



Contribution au développement de méthodes de diagnostic rapide des maladies innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques

Pierre Guibal

► To cite this version:

Pierre Guibal. Contribution au développement de méthodes de diagnostic rapide des maladies innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112402 . tel-01350865

HAL Id: tel-01350865

<https://theses.hal.science/tel-01350865>

Submitted on 2 Aug 2016

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

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



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : LETIAM, Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud EA 4041

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Pierre GUIBAL

Contribution au développement de méthodes de diagnostic
rapide des maladies innées du métabolisme associées à des
troubles neurologiques

Date de soutenance : 16/12/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse : Fathi MOUSSA
Rapporteurs : Didier THIEBAUT
Marie-Claude MENET
Examineurs : Arlette BAILLET-GUFFROY
Thierry BILLETTE de VILLEMEUR
Rémy COUDERC

Professeur (IUT Orsay)
DR CNRS (ESPCI ParisTech)
MCU-PH (Université Paris Descartes)
Pr (Université Paris Sud)
PU PH (APHP)
Dr (APHP)

Remerciements

Je remercie le Docteur Marie-Claude Menet et le Directeur de Recherche Didier Thiébaut d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également le Professeur Arlette Baillet-Guffroy, le Professeur Thierry Billette de Villemeur et le Docteur Rémy Couderc d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie le Professeur Fathi Moussa de m'avoir accueilli au sein du LETIAM et pour son encadrement, son soutien et le partage de ses connaissances et de son savoir faire. Je remercie le Professeur Pierre Chaminade de m'avoir accueilli au sein du Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud.

Je remercie le Docteur Nathalie Lévêque pour sa bienveillance et son encadrement lors des deux premières années de cette thèse.

Je remercie également tous les membres du LETIAM, permanents ou de passages, pour leur aide précieuse tant scientifique que morale.

Je remercie de le Docteur Rémy Couderc, Chef du service de Biochimie de l'hôpital Trousseau de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour la réalisation d'une grande partie du travail expérimental. Je souhaite remercier particulièrement Anne Saintier pour avoir accepté de me prêter ses appareils de chromatographie et pour m'avoir aidé à de nombreuses reprises.

Je remercie également tous les membres du service de Biochimie pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur et l'aide qu'ils m'ont apporté durant cette thèse.

Je remercie Charlotte Desoubries pour son aide précieuse et son soutien quotidien. Je remercie ma famille et mes amis pour leur aide, leur compréhension et le soutien qu'ils m'ont prodigué au cours de ses années.

Et enfin, je remercie tous ceux que j'ai pu oublier ici et qui ont répondu à mes questions et mes doutes, qui ont su me soutenir et qui ont de près ou de loin participé à mon épanouissement lors de ces années.

RESUME

Les erreurs innées du métabolisme (EIM) constituent un large panel de désordres métaboliques héréditaires. Parmi les EIM, les anomalies de la neurotransmission peuvent affecter, entre autres, la synthèse ou le transport des neurotransmetteurs, notamment les amines biogènes (dopamine et sérotonine) et les folates. La reconnaissance de ces affections est d'une importance capitale pour le diagnostic et le traitement éventuel. L'analyse chimique du liquide céphalo-rachidien (LCR) est incontournable pour le diagnostic de ces pathologies. Or, les méthodes actuelles de dosage ne sont pas simples. Longues et fastidieuses, elles ont été, pendant longtemps, réservées aux laboratoires spécialisés.

L'objectif de ce travail était de développer des méthodes simples et rapides de diagnostic des troubles de la neurotransmission et d'établir les valeurs normales fréquentes dans la population française.

Le travail réalisé a permis, dans un premier temps, de développer une méthode de dosage directe, en une seule étape, de la tetrahydrobioptérine (BH4), cofacteur des hydroxylases intervenant dans la synthèse des amines biogènes, et des ptérines impliquées dans le cycle de synthèse et de dégradation de ce cofacteur, dans le LCR. Auparavant, le dosage de ces substances nécessitait au moins deux analyses chromatographiques précédées chacune d'une étape propre de préparation de l'échantillon.

Par la suite, nous avons développé une méthode de diagnostic rapide, en moins de 10 minutes, par UHPLC (chromatographie liquide à ultra haute performance), couplée à une détection séquentielle par coulométrie et par fluorescence, des troubles dopaminergique et sérotoninergique. Cette méthode permet de doser simultanément, en une seule étape, tous les métabolites de la dopamine, de la sérotonine et de la noradrénaline, ainsi que les ptérines d'intérêt diagnostic, principalement la dihydroneoptérine (NH₂) et la dihydrobioptérine (BH₂). L'ensemble de ces explorations nécessitait, auparavant, la mise en œuvre d'au moins trois méthodes de dosage par HPLC (chromatographie liquide à haute performance), précédées chacune d'une étape propre de préparation de l'échantillon.

Pour compléter l'exploration du métabolisme de la BH₄ et du suivi thérapeutique des troubles de la neurotransmission, nous avons également proposé une méthode de dosage rapide, en une seule étape, par UHPLC, de tous les métabolites et de toutes les ptérines, incluant la BH₄. Enfin, une méthode rapide de dosage (moins de 2 minutes), par UHPLC, du 5-méthyltetrahydrofolate dans le LCR a été développée, afin de compléter le diagnostic biologique de l'ensemble des troubles neurologiques visés.

L'application des outils ainsi développés à plus de 1400 patients nous a permis d'établir des valeurs normales fréquentes dans la population française ainsi que de poser le diagnostic de quelques déficits enzymatiques.

MOTS CLES

Dopamine, sérotonine, tetrahydrobioptérine, 5-méthyltetrahydrofolate, liquide céphalo-rachidien, troubles neurologiques, chromatographie, valeurs normales fréquentes

SUMMARY

Inborn errors of metabolism (IEM) consist of a wide range of hereditary metabolic disorders. Among IEM, neurotransmission anomaly can affect the synthesis or the transport of neurotransmitters, notably biogenic amines (dopamine and serotonin) and folates. Early diagnosis of such affections is of utmost importance especially as some of them can be treated effectively. Chemical analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is essential for the diagnosis of neurotransmitter disorders; however, current quantitative methods are tedious and time consuming. For a long time the chemical diagnosis of neurotransmitter disorders has been available only in specialized laboratories.

The purpose of this work was to develop simple and fast diagnosis methods of neurotransmitter disorders as well as to establish the reference values in French population.

For this purpose, in a first step, we developed a single step direct method of simultaneous quantification of tetrahydrobiopterin (BH4), which is the main cofactor of the hydroxylases involved in biogenic amines syntheses, and the relevant reduced and oxidized forms of pterins involved in the cycle of synthesis – regeneration of BH4. Formerly, the quantification of those compounds required at least two chromatographic methods with two specific sample preparation procedures.

Thereafter we developed a method of fast diagnosis in less than 10 minutes of dopaminergic and serotonergic disorders using UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) hyphenated to a sequential coulometric and fluorimetric detection. With only a simple filtration step as sample preparation procedure, this method enables the simultaneous quantification of all dopamine, serotonin and noradrenaline metabolites as well as dihydroneopterin (NH2) and dihydrobiopterin (BH2), the relevant pterin forms for the complete diagnosis. Formerly, at least three HPLC (high performance liquid chromatography) quantification methods preceded by three tedious specific sample preparation procedures were required for such a diagnosis.

To complete the investigation of BH4 metabolism and the follow up of neurotransmission disorders, we also developed a fast UHPLC method of simultaneous quantification of all the cited metabolites and pterins including BH4.

In order to complete the rapid diagnosis of all targeted neurological disorders, we finally developed an UHPLC method of 5-methyltetrahydrofolate quantification in CSF.

The application of these analytical tools in more than 1400 CSF samples, collected from patients followed in some Neurology centers located in several French areas covering nearly the entirety of the territory, allowed us to establish the reference values in French population as well as to diagnose several cases of enzymatic deficits.

KEY WORDS

Dopamine, serotonin, tetrahydrobiopterin, 5-methyltetrahydrofolate, cerebrospinal fluid, neurological disorders, chromatography, references values

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE 1: RAPPEL DE QUELQUES NOTIONS CONCERNANT LES NEUROTRANSMETTEURS	7
1. Introduction	8
2. Métabolisme des voies dopaminergiques et sérotoninergiques	9
2.1. Dopamine et sérotonine, synthèse et métabolites	9
2.2. Cycle métabolique de la BH4	12
2.3. Métabolisme des folates et relation avec la BH4	14
3. Symptômes et diagnostic	16
3.1. Altération du métabolisme des ptérines	17
3.1.1. Déficit en GTP-CH	17
3.1.2. Déficit en PTPS	18
3.1.3. Déficit en SR	18
3.1.4. Déficit en PCD	19
3.1.5. Déficit en DHPR	19
3.2. Troubles de la synthèse en dopamine et sérotonine	19
3.2.1. Déficit en TH	20
3.2.2. Déficit en AADC	20
3.2.3. Déficit en PNPO	20
3.3. Troubles des transporteurs de la dopamine (DTDS)	21
3.4. Déficit cérébral en folates	22
3.4.1. Déficit en récepteur au folate, FR α	22
3.4.2. Déficit en MTHFR	23
3.4.3. Déficit en DHFR	23
3.4.4. Déficit secondaire associé à des déficits en DHPR et AADC	23
3.5. Diagnostic différentiel	24
4. Méthodes de dosage actuelles des amines biogènes, ptérines et folates	26
4.1. Ptérines	26
4.1.1. Propriétés physicochimiques	26
4.1.2. Méthodes actuelles de dosage des ptérines dans les matrices biologiques	29
4.1.2.1. Méthodes de dosage indirect	29
4.1.2.2. Méthodes de dosage direct	30
4.1.2.2.1. Oxydation en ligne avant détection par fluorescence	30
4.1.2.2.2. Détection électrochimique	33
4.1.2.2.3. Détection par spectrométrie de masse	35
4.1.2.2.4. Dosage de la néoptérine par ELISA	36
4.2. Amines biogènes	37
4.2.1. Propriétés physico chimiques des amines biogènes	37
4.2.2. Méthodes actuelles de dosage des amines biogènes et de leurs métabolites	37
4.2.2.1. Dosage par LC-ECD	38
4.2.2.2. Dosage par LC-MS	39
4.2.2.3. Dosage par LC couplée à la détection par chimiluminescence	41
4.2.2.4. Dosage par GC-MS	42
4.2.2.5. Dosage par techniques ELISA	42
4.3. Folates	43
4.3.1. Propriété physico chimiques des folates	44
4.3.2. Méthodes de dosages des folates	45
4.3.2.1. Dosage par LC-UV	45
4.3.2.2. Dosage par LC-ECD	46
4.3.2.3. Dosage par fluorescence	46
4.3.2.4. Dosage par spectrométrie de masse	47
5. Valeurs de référence dans le LCR	49
5.1. Valeurs de référence des amines biogènes et ptérines dans le LCR	50
5.2. Valeurs de référence du 5MTHF dans le LCR	53

