomoteur normal
1 (garçon de 4 ans)	DPD (uracile et thymine élevés)	Uracile : 440 Thymine : 400	Crises d'épilepsie tonico-clonique pendant des épisodes de fièvre et infection accompagnée de régression de la réactivité, perte de motricité, retard du langage
1 (garçon de 6 ans)	OTC (uracile, DHU et β -UP élevés)	Uracile : 275, 1314 DHU : 24, 194 β -UP : 36, 261	Épisodes récurrents de vomissements, conscience réduite
1 (fille de 9 ans)			Retard psychomoteur, rétinite pigmentaire, nystagmus, épisodes récurrents d'hyperammoniémie, hépatosplénomégalie
9 (patients traités à la vigabatrine*)	GABA transaminase (β -ALA élevé)	β -ALA (136 à 511)	Non rapportée
4	D- β -AIB-pyruvate aminotransférase (β -AIB élevé)	β -AIB (430 à 1138)	Probablement aucune manifestation clinique

Source : Schmidt *et al.*, 2005.

Abréviations : β -aminoisobutyrate (β -AIB), β -alanine (β -ALA), la dihydrothymine (DHT), le dihydrouracile (DHU), GABA : l'acide γ -aminobutyrique, OTC : Ornithine transcarbamylyase, β -uréidoisobutyrate (β -UIB), β -uréidopropionate (β -UP),

* la vigabatrine est un inhibiteur irréversible de la GABA transaminase.

Une stratification des enfants des groupes patients et témoins en tranches d'âges de 0 à 1 an (n = 143 patients, 56 témoins), de 2 à 5 ans (n = 151 patients, 61 témoins), de 6 à 10 ans (n = 99 patients, 54 témoins) et de 11 à 18 ans (n = 57 patients, 29 témoins) a montré qu'avec l'augmentation d'âge, une diminution de l'excrétion des pyrimidines comparativement à celle de la créatinine a été observée. Par ailleurs, malgré les différents groupes d'âge, les quantités de thymine, d'uracile et leurs produits de dégradation demeuraient inchangés, lorsque l'excrétion de la créatinine passait de 3,2 $\mu\text{mol}/\text{l}$ dans la première année à 8,4 $\mu\text{mol}/\text{l}$ de 11 à 18 ans [Schmidt *et al.*, 2005].

Une comparaison entre les quantités de produits de dégradation des pyrimidines des patients et celles des contrôles a révélé que l'excrétion de la thymine dans les contrôles était plus élevée, tandis que l'uracile, β -UP, β -UIB, β -ALA et β -AIB était à concentration égale dans les deux groupes.

Les auteurs mentionnent la détection de légères augmentations des catabolites chez le patient portant des anomalies du métabolisme de pyrimidines. De ce fait, les catabolites nécessitent une méthode de sélection quantitative associée à des intervalles de références établis selon l'âge du patient. Ils recommandent d'associer l'excrétion des métabolites de pyrimidines à la concentration urinaire de créatinine qui faciliterait la distinction entre les valeurs normales et pathologiques de ces métabolites. Les déficiences en dihydropyrimidine déshydrogénase et en dihydropyrimidinase ont été découvertes chez les individus asymptomatiques [Schmidt *et al.*, 2005].

5.2. Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3. Valeur thérapeutique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de permettre le choix ou la modification d'un traitement.

5.4. Validité analytique

La performance analytique de la méthode LC-MS/MS est étayée dans cette section à travers 4 études de validation utilisant une plate-forme HPLC-ESI-MS/MS [Hartmann *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006a; Schmidt *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2000].

Utilisation d'un système LC-MS/MS de routine pour la détection des anomalies du métabolisme de purines et pyrimidines en une analyse

L'objectif de l'étude de La Marca et ses collaborateurs [2006a] et de celle de Hartmann et ses collaborateurs [2006] était de développer un système d'analyse permettant de regrouper la détection de tous les composés chimiques impliqués dans le métabolisme des purines et pyrimidines et excrétés dans l'urine.

Valeurs de référence des différents métabolites

Les échantillons prélevés de 100 contrôles sains ont servi à établir des valeurs de référence pour purines et pyrimidines à partir d'un groupe de 80 individus de 1 à 40 ans et un autre de 20 enfants âgés d'un an ou moins [La Marca *et al.*, 2006a]. Les métabolites dont les valeurs de référence variaient entre les groupes d'âge ont été inscrits en caractères gras (Tableaux 5 et 6).

Tableau 5 Intervalles de référence de purines basés sur un intervalle de confiance de 97 % de la moyenne ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de créatinine)

Purines	Intervalle de référence (n = 80) 1 an – 40 ans	Intervalle de référence (n = 20) 1 an et moins
Adénine	3 – 11,9	5,5 – 14,9
Adénosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
2-Désoxyadénosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
Succinyladénosine	3,9 – 20,7	3,9 – 20,7
Xanthine	3,8 – 10,9	9 – 24,5
Hypoxanthine	2 – 16,1	8 – 29,5
Guanosine	0,6 – 1,8	0,6 - 1,8
Guanine	0,6 – 4,9	0,6 – 4,9
Inosine	2,3 – 3,8	5 – 7,7
2-Désoxyinosine	0,6 – 1,9	0,6 – 1,9
Acide urique	89 - 491	349 - 698
AICAr	0,6 - 3	0,6 - 3

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Abréviations : AICAr : Aminoimidazole-4-carboxamide riboside

Tableau 6 Intervalles de référence de pyrimidines basés sur un intervalle de confiance de 97 % de la moyenne ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de créatinine)

Pyrimidines	Intervalle de référence (n = 80) 1 an – 40 ans	Intervalle de référence (n = 20) 1 an et moins
Acide orotique	Non rapportée	Non rapportée
Uracile	8 – 14,9	8,5 – 18,9
5-Hydroxymethyluracile	n.d.	n.d.
Dihydrouracile	n.d.	n.d.
Pseudouridine	< 1	< 1
2-Désoxyuridine	0,6 – 0,8	0,6 – 0,8
Uridine	0,6 – 9,6	1,8 – 14,2
Thymine	11 – 12,5	11 – 12,5
Dihydrothymine	n.d.	n.d.
Thymidine	1,1 – 1,9	1,1 – 1,9
β - Alanine	0,1 – 0,5	0,1 – 0,5
Acide β - Aminoisobutyrique	0,1 -10	1 – 1,7
Cytosine	0,6 - 0,8	1 – 2,4
Cytidine	0,1 – 1,2	0,1 – 1,2
Urédopropionate	0,3 – 2,6	0,3 – 2,6

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Abréviations : n.d. : non détectable

Les intervalles de références de certains métabolites notamment, l'adénine, la xanthine, l'hypoxanthine, l'inosine, l'acide urique, l'uracile, l'uridine, la cytosine et l'acide β -aminoisobutyrique, dépendaient de l'âge des individus servant de témoins dans les deux études (Tableaux 5 et 6). Par ailleurs, 77 témoins ont servi à établir des intervalles de références utilisées par Hartmann et ses collaborateurs [2006]. Ils variaient également en fonction des groupes d'âge pour l'uracile la xanthine, l'hypoxanthine et la pseudouridine, contrairement à la guanosine ou à l'acide urique dont les intervalles ne changeaient pas. Les métabolites dont les valeurs variaient en fonction du groupe d'âge sont inscrits en caractères gras dans le tableau 7.

Tableau 7 Intervalles de référence des purines et pyrimidines basés sur un intervalle de confiance de 95 % de la moyenne (mmol/mol de créatinine)

Pyrimidines	Intervalles de référence (n, âge)	Purines	Intervalles de référence (n, âge)
Acide orotique	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Adénine	8 – 9 (n = 77, 0 à 18 ans)
Uracile	8 – 20 (n = 21, ≤4 ans) 6 – 10 (n = 48, >4 ans)	Xanthine	10 – 34 (n = 17, ≤1 an) 9 – 14 (n = 60, >1 an)
Thymine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Hypoxanthine	7 – 34 (n = 17, ≤1 an) 7 – 13 (n = 60, >1 an)
Dihydrouracile	<100 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Inosine	<6 (n = 17, ≤1 an)* <2 (n = 59, >1 an)[†]
Dihydrothymine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2-Désoxyinosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
N-Carbamyl-β-alanine	< 19 (n = 25, ≤4 ans)* < 10 (n = 51, >4 ans)	Adénosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Acide N-Carbamyl-β-aminoisobutyrique	< 17 (n = 17, ≤1 an)* < 10 (n = 60, >1 an)[†]	2-Désoxyadenosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Pseudouridine	64 – 145 (n = 17, ≤1 an) 21 – 31 (n = 60, >1 an)	Guanosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
Uridine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2-Désoxyguanosine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]
2-Désoxyuridine	<2 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	Acide urique	443 – 695 (n = 76, 0 à 18 ans)
5-Hydroxyméthyluracile	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]	2,8-Dihydroxyadénine	n.d. (n = 77, 0 à 18 ans)
Thymidine	n. d. (n = 77, 0 à 18 ans)	Succinyladénosine	<10 (n = 77, 0 à 18 ans) [†]

Source : tableau adapté de Hartmann *et al.*, 2006.

Abréviations : n.d. : non détectable.

* : la limite supérieure de l'intervalle de référence a été définie par la concentration maximale mesurée.

† : La limite supérieure de l'intervalle de référence a été définie par la limite inférieure de quantification.

Précision et reproductibilité de la détection de métabolites des purines et pyrimidines et leur pourcentage de récupération par LC-MS/MS

Les études de La Marca [2006a] et Hartmann [2006] ont révélé des résultats issus des tests de précision et de reproductibilité lors de la détection de métabolites de purines et de pyrimidines. La Marca et ses collaborateurs ont rapporté un coefficient de variation intra journalier variant de 0,1 à 9,8 % pour les six répétitions effectuées sur urine non fortifiée et à basse concentration de créatinine, tandis qu'il variait de 1,6 à 14,1 % pour les mesures inter journalières (données non présentées). La précision a également été évaluée sur urine enrichie avec 12,5 µmol/l du métabolite ciblé (tableau 8). Le pourcentage de récupération variait de 99,38 à 100,58 % (tableau 8).

Tableau 8 Reproductibilité de l'analyse effectuée avec des échantillons urinaires fortifiés et à basse concentration de créatinine (0,88 mmol/l)

Métabolite	Concentration moyenne (µM)	Précision intra journalière (%)	Précision inter journalière (%)	Taux de récupération (%)
Uracile	18,7	1,6	3,5	99,62
Cytosine	14,0	1,2	2,5	99,92
Thymine	22,4	0,6	0,9	99,81
Adénine	15,2	0,2	1,9	100,58
Guanine	15,6	0,4	0,6	100,16
Uridine	19,7	0,7	1,3	100,31
Cytidine	13,6	0,5	1,0	99,84
Thymidine	14,3	0,4	0,6	99,48
Adénosine	13,2	0,4	0,4	99,89
Guanosine	13,8	0,7	1,0	99,71
Désoxyguanosine	13,7	0,7	1,0	99,87
Désoxyadénosine	14,1	0,8	1,6	99,38
Désoxyinosine	14,1	1,3	1,9	99,73
Inosine	14,4	0,3	0,4	99,93
Acide orotique	13,7	0,6	1,3	99,97

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Les auteurs ont aussi rapporté un coefficient de variation intra journalier variant de 0,5 à 17,2 % pour les six répétitions effectuées sur urine non fortifiée et à haute concentration de créatinine, tandis qu'il variait de 1,5 à 29,0 % pour les mesures inter journalières (données non présentées) [La Marca *et al.*, 2006a]. La précision a également été évaluée sur urine enrichie avec 12,5 µmol/l du métabolite ciblé (tableau 9). Le pourcentage de récupération variait de 99,01 à 101,46 % (tableau 9).