6. Conclusion et objectifs	54
<i>CHAPITRE 2 : DETERMINATION SIMULTANEE DE L'ENSEMBLE DES FORMES DE BIOPTERINES ET NEOPTERINES DANS LE LCR</i>	56
INTRODUCTION	58
RESULTS AND DISCUSSION	60
CONCLUSIONS	64
MATERIALS AND METHODS	65
REFERENCES	66
SUPPLEMENTARY MATERIAL	67
Hypothèse concernant le mécanisme d'électro-oxydation de la BH4	72
<i>CHAPITRE 3 : DIAGNOSTIC RAPIDE DES TROUBLES DOPAMINERGIQUES ET SEROTONINERGIQUES</i>	73
INTRODUCTION	74
METHODS	75
RESULTS	77
DISCUSSION	80
CONCLUSION	82
REFERENCES	83
FIGURES	86
SUPPLEMENTARY MATERIAL	94
<i>CHAPITRE 4 : DOSAGE SIMULTANE DES METABOLITES DE LA DOPAMINE, DE LA SEROTONINE ET DES PTERINES</i>	97
INTRODUCTION	99
MATÉRIEL ET MÉTHODES	100
RESULTATS ET DISCUSSION	101
REFERENCES	106
<i>CHAPITRE 5 : DOSAGE ULTRA RAPIDE DU 5MTHF DANS LE LCR</i>	107
INTRODUCTION	109
METHODS	110
RESULTS AND DISCUSSION	111
CONCLUSION	112
REFERENCES	112
FIGURES	114
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	119
<i>REFERENCES</i>	122
<i>LISTE DES ABBREVIATIONS</i>	133

INTRODUCTION GENERALE

Les erreurs innées du métabolisme (EIM) représentent un large panel de désordres biochimiques héréditaires affectant approximativement un nouveau-né sur 500 dans le monde. Elles sont principalement dues à un défaut de synthèse ou à une altération de la fonctionnalité d'une protéine, qui peut être une enzyme, un récepteur, un transporteur ou un élément structurel de membrane. L'altération de la capacité fonctionnelle de la protéine est essentiellement provoquée par une modification de sa structure primaire liée à la mutation d'un gène. De telles mutations peuvent entraîner des troubles neurologiques d'intensité variable selon les cas, de très légers à létaux.

Dans la plupart des cas, les enfants atteints d'EIM présentent des associations variables de signes cliniques, biologiques et radiologiques. Quelquefois, ces signes suggèrent un diagnostic spécifique qui peut être confirmé par des examens métaboliques de routine ou par des études plus spécialisées, en particulier des investigations génétiques moléculaires. Dans certains cas, le développement et le pronostic des enfants affectés peuvent dépendre d'un diagnostic précis et rapide suivi d'une intervention thérapeutique spécifique. Cela a été amplement démontré dans quelques cas d'acidémies, d'aminocidopathies, de troubles de stockage du glycogène, etc. C'est aussi le cas pour les anomalies de la neurotransmission.

Les anomalies de la neurotransmission peuvent affecter la synthèse des neurotransmetteurs, mais également leur libération, leur fixation sur les récepteurs post-synaptiques, leur recapture ou leur catabolisme. La reconnaissance de ces affections rares est importante pour le diagnostic, le traitement et le conseil génétique. En outre, un certain nombre de ces maladies est accessible à un traitement.

Les neurotransmetteurs sont des substances qui permettent la transmission d'un signal électrique entre deux neurones adjacents par l'intermédiaire d'un processus biochimique. Ils sont synthétisés pour la plupart dans la terminaison nerveuse, mais aussi dans le corps cellulaire du neurone, puis stockés dans des vésicules pour être libérés en cas de nécessité par exocytose au niveau de la fente synaptique. Ils se fixent alors à des récepteurs post-synaptiques entraînant la transmission d'un signal électrique.

Les anomalies du métabolisme des neurotransmetteurs comprennent les pathologies liées aux amines biogènes (dopamine, sérotonine, noradrénaline), au métabolisme des ptérines, des

folates et de quelques acides aminés dont la glycine, l'aspartate, le glutamate et l'acide gamma amino-butyrique (GABA).

Du point de vue biochimique, il est possible d'explorer un grand nombre de conditions métaboliques pendant les premiers jours de la vie et immédiatement après des manifestations cliniques. Au niveau du système nerveux central (SNC), la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface entre le sang et l'espace extracellulaire cérébral, localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Elle joue le rôle de barrière entre le SNC et la circulation générale. Les particularités anatomiques et physiologiques de ce compartiment fluide (BHE - sang - liquide céphalorachidien) sont à l'origine de sa relative indépendance du compartiment sanguin. Les échanges entre les deux fluides se font essentiellement par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques. Les substances issues du métabolisme cérébral ainsi que certains co-facteurs enzymatiques sont éliminés dans le liquide céphalorachidien (LCR). Dès lors, l'analyse chimique du LCR est indispensable au diagnostic biologique, à l'étude des mécanismes physiopathologiques ainsi qu'au suivi thérapeutique de certaines pathologies affectant le SNC. En particulier, l'analyse chimique du LCR est incontournable pour le diagnostic des anomalies centrales de la neurotransmission. Le recours à un prélèvement tissulaire cérébral à des fins diagnostiques reste exceptionnel.

Cependant, les méthodes actuelles de dosage, dans le LCR, des métabolites des amines biogènes et des cofacteurs intervenant dans leur synthèse ne sont pas simples. Elles nécessitent souvent plusieurs étapes chromatographiques précédées, pour chacune d'entre elles, d'un traitement spécifique de l'échantillon. Aussi, ce type de dosage est resté pendant très longtemps réservé à quelques laboratoires spécialisés. C'est ainsi que, jusqu'en 2007, les demandes de ce type de dosage émanant de Services de Neuro-pédiatrie français étaient adressées à des laboratoires étrangers.

Le principal objectif de cette thèse a été de développer des méthodes simples et rapides de diagnostic des troubles de la neurotransmission et d'établir les valeurs normales fréquentes dans la population française. En effet, lorsque nous avons débuté nos travaux, les seules valeurs normales connues en Europe ont été celles établies par d'autres laboratoires, en Suisse et en Espagne.

La première partie de ce mémoire sera consacrée au rappel de quelques notions concernant les neurotransmetteurs, notamment leurs rôles physiologiques et leurs pathologies, ainsi qu'à l'analyse critique des méthodes actuelles utilisées pour leur exploration. Dans la deuxième partie, nous exposerons les développements analytiques que nous avons réalisés au cours de ce travail et les méthodes de diagnostic rapide qui en découlent. La troisième et dernière partie sera dédiée à la conclusion et aux perspectives de ce travail.

**CHAPITRE 1 : RAPPEL DE QUELQUES NOTIONS CONCERNANT LES
NEUROTRANSMETTEURS**

1. Introduction

Un neurotransmetteur est un médiateur chimique que libèrent les corpuscules nerveux terminaux d'un neurone dans une synapse. Il traverse la fente synaptique par diffusion pour se lier à un neurone post-synaptique. Un neurotransmetteur est donc le relais chimique de l'influx nerveux au niveau de l'espace libre entre deux neurones que constitue la fente synaptique.

Après action, les neurotransmetteurs peuvent être dégradés directement dans la fente synaptique ou subir un phénomène de recapture par le neurone présynaptique. Au niveau du neurone postsynaptique, les neurotransmetteurs peuvent avoir deux effets opposés. Ils sont dits excitateurs lorsqu'ils favorisent la propagation de l'influx nerveux dans le neurone post-synaptique. Ils sont dits inhibiteurs lorsqu'ils diminuent la probabilité de propagation de l'influx nerveux par le neurone postsynaptique.

Un grand nombre de molécules déjà identifiées répondent aux critères requis pour être qualifié de neurotransmetteurs (Purves, D. 2004). Parmi ceux-ci, les principaux neurotransmetteurs que nous étudierons sont les amines biogènes : la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline.

La dopamine est l'un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central et périphérique. Il s'agit d'un neurotransmetteur inhibiteur. Il existe trois voies principales qui véhiculent la dopamine au sein du SNC : la voie tubéro-infundibulaire, la voie mésocorticolimbique et la voie nigro-striée. La voie nigro-striée est particulièrement importante puisque c'est elle qui contrôle la motricité automatique. C'est la dégénérescence de cette voie qui est responsable de la maladie de Parkinson (Purves, D. 2004). La dopamine a également un rôle dans les phénomènes liés à l'addiction (Purves, D. 2004).