Tableau 9 Reproductibilité de l'analyse effectuée avec des échantillons urinaires fortifiés et à haute concentration de créatinine (4,36 mmol/l)

Métabolite	Concentration moyenne (μM)	Précision intra journalière (%)	Précision inter journalière (%)	Taux de récupération (%)
Uracile	31,5	0,1	0,5	99,83
Cytosine	16,2	0,6	0,7	100,03
Thymine	18,9	1,5	1,6	100,51
Adénine	15,1	1,9	4,0	101,46
Guanine	15,4	1,4	2,8	100,04
Uridine	19,2	1,0	1,9	99,84
Cytidine	13,7	1,0	1,9	100,04
Thymidine	13,9	3,0	6,8	99,72
Adénosine	19,6	0,6	1,2	99,27
Guanosine	13,6	0,2	0,8	100,22
Déoxyguanosine	13,3	0,6	1,1	100,01
Déoxyadénosine	13,5	2,3	4,1	99,01
Déoxyinosine	14,1	1,1	1,4	99,92
Inosine	14,1	1,6	3,7	99,33
Acide orotique	15,7	1,2	1,7	100,21

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

Selon Hartmann et ses collaborateurs, le coefficient de variation (CV) des analyses effectuées dans la même journée à partir de l'urine enrichie avec les différents métabolites oscillait entre 7 et 24 % pour les 24 métabolites analysés. Des CV de 7 à 25 % ont été rapportés pour les tests effectués à des journées différentes. La moyenne des taux de récupération fluctuait de 85 % à 123 %, à l'exception des purines 2-déoxyinosine et 2-déoxyadenosine et de la thymidine dont les valeurs étaient respectivement de 133 %, 128 % et 128 %. De même, les CV calculés sur les taux de récupération allaient de 9 % à 24 % pour tous les métabolites, à l'exception de l'hypoxanthine, la thymine et la thymidine dont les CV respectifs étaient 34 %, 28 % et 33 % [Hartmann *et al.*, 2006].

Limites de détection et de quantification des métabolites par LC-MS/MS

Les limites de détection (intervalle : 0,1 à 10 μM) et de quantification (intervalle : 0,2 à 15 $\mu\text{mol/l}$) de 15 métabolites sont présentées dans le tableau 10. La limite de quantification a été fixée à plus de 5 fois la valeur du témoin, tandis que celle de détection s'élevait à plus de 3 fois cette valeur.

Tableau 10 Limite de quantification (LOQ) et de détection (LOD) des métabolites de purines et pyrimidines

Métabolite	Standard interne*	LOQ (µMOL/L)	LOD (µMOL/L)
Uracile	¹⁵ N ₂ -Uracile	11	7,5
Cytosine	¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₃ -Cytosine	0,5	0,33
Thymine	² H ₄ -Thymine	15	10
Adénine	¹³ C-Adénine	3,3	1,65
Guanine	¹³ C-Adénine	0,5	0,33
Uridine	Rib-1- ¹³ C-Uridine	0,5	0,33
Thymidine	Me- ¹³ C-Thymidine	1,5	1
Adénosine	Rib-1- ¹³ C-Adénosine	0,5	0,25
Guanosine	¹⁵ N ₄ -Guanosine	0,5	0,33
Xanthine	¹³ C- ¹⁵ N ₂ -Xanthine	3,3	2,5
Hypoxanthine	¹³ C- ¹⁵ N ₂ -Xanthine	0,5	0,33
Déoxyguanosine	² H ₂ -Déoxyguanosine	0,5	0,33
Déoxyguanosine	¹³ C ₅ -Déoxyadenosine	0,5	0,33
Inosine	¹⁵ N ₄ -Inosine	2	1
Acide orotique	¹⁵ N ₂ -acide orotique	0,2	0,1

Source : tableau adapté de La Marca *et al.*, 2006a.

*: les contrôles internes sont constitués des isotopes des différents métabolites à détecter.

Hartmann et ses collaborateurs ont utilisé huit standards internes pour quantifier et déterminer les limites de détection de 24 métabolites des purines et des pyrimidines. Les données recueillies étaient toutefois comparables à celles générées par d'autres méthodes [Hartmann *et al.*, 2006].

L'utilisation d'échantillons prélevés chez les patients dont les diagnostics ont été préalablement confirmés a révélé la capacité de l'analyse à déceler différentes erreurs innées du métabolisme des purines et pyrimidines, notamment :

- ✓ La superactivité de la phosphoribosylpyrophosphate synthétase (PRPS),
- ✓ Le syndrome de Lesch-Nyhan,
- ✓ La déficience en adénosine déaminase (ADA),
- ✓ La déficience en adénine phosphoribosyltransférase (APRT),
- ✓ L'acidurie orotique héréditaire,
- ✓ MNGIE,
- ✓ La déficience en ornithine transcarbamylase [Hartmann *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006a].

Les auteurs soulignent l'absence de certains standards internes qui pourraient amener à un changement de protocole. Toutefois, la robustesse, la sensibilité et la spécificité de la technologie LC-MS/MS ont permis de détecter plusieurs métabolites des purines et pyrimidines en une analyse unique de 17 minutes. Les auteurs mentionnent que cette méthode est adéquate à l'utilisation de routine dans les laboratoires cliniques [La Marca *et al.*, 2006a]. De plus, Hartmann et ses collaborateurs concluent en soulignant la rapidité, la spécificité et la fiabilité des détections réalisées avec cette technologie. Ils considèrent le système LC-MS/MS utile pour émettre des diagnostics justes de différents déficits enzymatiques [Hartmann *et al.*, 2006].

Détection des produits de dégradation de pyrimidines à partir d'échantillons d'urine pour la recherche d'erreurs innées du métabolisme

Dans l'étude de Schmidt et ses collaborateurs [2005], précédemment décrite, l'uracile, la thymine ainsi que leurs produits de dégradation présents dans l'urine ont été quantifiés à l'aide d'une plate-forme HPLC-MS/MS en utilisant des isotopes stables comme contrôles internes pour marquer les composés de référence. La variation a été évaluée en détectant, 10 fois dans la même journée, les métabolites de l'urine normale ou de l'urine contenant de la créatinine et enrichie par des composés synthétiques à évaluer (100 $\mu\text{mol/l}$). Par ailleurs, la variation entre les tests a été calculée en mesurant les mêmes échantillons pendant 5 semaines consécutives. Les taux de récupération n'ont toutefois pas été rapportés. Les coefficients de variation sont rapportés dans le tableau 11.

Tableau 11 Coefficients de variation des mesures effectuées avec l'urine normale ou fortifiée

Métabolite	Urine normale CV (%)		Urine fortifiée CV (%)	
	Inter journalière	Intra journalière	Inter journalière	Intra journalière
Thymine	19,1	5,2	4,0	4,3
Uracile	9,1	11,5	2,6	3,1
DHT	13,4	12,4	5,3	3,9
DHU	10,2	8,3	2,6	2,9
β-UIB	25,5	20,9	4,7	1,4
β-UP	6,6	10,3	3,6	3,3
β-ALA	18,5	18,3	2,8	2,6
β-AIB	7,0	2,5	4,3	3,2

Source : tableau adapté de Schmidt *et al.*, 2005.

Abréviations : β-AIB : β-aminoisobutyrate, β-ALA : β-alanine, DHT : Dihydrothymine, DHU : Dihydrouracile, β-UIB : β-uréidobutyrate, β-UP : β-uréidopropionate

Les variations les plus importantes ont été observées dans la détection de la thymine, de β-UIB et de β-ALA.

Les auteurs recommandent l'analyse quantitative des métabolites des pyrimidines comme outil diagnostique chez les enfants atteints de symptômes neurologiques non expliqués, y compris des convulsions épileptiques et un retard psychomoteur [Schmidt *et al.*, 2005].

Utilisation du système HPLC-ESI-MS/MS pour la détection de 17 métabolites à partir d'échantillons d'urine liquide ou asséchée sur du papier-filtre

Ito et ses collaborateurs [2000] ont comparé la détection des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de deux types d'échantillons, notamment l'urine liquide ou l'urine absorbée par un papier filtre. La reproductibilité et le pourcentage de récupération ont été évalués en mesurant 9 échantillons d'urine liquide et 10 sur papier filtre en duplicata, avec ou sans ajout de contrôles internes.

Le pourcentage de récupération évalué à partir d'échantillons d'urine liquide variait de 96 à 107 %, à l'exception de celui de l'hypoxanthine et de la xanthine, qui était respectivement de 64 % et 79 %. Les récupérations effectuées à partir d'échantillons d'urine absorbée sur papier-filtre s'élevaient de 89 à 108 % pour une concentration de 10 µmol/l par métabolite ajouté et de 91 à 101 % pour 100 µmol/l à l'exception de l'hypoxanthine, la xanthine et le 5-hydroxyméthyluracile dont les pourcentages de récupération étaient respectivement de 65 %, 77 % et 80 %. Les coefficients de variation étaient similaires pour chaque métabolite (≤ 12), et ce, pour chaque type d'échantillon [Ito *et al.*, 2000]. Les deux types d'échantillons d'urine de concentration moyenne de

créatinine ont été analysés en duplicata, dont $5,6 \pm 5,5$ mmol/l de créatinine pour l'urine liquide (n = 9) et $6,2 \pm 5,5$ mmol/l pour les échantillons sur papier-filtre (n = 10). L'efficacité d'extraction de différents composés à partir d'échantillon d'urine absorbée était de 88 à 103 %, avec un coefficient de variation de 0,7 à 2,2 %. Les moyennes de pourcentage de récupération et les coefficients de variation des métabolites analysés sont rapportés dans le tableau 12.

Tableau 12 Récupérations moyennes des métabolites ajoutés à des échantillons d'urine liquide ou absorbée sur papier-filtre

Métabolites	Type d'urine	Concentration ajoutée ($\mu\text{mol/l}$)	Récupération récupérée (%)	CV(%)
Uracile	liquide	78,2	99	4,1
	PF	92,0	100	4,8
Thymine	liquide	78,2	100	8,2
	PF	92,0	100	2,3
Adénine	liquide	78,2	102	3,2
	PF	92,0	97	6,9
Hypoxanthine	liquide	77,4	105	13,0
	PF	91,0	103	12,0
5-hydroxyméthyl uracile	liquide	78,2	88	7,8
	PF	92,0	95	3,7
Xanthine	liquide	83,3	98	13,0
	PF	98,0	87	8,7
Acide orotique	liquide	82,5	93	2,9
	PF	97,0	98	6,2
Thymidine	liquide	87,6	92	1,6
	PF	103,0	90	1,6
Uridine	liquide	77,4	98	4,8
	PF	91,0	96	4,3
Pseudouridine	liquide	87,6	92	8,6
	PF	103,0	91	11,0

Source : tableau adapté de Ito *et al.*, 2000.

Abréviations : CV : Coefficient de variation; PF : Urine absorbée sur papier-filtre.

Tableau 12 Reproductibilité et taux de récupération des échantillons d'urine liquide ou absorbée sur papier-filtre (suite)

Métabolites	Type d'urine	Concentration ajoutée (µmol/l)	Concentration récupérée (%)	CV (%)
Désoxyadénosine	liquide	61,2	101	9,2
	PF	72,0	100	7,0
Désoxyinosine	liquide	57,0	98	5,1
	PF	67,0	90	6,0
Désoxyguanosine	liquide	80,8	102	5,6
	PF	95,0	101	12
Adénosine	liquide	102,0	92	1,8
	PF	120,0	95	2,7
Inosine	Liquide	83,3	99	8,1
	PF	80,0	93	7,8
Guanosine	Liquide	84,2	102	13
	PF	99,0	97	6,6
Succinyladénosine	PF	78,5	99	13

Source : tableau adapté de Ito *et al.*, 2000.

Abréviations : CV : Coefficient de variation, PF : Urine absorbée sur papier-filtre.

La linéarité de chaque métabolite était bonne entre 2,5 – 250 µmol/l ($r^2 = 0,984 - 0,999$). Les limites de détection étaient adéquates pour détecter de légères augmentations de concentrations pour différents métabolites (xanthine : 2,5 µmol/l; succinyladénosine : 1,6 µmol/l; uracile, adénine, hypoxanthine, 5-dihydroxyméthyluracile et pseudouridine : 1,0 µmol/l; et 0,5 µmol/l pour les autres métabolites) [Ito *et al.*, 2000].