La sérotonine est aussi l'un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central et périphérique. Les rôles physiologiques de la sérotonine sont très nombreux tant au niveau périphérique qu'au niveau du SNC (Purves, D. 2004). Au niveau du SNC, la sérotonine intervient dans la régulation du sommeil, de la température corporelle et de l'humeur. La sérotonine a également un effet sur l'appareil cardio-vasculaire, pouvant provoquer une constriction des vaisseaux ou une augmentation de la fréquence et de la force de contraction

cardiaque. Enfin, la sérotonine a un effet favorisant l'agrégation plaquettaire. On observe aussi un effet de la sérotonine sur les contractions des muscles lisses extra-vasculaires.

La noradrénaline est non seulement un neurotransmetteur du SNC mais également une hormone adrénérge. Au niveau du SNC, le locus coeruleus est la voie principale impliquée dans les effets centraux. La noradrénaline intervient principalement dans la régulation du cycle veille sommeil. Elle a également un rôle dans la mémorisation et l'apprentissage. Au niveau périphérique, elle intervient dans la constriction des muscles lisses des vaisseaux, dans la stimulation des fonctions cardiaques et dans la reconversion des stocks énergétiques en glucose et en acides gras libres (Purves, D. 2004).

Si les folates ne sont pas des neurotransmetteurs, leur rôle dans le SNC est crucial. Le 5-méthyl-tetrahydrofolate (5MTHF), forme active des folates, est une forme de transport des unités mono-carbonées qui interviennent dans de nombreux processus métaboliques comme la synthèse ou la méthylation de l'ADN. Des déficits d'apport alimentaire en folate au cours de la grossesse sont notamment associés à des défauts du tube neural tel que la *spina bifida* (Reynolds, E. 2006).

2. Métabolisme des voies dopaminergiques et sérotoninergiques

2.1. Dopamine et sérotonine, synthèse et métabolites

La synthèse de la dopamine se fait à partir de la phénylalanine, acide aminé essentiel, ou de la tyrosine produite par hydroxylation de la phénylalanine (Longo, N. 2009) (Figure 1). La première étape de cette synthèse est une hydroxylation de la tyrosine avec la tetrahydrobioptérine (BH4) comme cofacteur pour donner la L-DOPA (Longo, N. 2009 ; Nagatsu, T. 1964). Enfin la dernière étape de la synthèse de la dopamine est une décarboxylation de la L-DOPA par la dopa décarboxylase ou une amino-acide décarboxylase (AADC) ayant pour cofacteur le pyridoxal phosphate, forme active de la vitamine B6 (Wassenberg, T. 2010). La dopamine est également un précurseur dans la synthèse de la noradrénaline puis de l'adrénaline (Wassenberg, T. 2010). Un des produits majeurs de la dégradation de la dopamine est l'acide homovanillique ou HVA (Marin-Valencia, I. 2008). Ce dernier est produit par l'action de la monoamine oxydase (MAO) et de la cathécol-O-méthyl transférase (COMT) (Niazi Shahbi, H. 2003 ; Marin Valencia, I. 2008). Par ailleurs la

dégradation de la noradrénaline donne, comme principal métabolite, le methyl-hydroxy-phényl-glycol (MHPG) (Goldstein, D.S. 2003 ; Bicker, J. 2013). Lorsque la L-DOPA est présente en grande quantité, elle peut être dégradée par la COMT en 3-ortho-méthyl-dopa (3 OMD) (Niazi Shahabi, H. 2003). Les principaux métabolites permettant de déterminer les désordres métaboliques liés à la voie dopaminergique sont donc la 3 OMD, le HVA et le MHPG (Goldstein, D.S. 2003).

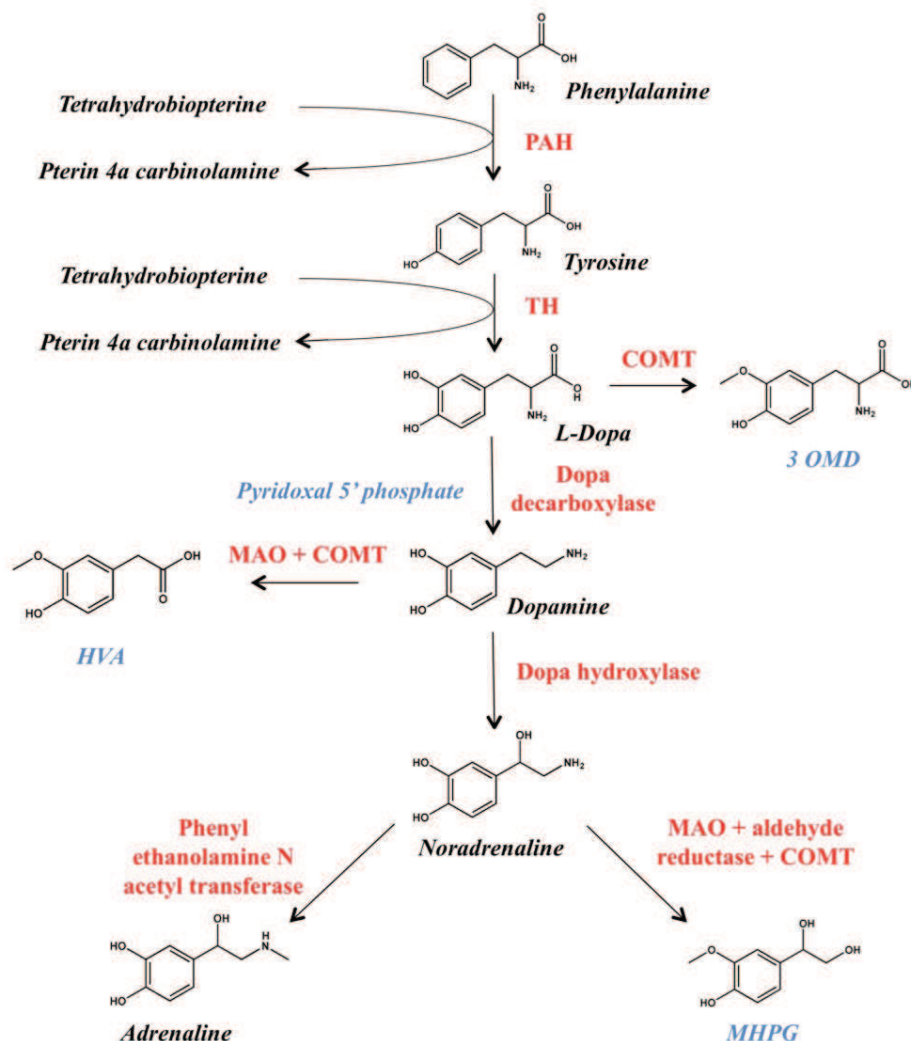


Figure 1. Métabolisme de la dopamine.

Les enzymes sont en rouge. Les composés d'intérêt diagnostique accessibles à l'analyse sont en bleu.

La synthèse de la sérotonine (Figure 2), comme celle de la dopamine, se fait à partir de l'hydroxylation d'un acide aminé, le tryptophane. Cette hydroxylation est également

dépendante de la BH4 (Longo, N. 2009 ; Nagatsu, T. 1964). Le 5-hydroxy-tryptophane (5 OHT) est ensuite décarboxylé pour donner la sérotonine. Cette étape, comme dans le cas de la dopamine, requiert la présence de pyridoxal phosphate ainsi que d'une AADC (Kema, I.P. 2000 ; Bortolato, M. 2013). Le produit majeur de la dégradation de la sérotonine, l'acide 5-hydroxy indole acétique (5 HIAA) est obtenu par action de la MAO et d'une aldéhyde déshydrogénase (Kema, I.P. 2000). D'autres voies de synthèse permettent d'obtenir, à partir de la sérotonine, la mélatonine hormone nécessaire pour le sommeil (Cardinal, D.P. 1998). Les composés permettant de suivre le fonctionnement de cette voie enzymatique sont donc le 5 OHT et le 5 HIAA (Kema, I.P. 2000).

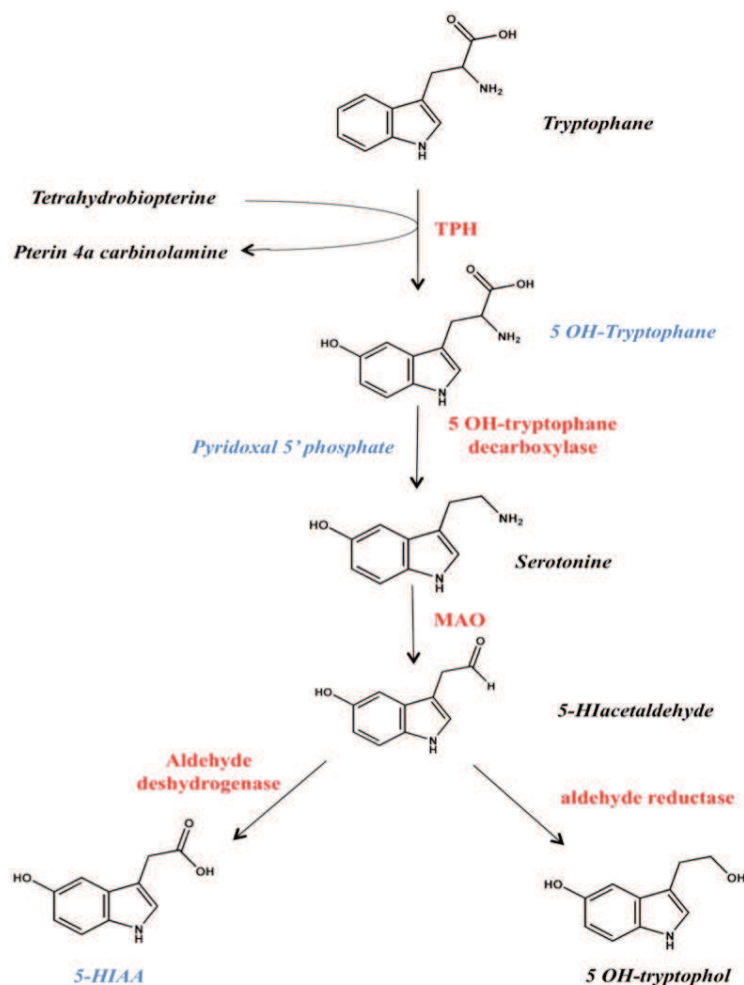


Figure 2: Métabolisme de la sérotonine

Les enzymes sont en rouge. Les composés d'intérêt diagnostique accessibles à l'analyse sont en bleu.