Les auteurs ont conclu que le système HPLC-ESI MS/MS peut être utilisé pour détecter rapidement les troubles du métabolisme des purines et pyrimidines [Ito *et al.*, 2000].

5.5. Données fournies par le demandeur

Les données de validation de la méthode LC-MS/MS fournies par le demandeur ont été recueillies en analysant des solutions aqueuses dont les concentrations en métabolite sont connues et des échantillons d'urine prélevés chez les patients.

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées par l'analyse en triplicata d'une série de différentes concentrations pour chaque analyte. Les concentrations testées étaient de 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1 000, et 3 000 nmol/l pour toutes les molécules en dehors de l'acide urique et de la créatinine. Compte tenu de leurs concentrations physiologiques plus importantes, les concentrations d'acide urique et de créatinine étaient respectivement 10 et 30 fois plus élevées que celles des autres métabolites. Pour chaque molécule, la limite de détection (LOD) présentée dans le tableau 13 correspond à la plus faible concentration testée et donnant un rapport

signal/bruit supérieur à 3. La limite de quantification (LOQ) correspond à la plus faible concentration testée équivalant à un rapport signal/bruit supérieur à 10.

Tableau 13 Limites de détection et de quantification

Métabolites	Limites de détection (nmol/L) N = 3	Limites de quantification (nmol/L) N = 3
Créatinine	<300	<300
Adénine	25	75
2,8-dihydroxyadénine	100	750
Guanine	25	50
Dihydrouracile	500	3 000
β-uréidopropionate	75	500
5-hydroxyméthyluracile	50	500
Uracile	25	250
Acide urique	5 000	30 000
Hypoxanthine	50	250
AICAR	25	25
Dihydroorotate	500	1 000
Xanthine	25	250
β-uréidoisobutyrate	250	1 000
Uridine	25	100
Oxypurinol	75	500
Dihydrothymine	250	750
Adénosine	10	25
Thymine	100	750
2-désoxyadénosine	25	25
Allopurinol	50	250
Orotidine	10	250
2-désoxyuridine	75	250
Acide orotique	250	750
Guanosine	25	50
Inosine	10	25
2-désoxyguanosine	25	50
2-désoxyinosine	25	75
SAICAR	10	75
Thymidine	100	500
N6-succinyladénosine	250	750

Source : données du demandeur.

Les données de linéarité, répliquabilité, répétabilité, recouvrement (ou récupération) et stabilité sont rapportées dans le tableau 14. À titre de contrôle, des fractions d'urine ont été fortifiées avec différentes concentrations de métabolites standards (20, 100, 500 µmol/L). Ces échantillons fortifiés ont été quantifiés à 6 reprises le même jour pour déterminer la répliquabilité et au cours de 5 journées différentes (en duplicata) pour déterminer la répétabilité. Pour chaque analyse, le CV de l'essai est calculé et exprimé en pourcentage. Chaque CV présenté dans le tableau 14 est la moyenne des CVs obtenus avec les trois niveaux de fortification pour un métabolite donné.

Tableau 14 Évaluation de la linéarité, répliquabilité, répétabilité, récupération et stabilité de la méthode LC-MS/MS

Métabolite	Linéarité (r ²) n = 6	Répliquabilité cv (%) n = 18	Répétabilité cv (%) n = 30	Recouvrement (%)		Stabilité : 3 jours à 23°C (%) n = 2
				Intra-jour n = 18	Inter-jour n = 30	
Créatinine	0,99972	3,4	3,0	97,4	99,1	100,6
Adénine	0,99981	3,8	2,4	98,5	99,0	99,2
2,8-dihydroxyadénine	0,99967	3,6	6,1	93,9	94,5	94,1
Guanine	0,99977	5,1	4,3	101,0	99,2	84,7
Dihydrouracile	0,99986	3,0	2,7	99,7	99,2	103,1
β-uréidopropionate	0,99962	3,6	3,1	102,0	102,7	98,3
5-hydroxyméthyluracile	0,99986	3,1	2,4	100,2	99,2	100,4
Uracile	0,99974	2,8	2,6	98,0	98,6	100,4
Acide urique	0,99988	2,1	1,4	99,7	100,1	100,4
Hypoxanthine	0,99989	2,6	1,1	98,4	99,3	93,8
AICAR	0,99967	2,9	4,3	104,9	103,4	102,6
Dihydroorotate	0,99958	4,4	3,3	92,5	97,1	102,6
Xanthine	0,99960	5,1	5,7	98,7	97,7	98,1
β-uréidoisobutyrate	0,99983	5,7	3,7	99,7	98,8	99,3
Uridine	0,99924	2,6	3,7	96,5	98,0	95,7
Oxypurinol	0,99934	4,5	2,3	96,1	98,0	105,3
Dihydrothymine	0,99920	4,2	5,2	98,2	95,7	99,4

Source : données fournies par le demandeur (procédure opérationnelle normalisée).

Abréviations : CV : coefficient de variation

Tableau 14 Évaluation de la linéarité, répliquabilité, répétabilité, récupération et stabilité de la méthode LC-MS/MS (suite)

Métabolite	Linéarité (r ²) n = 6	Répliquabilité cv (%) n = 18	Répétabilité cv (%) n = 30	Recouvrement (%)		Stabilité : 3 jours à 23°C (%) n = 2
				Intra- jour n = 18	Inter- jour n = 30	
Adénosine	0,99937	4,6	4,7	97,8	96,7	104,4
Thymine	0,99923	3,6	3,5	94,4	97,2	102,6
2 désoxyadénosine	0,99984	3,0	3,1	99,3	98,3	100,6
Allopurinol	0,99968	3,3	3,2	98,4	99,1	101,0
Orotidine	0,99970	2,6	1,5	97,8	98,1	107,3
2 désoxyuridine	0,99986	1,5	1,7	97,9	98,1	99,9
Acide orotique	0,99971	2,2	1,4	98,0	100,2	103,0
Guanosine	0,99994	2,0	1,6	99,6	98,8	98,9
Inosine	0,99990	2,1	2,4	99,5	97,8	100,3
2 désoxyguanosine	0,99993	1,7	1,1	97,8	98,2	97,9
2 désoxyinosine	0,99957	1,8	2,7	98,2	100,6	99,2
SAICAR	0,99961	6,2	8,3	112,9	100,4	81,5
Thymidine	0,99967	1,0	1,2	96,6	96,5	100,8
N6-succinyladénosine	0,99971	1,8	3,7	98,8	99,4	98,6