2.2. Cycle métabolique de la BH4

Comme on peut l'observer sur les figures 1 et 2, les hydroxylases jouent un rôle prépondérant dans la synthèse de la dopamine et de la sérotonine. Ces hydroxylases ont pour cofacteur la tétrahydrobioptérine (BH4) (Hyland, K. 2007). Or la synthèse de la BH4 se fait en plusieurs étapes enzymatiques à partir de la guanosine triphosphate, ou GTP (Longo, N. 2009).

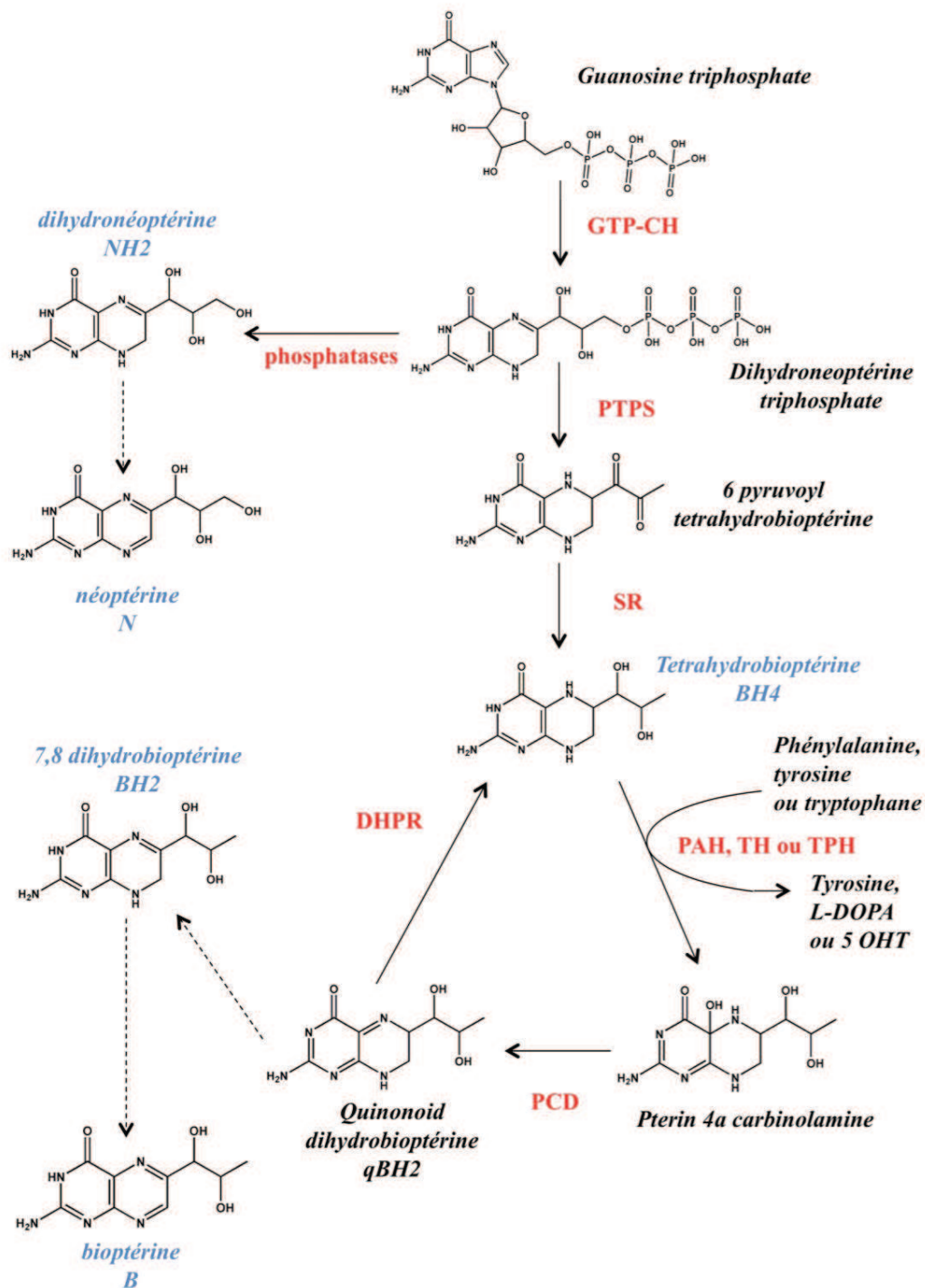


Figure 3: Métabolisme de la BH4 dans le système nerveux.
Les enzymes sont en rouge. Les composés d'intérêt diagnostique accessibles à l'analyse sont en bleu.

L'action de la GTP-cyclohydrolase (GTP-CH) sur la GTP permet d'obtenir la dihydronéoptérine triphosphate (NH₂-triP) (Figure 3) (Kapatos, G. 2013 ; Werner, E.R. 1996). Cette dernière se dégrade sous l'action des phosphatases en dihydronéoptérine (NH₂) qui peut donner naissance à la néoptérine (N), par oxydation spontanée (Heintel, D. 1985). Par ailleurs la NH₂-triP est transformée en 6 pyruvoyl BH₄ par action de la PTPS (pyruvoyl tetrahydropterin synthase) (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011). Pour terminer la synthèse de la BH₄, la dernière étape est la réduction du 6 pyruvoyl BH₄ par la sepiaptérine-reductase (SR) (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011).

Au cours d'une réaction d'hydroxylation, la BH₄ se transforme en pterin-4-alpha carbinolamine (P4C) (Figure. 3). Il existe un mécanisme de régénération de la BH₄ à partir de la P4C (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011). La PCD (pterin carbinolamine dehydratase) transforme la P4C en quinonoid dihydrobioptérine (qBH₂) (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011) qui sera à son tour réduite en BH₄ par action de la DHPR (dihydro-pteridine-reductase) (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011). La qBH₂ peut également subir un réarrangement pour donner la 7,8 BH₂ qui ne pourra pas être réduite en BH₄ par la DHPR (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011). En revanche, la 7,8 BH₂ peut s'oxyder en bioptérine (B).

Ainsi, les origines d'un déficit en BH₄ proviennent soit d'un défaut de synthèse (GTP-CH, PTPS ou SR) soit d'un défaut de régénération (PCD ou DHPR). Or un déficit en BH₄ entraîne un déficit en dopamine et en sérotonine ainsi qu'une hyperphénylalaninémie modérée (Longo, N. 2009 ; Werner, E.R. 2011).

2.3. Métabolisme des folates et relation avec la BH₄

Le folate est une vitamine hydrosoluble appartenant au groupe des vitamines B. En tant que cofacteur ou coenzyme il est impliqué dans de nombreux processus métaboliques (réparation du génome, régulation de l'expression de gènes, synthèses de neurotransmetteurs ...).

Il existe plusieurs formes de folates inter-convertibles, mais la forme prédominante dans le sang et le LCR est le 5 méthyl-tetrahydro-folate (5 MTHF) (figure 4).

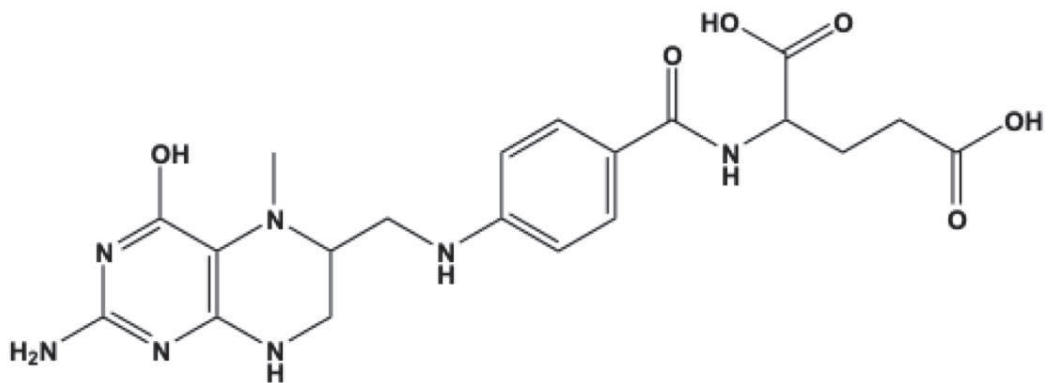


Figure 4: Structure du 5 méthyl-tetrahydro-folate (5MTHF)

C'est en effet le 5 MTHF qui est transporté du sang vers le LCR à travers la BHE, au niveau du plexus choroïde. Il s'agit d'un transport actif et on trouve, en effet, une concentration au moins 1,5 fois plus grande dans le LCR que dans le sang (Hyland, K. 2010).

La figure 5 montre les voies métaboliques d'inter-conversion du folate dans le cerveau à partir du 5 MTHF pour obtenir d'autres formes physiologiquement actives de folates (Ramaekers, V. 2004).

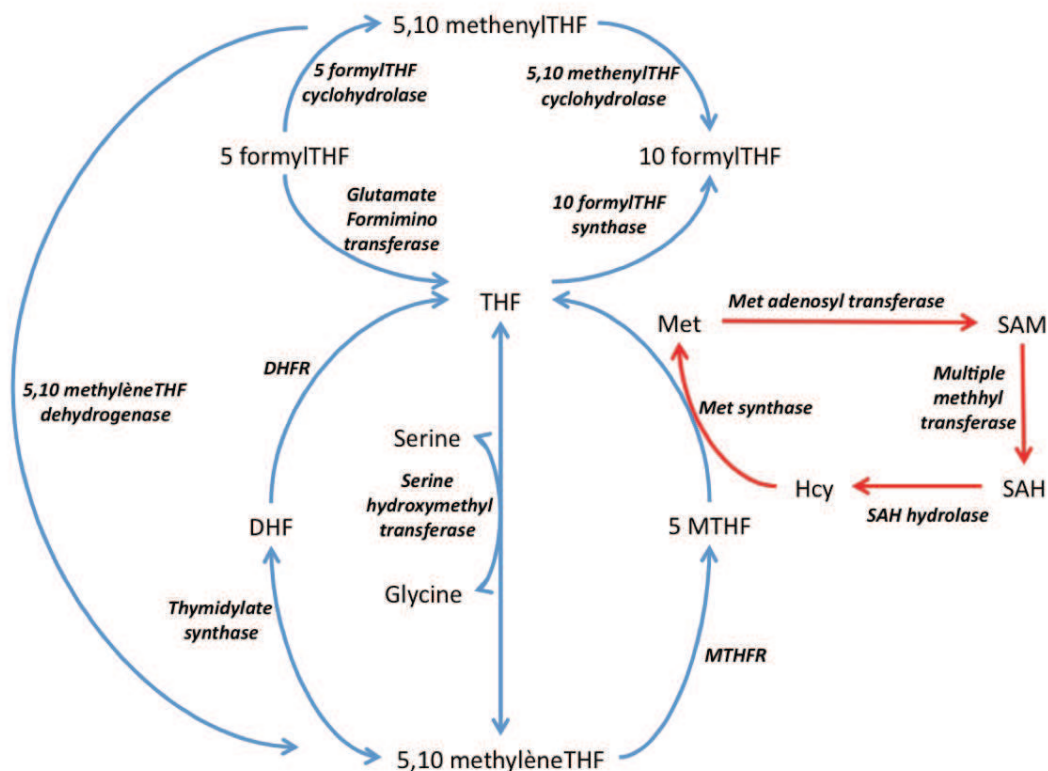


Figure 5: Voie d'inter-conversion des folates.

DHF : dihydrofolate, THF : tetrahydrofolate, 5 MTHF : 5 methyl tetrahydrofolate, Met : méthionine, SAM : S adenosylmethionine, SAH :S adenosylhomocysteine, Hcy : homocysteine (Ramaekers, V. 2004)

Il existe un lien entre le métabolisme des folates et le cycle de régénération de la BH4. En effet la qBH2 est normalement réduite en BH4 par la DHPR, mais en cas de déficit en DHPR la qBH2 se réarrange en 7,8 BH2 qui peut être réduite en BH4 par la DHFR (dihydrofolate reductase) (Hyland, K. 2010).

3. Symptômes et diagnostic

Comme on vient de le voir, au niveau du SNC, de nombreuses enzymes sont impliquées dans la synthèse de la dopamine, de la sérotonine et de la noradrénaline (Hyland, K. 2007 ; Kurian, M. 2011 ; Marin-Valencia, I. 2008). De plus, les carences en cofacteurs enzymatiques tels que la BH4 ou la vitamine B6 entraînent également des déficits en ces neurotransmetteurs (Hyland, K. 2007 ; Marin-Valencia, I. 2008). De nombreux cas de patients présentant des déficits enzymatiques ont déjà été recensés et publiés (Hyland, K. 2007 ; Kurian, M. 2011 ;

Marin-Valencia, I. 2008). Les diagnostics sont établis sur la base des symptômes ainsi que des profils métaboliques obtenus concernant les concentrations en métabolites de la dopamine et de la sérotonine dans le LCR, principalement le HVA et le 5 HIAA (Hyland, K. 2007 ; Kurian, M. 2011 ; Marin-Valencia, I. 2008). L'apport de la génétique permet dans certains cas de confirmer le diagnostic (Sato, H. 2013). Il existe également de nombreux cas de déficits en folate dus à des déficits enzymatiques (DHFR, MTHFR) (Serrano, M. 2012) et pouvant être liés également au métabolisme primaire des ptéridines ou des amines biogènes.

3.1. Altération du métabolisme des ptéridines

La BH4 est le cofacteur enzymatique commun de la première étape limitante de la synthèse de la dopamine et de la sérotonine. Un déficit en BH4 est donc susceptible d'entraîner une diminution de la synthèse en dopamine et sérotonine ainsi qu'une hyperphénylalaninémie (Murata, S. 2007 ; Werner, E.R. 2011).

3.1.1. Déficit en GTP-CH

La première étape de la synthèse de la BH4 implique la GTP-CH (Werner, E.R. 2011). Les troubles causés par une déficience de cette enzyme sont différents suivant que l'atteinte soit due à une mutation autosomique dominante ou récessive (Werner, E.R. 2011).

Dans le cas d'une atteinte autosomique dominante de la GTP-CH, il s'agit du syndrome de Segawa, rapporté pour la première fois par cet auteur, en 1971 (Segawa, M. 1971). Ce syndrome est caractérisé par une dystonie dopa-sensible, c'est à dire une dystonie dont les troubles régressent après traitement par DOPA, marquée par des fluctuations diurnes. Des symptômes autres que la dystonie comme les crises oculogyres peuvent s'ajouter à un tableau caractéristique dominé par les faits suivants : apparition des symptômes durant l'enfance (rarement à un âge plus avancé), prédominance chez les femmes, détérioration du langage (Talvik, I. 2010). Le plus souvent l'IRM ne révèle pas d'anomalie du système nerveux (Wang, P.J. 1994). La maladie de Segawa représente près de 70% des dystonies de type dopa-sensibles installées dans l'enfance (Talvik, I. 2010).

Au niveau biochimique, ce syndrome est caractérisé par une baisse de la BH4 et de la N accompagnée par celle de l'HVA et du 5 HIAA dans le LCR (Hyland, K. 2007 ; Murata, S. 2007 ; Werner, E.R. 2011).

Plusieurs cas d'atteintes autosomiques récessives de la GTP-CH ont été présentés ces dernières années (Sato, H. 2013 ; Horvath, G.A. 2008 ; Longo, N. 2009). Dans ces cas, les symptômes peuvent être moins marqués. En revanche il apparaît une hyperphénylalaninémie qui n'est pas observée dans la maladie de Segawa (Sato, H. 2013 ; Horvath, G. 2008). Ceci tendrait à différencier clairement les atteintes autosomiques dominantes (maladie de Segawa) et récessives mais de récents rapports semblent suggérer que la réalité est plus complexe et qu'il existe un continuum phénotypique entre les formes dominantes et récessives (Horvath, G. 2008).

3.1.2. Déficit en PTPS

Un déficit en PTPS entraîne également un déficit en BH4 (Longo, N. 2009). Il s'agit de la cause la plus commune d'anomalie dans le métabolisme de la BH4 (Niu, D.M. 2011). Les symptômes rencontrés le plus souvent consistent en des troubles neurologiques avec dystonie, crises oculogyres, retard mental et hypotonie, entre autres. Ces symptômes apparaissent essentiellement durant les premiers mois de vie (Lee, N.C. 2006 ; Shintaku, H. 2000).

Le diagnostic est établi grâce au profil biochimique des ptérines et amines biogènes dans le LCR. On trouve en effet une baisse en BH4 avec une augmentation de la N. En conséquence de la baisse en BH4, on observe une baisse du HVA et du 5 HIAA. Dans beaucoup de cas une hyperphénylalaninémie est présente (Lee, N.C. 2006 ; Shintaku, H. 2000).

3.1.3. Déficit en SR

La dernière étape de la synthèse en BH4 implique la SR (Murata, S. 2007 ; Werner, E.R. 2011 ; Longo, N. 2009). Les premiers symptômes d'un déficit en SR apparaissent dans les dix premières années de vie. Les plus fréquents sont des retards psychomoteurs, dystonies, crises oculogyres, hypotonie, spasticité, hypersalivation, microcéphalie, etc (Murata, S. 2007 ; Werner, E.R. 2011 ; Longo, N. 2009). D'un point de vue biochimique, on retrouve dans les cas de déficit en SR une baisse en BH4, une augmentation en BH2 et une N normale ou légèrement augmentée. Le HVA et le 5 HIAA sont quant à eux à de faibles niveaux de concentrations (Verbeek, M.M. 2008 ; Leu-Semenescu, S. 2010). Les taux de phénylalanine dans le sang sont normaux puisqu'il existe dans les organes périphériques d'autres systèmes enzymatiques capables de transformer le 6-PTP en BH4 et qui sont absents du système

nerveux central. Les enzymes impliquées sont notamment l'aldose réductase, la carbonyle réductase et la DHFR (Verbeek, M.M. 2008).

3.1.4. Déficit en PCD

Après action des hydroxylases, deux enzymes interviennent pour régénérer la BH4 ; la PCD et la DHPR (Murata, S. 2007 ; Werner, E.R. 2011 ; Longo, N. 2009).

Quelques cas de déficit en PCD ont été rapportés dans la littérature (Thöny, B. 1998). Les symptômes associés sont peu nombreux, parfois une hypotonie passagère et un retard moteur. La plupart des cas reste asymptomatique. Une hyperphénylalaninémie est souvent présente, bien que modérée, il est d'ailleurs supposé que cette hyperphénylalaninémie serait responsable des troubles neurologiques observés (Thöny, B. 1998). Le profil métabolique n'indique qu'une baisse de la BH4 associée à une hausse de la primaptérine (Thöny, B. 1998).