Source : données du demandeur (procédure opérationnelle normalisée). Abréviations : CV : coefficient de variation

Recouvrement : De même, le pourcentage de recouvrement a été calculé en utilisant des échantillons d'urine fortifiée avec différentes concentrations de métabolites standards (20, 100, 500 µmol/l). Ces échantillons ont été quantifiés 6 fois le même jour et au cours de 5 journées différentes (en duplicata). La moyenne des résultats obtenus pour une urine fortifiée est comparée à la concentration théorique (concentration moyenne dans l'urine non fortifiée + la concentration du standard ajouté à cette urine). Le recouvrement a été exprimé en pourcentage. Chaque valeur de recouvrement présentée dans le tableau 14 est la moyenne des recouvrements obtenus avec les trois niveaux de fortification pour un métabolite donné.

L'analyse d'une série d'échantillons cliniques est accompagnée par un contrôle de SKML⁶, qui comporte des solutions aqueuses à concentration déterminée de métabolites. Les résultats obtenus pour les différents métabolites sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 Comparaison entre les résultats de contrôle de qualité d'un laboratoire externe et de celui du demandeur

Métabolite	Valeurs et statistiques fournies par skml		Résultats du demandeur (n = 155)	
	Concentration calculée (IC 95 %) (µmol/l)	Résultats attendus (µmol/l)	Moyenne ± écart-type (µmol/l)	CV%
Créatinine	3,310 (3,2 à 3,4)	2,9 à 3,7	3,249 ± 0,1	2,5
Adénine	28 (26 à 30)	15 à 41	29,7 ± 1,2	4,1
Dihydrouracile	65,1 (57 à 73)	30 à 101	67,4 ± 2,6	3,8
5-hydroxyméthyluracile	49,7 (46 à 53)	31 à 68	56,1 ± 2,0	3,6
Uracile	71,8 (69 à 74)	54 à 90	73,3 ± 2,7	3,7
Acide urique	279 (271 à 287)	233 à 325	277,2 ± 8,7	3,1
Hypoxanthine	116 (112 à 120)	91 à 141	116,8 ± 3,8	3,2
AICAR	52,5 (48 à 57)	32 à 73	52,9 ± 1,9	3,6
Xanthine	95,9 (91 à 101)	60 à 132	98,2 ± 4,5	4,6
Dihydrothymine	70,5 (64 à 77)	44 à 97	69,8 ± 4,0	5,7
Adénosine	34,8 (34 à 36)	26 à 43	34,9 ± 1,7	4,8
Thymine	39,5 (37 à 42)	23 à 56	41,3 ± 2,0	4,7
Désoxyadénosine	38 (36 à 40)	22 à 54	38,1 ± 1,9	4,9
Orotidine	14 (13 à 15)	6 à 22	13,7 ± 0,7	5,5
2 Désoxyuridine	43,1 (41 à 45)	32 à 54	43,5 ± 1,3	3,1
Acide orotique	80 (76 à 84)	51 à 109	81,6 ± 2,7	3,3
Guanosine	56,4 (54 à 58)	43 à 70	55,5 ± 1,5	2,6
Inosine	50 (48 à 52)	37 à 63	49,9 ± 1,6	3,2
2 Désoxyguanosine	37,9 (36 à 40)	24 à 52	36,7 ± 0,9	2,4
2 Désoxyinosine	38,4 (37 à 40)	28 à 49	39,5 ± 2,0	5,0
Thymidine	22,8 (22 à 24)	15 à 31	21,8 ± 0,5	2,3

Source : données du demandeur.

Abréviations : CV : coefficient de variation

Le laboratoire a participé à un contrôle de qualité externe piloté par « European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism » (ERNDIM). Afin d'évaluer la reproductibilité de la méthode développée, le laboratoire demandeur a analysé à l'aveugle 8 échantillons dont les résultats sont comparés à ceux obtenus par d'autres

⁶ SKML sont des contrôles standardisés utilisés lors de la détection des produits du métabolisme des purines et pyrimidines dans l'urine des patients (<https://www.skml.nl/en/home>; distribués par MCA Laboratory, Pays-Bas).

laboratoires. Les résultats obtenus pour 17 analytes surlignés en vert ont été jugés satisfaisants (Annexe B). Le demandeur a rapporté une erreur de retranscription de résultat pour l'analyte AICAR (Annexe B). En dehors des coefficients de variation qui fluctuent entre les laboratoires, la linéarité, le pourcentage de récupération et la moyenne de précision sont comparables.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant le dosage des purines et des pyrimidines urinaires par LC-MS/MS. Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de 3 ans selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 16. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ L'analyse proposée cible principalement les patients avec suspicion de maladies rénales, neurologiques ou de troubles de développement.
- ✓ L'analyse serait réalisée en remplacement du test permettant de doser les purines et les pyrimidines par HPLC-UV. Ce test figure actuellement au *Répertoire* (code 50605; VP : 63).
- ✓ En 2016-17, le demandeur a effectué 697 analyses des purines et des pyrimidines par HPLC-UV. Environ 95 % de ces analyses sont réalisés pour le Québec. Pour 2017-2018, ce nombre d'analyses était estimé à 650.
- ✓ L'analyse proposée n'a fait l'objet d'aucun envoi hors Québec au cours des dernières années.
- ✓ Ainsi, il est anticipé que 650, 675 et 700 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement.
- ✓ La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 15,77.
- ✓ À la suite de l'introduction de cette analyse au *Répertoire*, aucune modification de la prise en charge des patients n'est anticipée puisqu'il s'agit d'un rehaussement technologique.

Tableau 16 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS.

	An 1	An 2	An 3	Total
Scénario de base : sans l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au Répertoire				
Analyses HPLC-UV	650	675	700	2 025
Coûts	40 950 \$	42 525 \$	44 100 \$	127 575 \$
Nouveau scénario : avec l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au Répertoire				
Analyses LC-MS/MS	650	675	700	2 025
Coûts	10 250 \$	10 645 \$	11 039 \$	31 934 \$
Impact net	-30 700 \$	-31 880 \$	-33 061 \$	-95 641 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus élevée			-99 183 \$
	Pour 3 ans, réduction de coûts la plus faible			-92 099 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant le dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS au *Répertoire* pourrait générer une réduction de coûts d'environ 96 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

L'utilisation du système LC-MS/MS dans un laboratoire clinique devrait tenir compte des enjeux suivants :

- ✓ **La spécificité et la rapidité de l'intervention** : La technologie LC-MS/MS permet d'analyser environ 30 métabolites en 17 minutes [La Marca *et al.*, 2006a].
- ✓ **L'interprétation des données** : Il est important de noter que l'interprétation des données obtenues pourrait requérir une expertise pointue dans le domaine des cascades biochimiques ainsi qu'une ouverture à découvrir de nouveaux métabolites [Jurecka, 2009].
- ✓ **Le prélèvement d'échantillons d'urine chez les nouveau-nés** : Bien que l'urine représente un milieu adéquat pour la détection des métabolites anormalement produits, la miction pourrait présenter un défi chez les nouveau-nés et les enfants. De ce fait, l'utilisation de papier filtre imbibé d'urine et asséché serait une option de prélèvement d'échantillons à envisager [Ito *et al.*, 2000].
- ✓ **Le transport et la conservation des échantillons** : Le transport et la conservation des échantillons d'urine constitueraient des enjeux qui, à long terme, pourraient affecter les coûts associés à ce type d'analyse [Ito *et al.*, 2000].
- ✓ **La corrélation entre les valeurs de référence et l'âge** : Il est également à noter que les valeurs de référence des différents métabolites pourraient varier en fonction de l'âge du patient [Cyr *et al.*, 2002].

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE.

En 2013, le collège américain de génétique et génomique médicale a suggéré une analyse des anomalies du métabolisme des purines et pyrimidines à partir de l'acide urique contenu dans le sérum et l'urine des patients atteints de troubles du spectre de l'autisme. Il émet toutefois des réserves concernant une recommandation de l'analyse comme test de routine [Schaefer et Mendelsohn, 2013].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Dosage des purines et pyrimidines urinaires par LC-MS/MS

La recommandation de l'INESSS

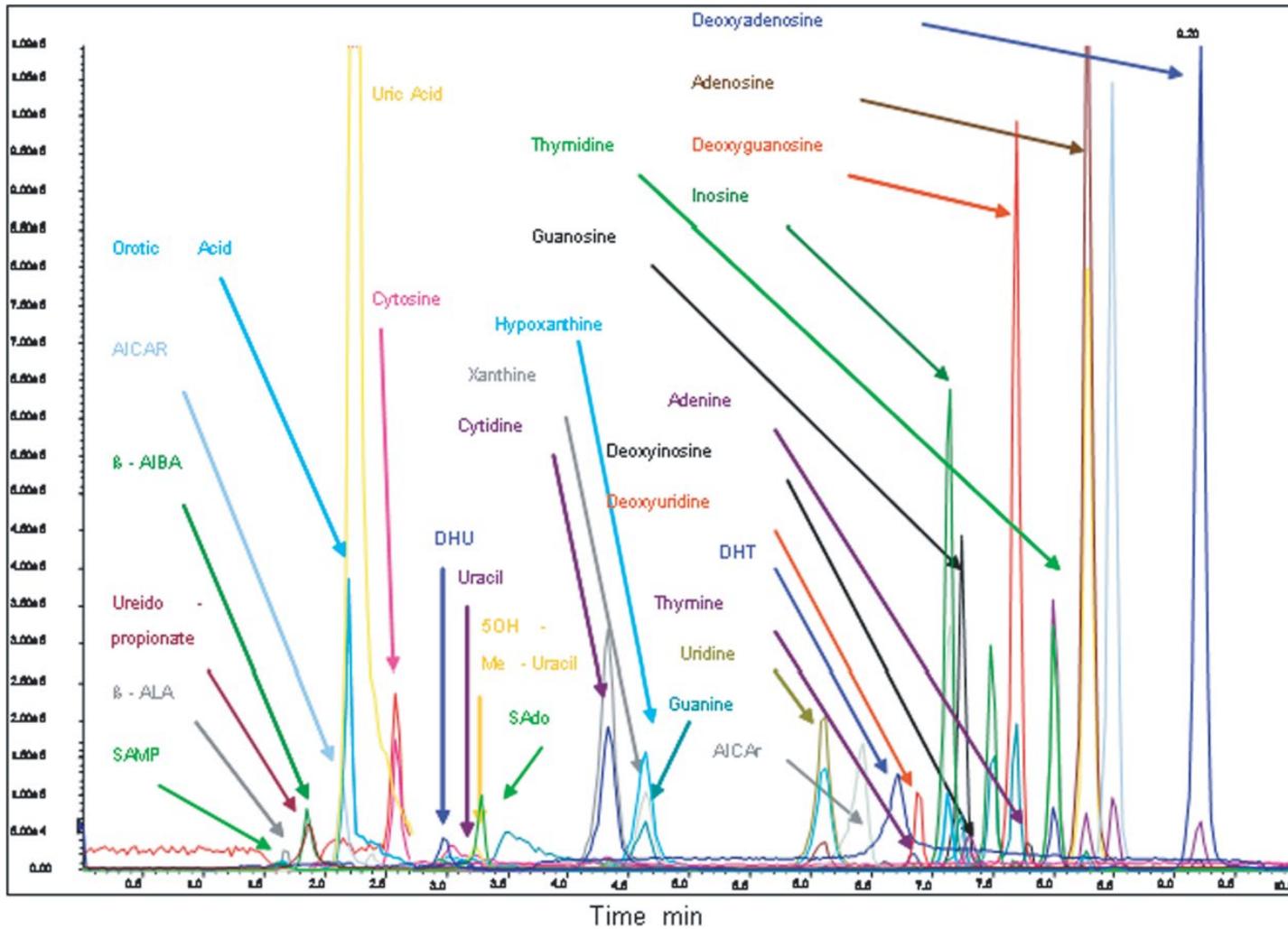
- Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Le CSABM recommande que le laboratoire poursuive prospectivement la collecte de données de validation analytique.