3.1.5. Déficit en DHPR

Le déficit en DHPR est un trouble d'origine autosomique récessive amenant à un déficit en BH4 (Blau, N. 1998). Il s'agit d'un des troubles les plus sévères affectant le métabolisme de la BH4 (Blau, N. 1998). C'est également le deuxième plus fréquent dans le monde (31% des déficits en BH4) bien que l'incidence soit parfois plus importante dans certains pays (75% des déficits en BH4 en Turquie) (Romstad, A. 2000). Les symptômes apparaissent dès la période néonatale ou la prime enfance. Ces symptômes incluent un retard psychomoteur, une hypertonie des membres, une dyskinésie, une dystonie, une hypersalivation et une microcéphalie entre autres (Blau, N. 1998 ; Romstad, A. 2000). Le profil biochimique est altéré avec une hyperphénylalaninémie, une baisse de la BH4 et une augmentation de la BH2 avec une N normale. Les métabolites de la dopamine et de la sérotonine, HVA et 5 HIAA, sont également en dessous de la normale (Blau, N. 1998 ; Romstad, A. 2000).

3.2. *Troubles de la synthèse en dopamine et sérotonine*

Ces troubles concernent des déficits enzymatiques impactant la synthèse de la dopamine et ou de la sérotonine, sans que le métabolisme des ptérines ne soit perturbé (Hyland, K. 2007 ; Kurian, M. 2011 ; Marin-Valencia, I. 2008). Parmi ces troubles on trouve les déficits en TH, en AADC et en pyridoxal 5' phosphate, cofacteur de l'AADC (Kurian, M. 2011).

3.2.1. Déficit en TH

La TH permet de réaliser la première étape de la synthèse de la dopamine (Zafeiriou, D.I. 2009) (Figure. 1). Les symptômes d'un déficit en TH se déclarent en période néonatale ou dans la prime enfance. Certains sont spécifiques d'un déficit en dopamine, incluant hypokinésie, dystonie avec fluctuation diurne, chorée, crises oculogyres et ptosis. Des symptômes non spécifiques comme l'hypertonie des membres et l'hypotonie du tronc peuvent être présents (Zafeiriou, D.I. 2009 ; Ribasés, M. 2007 ; Chi, C.S. 2012). Le profil biochimique du LCR est caractéristique. Il n'y a pas de modification des concentrations des ptérines. Le 5 HIAA et la 5 OHT sont normaux puisque la synthèse en sérotonine n'est pas impactée. En revanche on observe une baisse du HVA et/ou du rapport HVA / 5 HIAA. De même la 3 OMD et le MHPG sont, dans certains cas, à des niveaux inférieurs à la normale (Zafeiriou, D.I. 2009 ; Ribasés, M. 2007 ; Chi, C.S. 2012).

3.2.2. Déficit en AADC

L'AADC est l'enzyme catalysant la dernière étape de la synthèse de la dopamine et de la sérotonine (Figure. 1) (Allen, G.F.G. 2009).

Le premier cas de déficit en AADC recensé date de 1990 (Marin-Valencia, I. 2008). Peu de cas ont été recensés pour le moment de par le monde.

Chez la plupart des patients les symptômes apparaissent dès les premiers mois de vie, mais ils peuvent apparaître plus tardivement (jusqu'à 24 ans) (Allen, G.F.G. 2009 ; Tay, S.K.H. 2007). Ces symptômes incluent principalement une hypotonie accompagnée de crises oculogyres. Des retards mentaux, des troubles du mouvement avec hypokinésie et dystonie sont aussi communs. Un déficit en AADC est caractérisé par des concentrations faibles en HVA et 5 HIAA dans le LCR. Il en est de même du MHPG. A l'inverse les concentrations en 3 OMD et 5 OHT sont augmentées. Les concentrations en ptérines restent normales (Allen, G.F.G. 2009).

3.2.3. Déficit en PNPO

Le pyridoxal phosphate (PLP), forme active de la vitamine B6, est un cofacteur essentiel de l'AADC (Allen, G.F.G. 2009). La PNPO (pyridoxamine phosphate oxydase) est une enzyme

permettant de synthétiser le pyridoxal phosphate à partir de la pyridoxine ou de la pyridoxamine. La PNPO permet également de recycler le PLP à partir de la pyridoxamine phosphate (Khayat, M. 2008). Par conséquent un déficit en PNPO entraîne un déficit en pyridoxal phosphate qui se traduit par une diminution de la synthèse de la dopamine et de la sérotonine. L'analyse des neurotransmetteurs dans le LCR révèle un profil similaire à celui observé dans le cas d'un déficit en AADC (Khayat, M. 2008). La différence peut se faire par l'analyse du PLP qui est dans ce cas à des concentrations inférieures à la normale (Khayat, M. 2008).

Les symptômes liés à un déficit en PNPO sont représentés par des encéphalopathies néonatales résistantes aux anti-convulsivants ainsi que des convulsions de différents types et durées (Khayat, M. 2008).

Le déficit en PNPO ne doit en revanche pas être confondu avec un déficit en vitamine B6. En effet, le traitement classique d'un déficit en vitamine B6, la pyridoxine, ne permet pas d'atténuer les symptômes observés dans le cas d'un déficit en PNPO (Khayat, M. 2008).

3.3. Troubles des transporteurs de la dopamine (DTDS)

Un nouveau genre de maladies métaboliques appelé « transportopathies » a été récemment décrit (Blackstone, C. 2009). Il s'agit d'un déficit en transporteur membranaire de la dopamine, le DAT (dopamine active transporter) qui est soit d'origine génétique soit d'origine auto-immune. Ce transporteur a pour but la recapture de la dopamine libérée dans la fente synaptique.

Les symptômes les plus fréquemment observés consistent en un syndrome parkinsonien infantile associé à une dystonie ainsi que de très nombreux symptômes identiques à ceux rencontrés dans les cas de défauts de synthèse en dopamine. C'est ce qui ressort notamment de l'étude de trois patients consanguins présentant ce déficit (Kurian, M.A. 2009).

Les caractéristiques biochimiques du LCR montrent une augmentation de la concentration en HVA associé à une augmentation du rapport HVA / 5 HIAA. (Kurian, M.A 2009 ; Kurian, M.A. 2011)

A l'inverse des déficits en synthèse de la dopamine qui peuvent être partiellement corrigés par supplémentation en précurseur de la dopamine, les déficits en DAT ne sont pas sensibles aux traitements. (Kurian, M.A. 2011)

L'hypothèse avancée pour expliquer ce nouveau trouble génétique est que la perte de fonctions du DAT augmente le temps de présence de la dopamine dans la fente synaptique.

De ce fait la dopamine est dégradée dans la fente synaptique par la COMT ce qui entraîne une augmentation de la concentration en HVA dans le LCR. Sans recapture de la dopamine libérée, le stockage de la dopamine intracellulaire dans les vésicules synaptiques est réduit. De plus la dopamine présente dans la fente synaptique est capable d'activer des récepteurs inhibant la TH ce qui a pour effet de diminuer la synthèse en dopamine. Ce qui expliquerait pourquoi les symptômes sont similaires à ceux observés dans les cas de déficits en synthèse de dopamine (Kurian, M.A. 2009).

3.4. Déficit cérébral en folates

Le déficit cérébral en folate (CFD pour cerebral folate deficiency) est défini comme tout syndrome neurologique associé à une faible concentration en 5 MTHF dans le LCR. Deux cas de figures peuvent alors se présenter. Soit la baisse en 5 MTHF dans le LCR est associée à une baisse dans le plasma, soit ce n'est pas le cas. Si le déficit en folate est généralisé, il s'agit alors d'un problème d'absorption du folate dû à des problèmes nutritionnels ou à une malabsorption intestinale. On se contentera de présenter ici les cas de déficits en folate uniquement localisé au niveau du SNC (Serrano, M. 2012).

3.4.1. Déficit en récepteur au folate, FR α

Le récepteur FR α est responsable du transport du 5 MTHF entre le sang et le LCR au travers du plexus choroïde. Il existe peu de cas recensés d'un tel déficit (Steinfeld, R. 2009 ; Pérez-Duenas, B. 2010). L'âge d'apparition des premiers symptômes est situé dans la deuxième année de vie et parfois au delà. Il est supposé que cela soit dû à la présence d'un autre transporteur du folate, FR β , dans le cerveau fœtal qui pourrait compenser l'absence de FR α durant la première année de vie. Les symptômes cliniques présentés à partir de cet âge incluent une régression et un retard mental, des crises myocloniques, une ataxie progressive et une épilepsie résistante aux traitements. Vu le faible nombre de cas identifiés, le spectre de symptômes reste encore mal défini.

Au niveau biochimique on retrouve évidemment une baisse considérable de la concentration en 5 MTHF dans le LCR avec une baisse du rapport des concentrations entre le LCR et le sang (CSF 5MTHF / plasma 5MTHF). Une baisse de la concentration en BH4 est parfois observée, alors que les amines biogènes restent à un niveau normal.

3.4.2. Déficit en MTHFR

Comme on peut le voir sur la figure 5, la MTHFR est l'enzyme qui catalyse l'étape clé de la régénération du 5 MTHF à partir du 5,10 méthylèneTHF. Un déficit en MTHFR se traduit par un déficit en 5 MTHF. Plusieurs cas ont récemment été publiés (Serrano, M 2012 ; Tsuji, M. 2011 ; Ben-Shachar, S. 2012 ; D'Aco, K.E. 2014).

Les premiers symptômes peuvent apparaître à tout âge, de la petite enfance à l'adolescence, voire plus tard. Ces symptômes incluent une épilepsie avec myoclonie, déclin mental, ataxie, mais le spectre des symptômes est très large et varié. Au niveau biochimique on retrouve évidemment une très faible concentration en 5 MTHF dans le LCR, le rapport CSF 5MTHF / plasma 5MTHF reste normal. Dans le plasma on trouve une concentration plus élevée en homocystéine associée à une faible concentration en méthionine.