ANNEXE A

Chromatogrammes de différents ions extraits d'un mélange standard



Source : La Marca *et al.*, 2006a.

ANNEXE B

Comparaison de performance entre les laboratoires participants au programme externe de contrôle de la qualité, ERNDIM (www.erndimqa.nl)



ERNDIMQA - ANNUAL REPORT

Purines & Pyrimidines 2017

ERN0467 - C.H.U.S - Genetics

Methodset : Puy/Pyr

Analyte	Accuracy (mean)		Precision (CV% duplicates)		Linearity (r)		Recovery (%added analyte)		Data All Labs	
	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	n	Interlab CV
5-OH methyluracil	21.6	19.3	8.1%	15.8%	0.998	0.984	103%	88%	25	20.6%
Adenine	19.5	18.8	1.0%	13.4%	0.997	0.988	91%	88%	37	28.7%
Adenosine	20.8	21.0	1.8%	9.3%	0.999	0.995	96%	97%	42	13.3%
AICAR	22.9	21.5	32.8%	8.3%	0.914	0.996	82%	97%	28	18.4%
Deoxy-adenosine	21.1	19.6	2.1%	9.4%	1.000	0.992	99%	91%	39	22.9%
Deoxy-guanosine	21.4	22.6	3.0%	11.4%	0.999	0.987	100%	100%	37	19.9%
Deoxy-inosine	21.6	20.9	2.9%	11.6%	1.000	0.988	101%	98%	36	17.9%
Deoxy-uridine	20.9	20.0	7.6%	11.0%	0.998	0.991	96%	94%	34	19.2%
Dihydro-thymine	46.8	46.8	10.9%	9.4%	0.996	0.995	89%	92%	17	19.0%
Dihydro-uracil	45.5	47.8	19.0%	12.7%	0.986	0.986	80%	91%	16	22.1%
Guanosine	21.4	21.0	3.2%	11.5%	0.999	0.993	102%	99%	43	18.9%
Hypoxanthine	65.2	65.2	0.5%	9.4%	0.999	0.994	97%	95%	46	11.7%
Inosine	37.0	35.8	2.5%	7.8%	0.999	0.988	98%	95%	42	14.4%
Orotic Acid	37.4	36.9	4.9%	6.6%	0.998	0.995	98%	96%	42	10.5%
Pseudo-uridine		75.9		9.0%		0.988		96%	24	10.5%
Thymidine	20.2	20.3	2.2%	12.8%	1.000	0.991	95%	95%	42	21.0%
Thymine	40.5	41.0	3.8%	7.0%	0.997	0.997	88%	91%	43	16.6%
Uracil	73.0	69.3	9.3%	10.9%	0.993	0.994	98%	92%	42	15.2%
Xanthine	32.6	28.8	10.5%	15.6%	0.996	0.982	106%	79%	46	33.5%
Overall	32.7	34.3	7.0%	10.7%	0.993	0.991	96%	93%	36	18.7%

RÉFÉRENCES

- Bakker JA et Bierau J. Purine and pyrimidine metabolism: Still more to learn. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2012;37(1):3-6.
- Cyr D, Giguère R, Lemieux B. Des anomalies génétiques sous-diagnostiquées... *Le Clinicien* 2002;17(8):69-77.
- Deville M, Dubois N, Pirard C, Charlier C. Évaluation de l'effet matrice lors de l'analyse de stupéfiants par LC-MS-MS [affiche présentée au 21ème Congrès de la SFTA - 51ème Congrès de la STC. Saint-Malo, France, juin 2013]. Liège, Belgique : Centre Hospitalier Universitaire de Liège; 2013. Disponible à : <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/161667/1/Poster%20SFTA%20-%20Evaluation%20de%20l%27effet%20matrice%20lors%20de%20l%27analyse%20de%20stup%27fiants%20par%20LC-MS-MS.ppt>.
- Duran M, Dorland L, Meuleman EE, Allers P, Berger R. Inherited defects of purine and pyrimidine metabolism: Laboratory methods for diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 1997;20(2):227-36.
- Hartmann S, Okun JG, Schmidt C, Langhans CD, Garbade SF, Burgard P, et al. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52(6):1127-37.
- Ito T, van Kuilenburg AB, Bootsma AH, Haasnoot AJ, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin Chem* 2000;46(4):445-52.
- Jurecka A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(2):247-63.
- La Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J Mass Spectrom* 2006a;41(11):1442-52.
- La Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini E, Pela I, Hirano M, et al. Pre- and post-dialysis quantitative dosage of thymidine in urine and plasma of a MNGIE patient by using HPLC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 2006b;41(5):586-92.
- Mamedov IS, Zolkhina IV, Sukhorukov VS. Investigation of levels of purines and pyrimidines in children's urine. *Adv Tech Biol Med* 2017;5:247.
- Nyhan WL. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab* 2005;86(1-2):25-33.
- Schaefer GB et Mendelsohn NJ. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med* 2013;15(5):399-407.

- Schmidt C, Hofmann U, Kohlmuller D, Murdter T, Zanger UM, Schwab M, Hoffmann GF. Comprehensive analysis of pyrimidine metabolism in 450 children with unspecific neurological symptoms using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2005;28(6):1109-22.
- Simmonds HA. When and how does one search for inborn errors of purine and pyrimidine metabolism? *Pharm World Sci* 1994;16(2):139-48.
- Simmonds HA, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB. When to investigate for purine and pyrimidine disorders. Introduction and review of clinical and laboratory indications. *J Inherit Metab Dis* 1997;20(2):214-26.
- Sun Q. Urine purine metabolite determination by UPLC-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:227-35.
- Van Gennip AH. Defects in metabolism of purines and pyrimidines. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1999;24(3):171-5.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