3.4.3. Déficit en DHFR

La DHFR est l'enzyme permettant de réduire l'acide folique en DHF, puis le DHF en THF. Cette enzyme joue donc un rôle crucial dans le métabolisme des folates puisque la forme privilégiée d'apport nutritionnel de folate est l'acide folique. Un déficit en DHFR entraîne un déséquilibre dans le métabolisme des folates.

Parmi les cas recensés on distingue usuellement deux atteintes suivant leur sévérité (Serrano, M. 2012 ; Cario, H. 2011 ; Banka, S. 2011). Dans les cas les plus sévères, les premiers symptômes apparaissent à un stade très précoce, entre 2 et 6 mois alors que dans les cas moins sévères, les symptômes n'apparaissent qu'entre 5 et 11 ans. Les patients atteints de ce déficit présentent un large panel de symptômes tels qu'une anémie mégalo-blastique, des myoclonies des paupières, des retards psychomoteurs, des macrocytoses sans anémie et de l'épilepsie.

Au niveau biochimique on retrouve une baisse de la concentration en 5 MTHF dans le LCR associé à un rapport CSF 5MTHF / plasma 5MTHF normal. On retrouve dans certains cas une baisse de la BH4 et des amines biogènes (Serrano, M. 2012 ; Banka, S. 2011).

3.4.4. Déficit secondaire associé à des déficits en DHPR et AADC

De nombreuses affections ont pour conséquence une baisse en 5 MTHF dans le LCR. Parmi elles, certaines sont liées au métabolisme des ptéridines ou des amines biogènes. C'est le cas des déficits en AADC et DHPR.

Dans les cas de déficits en AADC, il a été retrouvé des baisses en 5 MTHF (Brautigam, C. 2000). L'hypothèse avancée pour expliquer ce lien est qu'un déficit en AADC entraîne une accumulation en L-DOPA qui est elle-même transformée en 3OMD (figure 1). Cette étape nécessite l'enzyme COMT avec la S adénosyl méthionine (SAM) comme cofacteur donneur du groupe méthyle. De ce fait la concentration en SAM dans le LCR diminue. Il en résulte une participation des intermédiaires du métabolisme donneur de groupements à un atome de carbone, et au final une baisse en 5 MTHF.

Dans les cas de déficits en DHPR, il a également été retrouvé une baisse en 5 MTHF dans le LCR (Hyland, K. 2010). La DHPR est une enzyme permettant de réduire la qBH2 en BH4. Cette action est similaire à l'action de la DHFR qui réduit le DHF en THF. En absence d'activité de la DHPR, la qBH2 se réarrange en BH2 qui s'accumule. Or la BH2 a une structure identique à la partie ptérinique du DHF, et la BH2 est ainsi réduite en BH4 par la DHFR. De ce fait un déficit en 5 MTHF peut apparaître. Donc, dans le cas d'une absence d'activité de la DHPR, la BH2 agirait comme un inhibiteur compétitif de la DHFR. Cet équilibre entre qBH2 et BH2 et l'action de la DHFR possible sur la BH2 pourrait aussi expliquer le fait qu'en cas de déficit en DHFR une baisse en BH4 peut être observée.

3.5. Diagnostic différentiel

Les différentes implications des déficits enzymatiques touchant le métabolisme des ptérines et ceux de la dopamine et de la sérotonine sont résumées dans le tableau 1. On voit ainsi les conséquences observables biochimiquement de chacun des déficits. On peut également observer que bien que les déficits métaboliques entraînent des déficits en dopamine et en sérotonine, ces composés ne sont jamais dosés à des fins de diagnostic dans le LCR. En effet, ces molécules actives ne sont présentes qu'à l'état de traces et leur *turnover* est bien trop rapide pour en permettre une estimation fiable. C'est pourquoi le diagnostic repose sur le dosage des précurseurs et métabolites de la dopamine et de la sérotonine dans le LCR. Enfin le dosage dans le LCR est indispensable dans la mesure où seul le LCR reflète l'activité du système nerveux central. En effet il existe des tumeurs neuroendocrines capables de sécréter en large excès du HVA ou du 5 HIAA dans les urines notamment, ce qui perturberait une analyse de déficit primaire en dopamine ou en sérotonine.

Tableau 1 : Profils métaboliques observés dans le LCR, ou le plasma pour la phénylalanine (Phe), dans les maladies affectant le métabolisme de la dopamine et de la sérotonine.

Déficit enzymatique	Phe	BH4	BH2	N	Primp	Sepiap	HVA	5 HIAA	HVA / 5 HIAA	3 OMD	5 OHT	MHPG
GTP-CH AD (Segawa)	n	↓	↓	↓	n	n	↓	↓	n	n	n	↓
GTP-CH AR	↑	↓	↓	↓	n	n	↓	↓	n	n	n	↓
PTPS	↑	↓	↓	↑	n	n	↓	↓	n	n	n	↓
SR	n	↓	↑	n ou ↑	n	↑	↓	↓	n	n	n	↓
PCD	↑	↓	n	n	↑	n	n	n	n	n	n	n
DHPR	↑	↓	↑	n	n	n	↓	↓	n	n	n	↓
TH	n	n	n	n	n	n	↓	n	↓	n	n	↓
AADC	n	n	n	n	n	n	↓	↓	n	↑	↑	↓
DTDS	n	n	n	n	n	n	↑	n	↑	n	n	n
PNPO	n	n	n	n	n	n	n ou ↓	n ou ↓	n	↑	↑	↓

n = normal ; ↑ = augmentation ; ↓ = baisse

4. Méthodes de dosage actuelles des amines biogènes, ptérines et folates

4.1. Ptérines

Les ptéridines ont été isolées pour la première fois par Hopkins en 1889 à partir des ailes de papillons de la famille des Pteridae (Hopkins, F.G. 1895). Les ptéridines ont pour structure de base une pyrazino [2,3d] pyrimidine (Blau, N. 2008). Parmi la famille des ptéridines, on distingue le groupe des ptérines qui ont une structure de type 2 amino – 4 oxo (Figure 6).

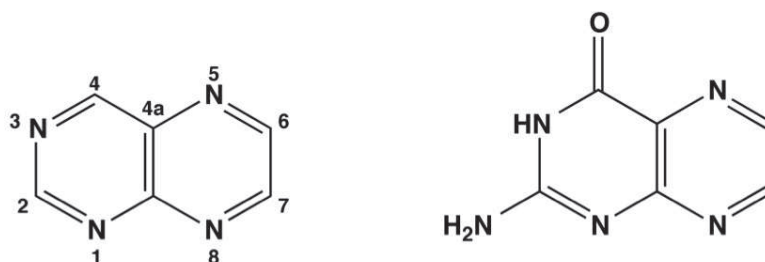


Figure 6: Structure chimique du noyau ptéridine et de la ptérine

Au sein de ces ptérines, deux types existent. Les ptérines conjuguées, sont liées de façon covalente à un motif p – aminobenzoate et un glutamate (Blau, N. 2008 ; Murata, S. 2007). Elles constituent en réalité un groupe à part entière, celui de l'acide folique ou vitamine B9. Les autres ptérines sont dites non conjuguées et possèdent une substitution par une chaîne aliphatique en position 6 (comme la bioptérine et la néoptérine) ou 7 (cas de la primaptérine) du noyau ptérine. On ne parlera dans cette partie que des ptérines non conjuguées puisque les folates, formes conjuguées des ptérines, seront abordés ultérieurement. De plus comme on l'a vu précédemment, la forme active de ptérines dans le métabolisme des neurotransmetteurs est la BH4 (Werner, E.R. 2011).

4.1.1. Propriétés physico-chimiques

Dans l'ensemble, les ptérines sont peu solubles à la fois dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Blau, N. 2008). Ceci est évident, comme en témoigne le tableau 2 regroupant différentes propriétés de quelques-unes des plus importantes ptérines actuellement commercialisées (Schircks Laboratories). L'origine de cette solubilité réduite proviendrait de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les fragments 2-amino-4-oxo des molécules de

ptérines au détriment de l'hydratation (Blau, N. 2008). En revanche, la solubilité est influencée par le pH et par les chaînes latérales présentes en position 6 ou 7.

Les différentes ptérines existantes peuvent se présenter sous différents états d'oxydation, (cf. Figure.2, cycle métabolique de la BH4) (Werner, ER. 2011). C'est en effet particulièrement important pour la BH4 qui peut être présente chez les êtres vivants sous 3 états d'oxydations différents :

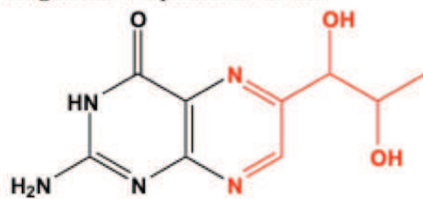
- entièrement réduit : la BH4,
- partiellement réduit : la BH2,
- entièrement oxydé : la B.

Ces molécules bien que très similaires dans leur structure chimique présentent en réalité des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes. En effet il s'avère que seules les formes entièrement oxydées des ptérines (telle que B, N et P) sont fluorescentes, les formes réduites (BH2, BH4 ou NH2) présentent une fluorescence beaucoup moins importante. En revanche d'un point de vue biologique la forme active de la bioptérine est la BH4, forme entièrement réduite.

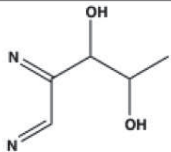
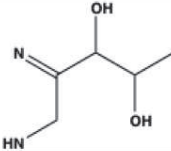
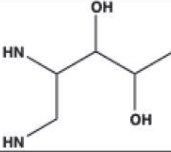
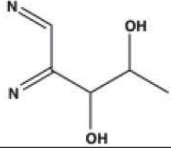
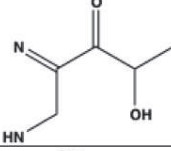
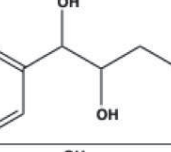
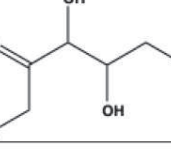
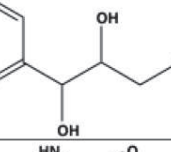
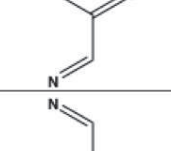
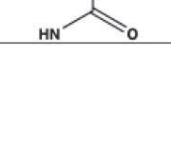
Les formes réduites des ptérines sont également très sensibles à l'oxydation au contact de l'oxygène atmosphérique. Cette oxydation génère un certain nombre de produits de dégradation pouvant à leur tour être fluorescents. Il est à noter que toutes les ptérines (quelque soit leur état d'oxydation) sont sensibles à la lumière et doivent en être protégées pour empêcher leur dégradation.

Tableau 2: Structures et propriétés physico-chimiques des ptérines les plus communes. La structure de la bioptérine est rappelée, en rouge est indiqué le fragment latéral variable suivant les ptérines.

Masses molaires exprimées en g/mol, λ exprimées en nm.



Noms (abréviation)	Masses molaires	Fragment latéral	Solubilité dans l'eau	Fluorescence	
				λ excitation	λ émission
Ptérine (P)	163,1		0,02 g/L	350	450

Bioptérine (B)	237,2		0,1 g/L	350	450
Dihydrobioptérine (BH2)	239,2		2 g/L	-	-
Tetrahydrobioptérine (BH4)	241,2		23 g/L	-	-
Primaptérine (PP)	237,2			350	450
Sepiaptérine (SP)	237,2		1,7 g/L	425	530
Néoptérine (N)	253,2		0,05 g/L	350	450
Dihydronéoptérine (NH2)	255,2		1,6 g/L	-	-
Monaptérine (MP)	253,2			350	450
Xanthoptérine (XP)	179,1			425	530
Isoxanthoptérine (IXP)	179,1			365	480

4.1.2. Méthodes actuelles de dosage des ptérines dans les matrices biologiques

Comme décrit dans le paragraphe précédent, un certain nombre de ptérines sont fluorescentes. Par conséquent, les méthodes courantes de dosage des ptérines combinent une séparation par chromatographie en phase liquide suivie par une détection par fluorescence. Ces méthodes sont d'autant plus appropriées que la détection par fluorescence est un mode de détection plus spécifique et plus sensible que l'électrochimie ou l'absorbance UV (Kaneko, Y. 2001).

Le principal inconvénient de ce mode de détection réside dans le fait que les formes réduites des ptérines ne sont pas fluorescentes. Un des moyens mis en œuvre depuis les années 1980 pour contourner ce problème fut d'oxyder les ptérines réduites afin de les transformer en leurs alter ego fluorescents (par exemple la BH₄ est oxydée en B) avant leur analyse. Ces méthodes sont qualifiées de méthodes de dosage indirect. Plus récemment de nouvelles méthodes de dosage utilisant des technologies telles que la spectrométrie de masse ont permis d'éviter ces étapes d'oxydation afin de doser directement les formes réduites de ptérines.

4.1.2.1. Méthodes de dosage indirect

Historiquement, il s'agit des premières méthodes de dosage utilisées pour les ptérines qu'elles soient réduites ou oxydées. Le principe général est d'oxyder chimiquement l'échantillon avant de l'analyser et de détecter les ptérines oxydées par fluorescences.

Les premières techniques d'analyse des biopptérines publiées utilisaient une oxydation de l'échantillon au moyen d'un mélange KI/I₂ (Fukushima, T. 1980) ou de MnO₂ (Blau, N. 1992). De cette façon le seul paramètre mesuré était la concentration en B totale sans distinction des différents états d'oxydation. Malgré les inconvénients de cette technique dont la longue préparation d'échantillon, elle fut longtemps une des plus utilisées du fait de sa simplicité d'utilisation et de sa sensibilité (Fukushima, T. 1980 ; Komori, H. 1999 ; Verbeek, M.M. 2008 ; Fekkes, D. 2007).

Au début des années 1980, Fukushima et Nixon publièrent une méthode de traitement de l'échantillon par oxydation chimique différentielle permettant d'accéder à la concentration en BH₄ (Fukushima, T. 1980). Pour y parvenir, deux étapes de traitement et d'analyse sont nécessaires. En premier lieu, on effectue une oxydation par KI/I₂ en milieu acide. La BH₄ et la BH₂ s'oxydent en B. Le deuxième traitement est une oxydation par KI/I₂ en milieu

basique. La BH2 s'oxyde toujours en B, mais la BH4 s'oxyde et perd sa chaîne latérale en position 6 pour donner la ptérine (P). De cette façon la différence entre les concentrations en B trouvées donne la concentration en BH4 par la formule suivante.

$$BH4 = B \text{ acide} - B \text{ basique}$$

En analysant une troisième fois le même échantillon sans aucun traitement on accède cette fois à la forme B préexistante, ce qui permet d'en déduire la BH2.

Cette méthode simple et performante fut très utilisée et l'est encore à l'heure actuelle pour le dosage en routine de la BH4 (Fukushima, T. 1980 ; Komori, H. 1999 ; Verbeek, M.M. 2008 ; Fekkes, D. 2007). Elle constitue la méthode de référence pour le dosage de la BH4. En revanche cette méthode souffre d'un certain nombre d'inconvénients. Parmi ceux-ci on peut noter la longue durée et les nombreuses étapes de traitement d'échantillon rendant cette méthode peu automatisable. De plus cette technique requiert un grand volume de prise d'essai.

C'est essentiellement pour ces raisons que de nombreux laboratoires ont cherché à développer de nouvelles méthodes d'analyses directes de la BH4 afin de s'affranchir des inconvénients de la méthode de Fukushima et Nixon.

4.1.2.2. Méthodes de dosage direct

Au vu des inconvénients des méthodes de dosages indirects des biopptérines et néoptérines, de nombreuses équipes ont mis au point des méthodes de dosage direct de ces composés.

Bien évidemment la spectrométrie de masse fut utilisée mais également d'autres techniques telles que la détection électrochimique. Enfin d'autres stratégies ont eu pour but d'oxyder les composés après la séparation mais avant la détection par fluorescence. Ces dernières techniques sont directement inspirées de la méthode de Fukushima.

4.1.2.2.1. Oxydation en ligne avant détection par fluorescence

En 1985 Hyland (Hyland, K. 1985) et en 1986 Howells (Howells, D.W. 1986), ont publié une méthode permettant de doser simultanément les trois états d'oxydation des ptérines : les formes tetrahydro-, dihydro-, et entièrement oxydées. Pour ce faire les auteurs utilisent un processus d'oxydation électrochimique après la séparation et avant la détection par fluorescence. De ce fait les formes réduites non fluorescentes sont oxydées avant que leur

fluorescence ne soit mesurée. Au final les formes entièrement oxydées (B, N ...) sont détectées par leur fluorescence intrinsèque, les formes dihydro (BH₂, NH₂, ...) sont détectées par fluorescence après avoir été oxydées et les formes tétrahydro (BH₄ et NH₄) sont détectées par électrochimie et non par fluorescence. Le schéma du montage expérimental utilisé est présenté en figure 7.



Figure 7: Montage expérimental tiré de (Hyland, K. 1985)

Cette méthode semble performante tant en termes de sensibilité (limite de détection de l'ordre de 0,5 pmol) que de répétabilité (coefficient de variation, CV, intra jour inférieur à 6% et CV inter jour inférieur à 13,5%). En revanche les auteurs n'expliquent pas pourquoi la BH₄ doit être dosée par électrochimie et non par fluorescence après oxydation comme on pourrait s'y attendre. On ne peut que supposer que le rendement d'oxydation de la BH₄ est insuffisant pour la détecter par fluorescence. Cette stratégie fut récemment reprise par Biondi et al. (Biondi, R. 2012), sans pour autant parvenir à détecter la BH₄ par fluorescence.

Sur le même principe Suzuki et al. (Suzuki, K. 1991) ont publié en 1991 une méthode utilisant une oxydation chimique post-colonne. Tani et al. (Tani, Y. 1993) ont plus tard repris et amélioré cette technique. Il s'agissait au moyen d'une seconde pompe d'ajouter après la colonne une solution de NaNO₂ afin d'oxyder chimiquement les formes réduites de biopptérines et néoptérines avant de les détecter par fluorescence (Figure 8). La méthode proposée par Suzuki bien que sensible et répétable souffrait d'une longue durée d'analyse

(plus de 40 minutes) ainsi que d'une faible efficacité à en juger par les chromatogrammes présentés dans l'article. Les améliorations apportées par Tani et al. (Tani, Y. 1993) sont notables. En effet même si la séparation dure 25 minutes la résolution et l'efficacité sont meilleures à en juger par les chromatogrammes.



Figure 8: Montage expérimental tiré de (Tani, Y. 1993)

En 2009, Cañada-Cañada et al. ont publié une méthode utilisant une oxydation post-colonne photochimique (Cañada-Cañada, F. 2009). Le schéma du montage (Figure 9) permet de mieux comprendre le système mis en place. Après séparation et détection en UV-Visible par un détecteur DAD à 256 nm, la phase mobile traverse un réacteur photochimique dans lequel les composés sont oxydés au moyen d'une irradiation par une lampe au Xénon de 8 watts. De ce fait les formes réduites des ptérines sont oxydées en leur *alter ego* fluorescent et ensuite détectées par fluorescence.

Figure 9: Montage expérimental pour une oxydation photochimique post-colonne (d'après Cañada-Cañada, F. 2009)

Les limites de détection (LOD) obtenues pour cette méthode ainsi que la répétabilité semblent correctes (13 ng/mL pour la BH2 avec un CV de 6%). Un des défauts de cette méthode est de ne pas permettre le dosage de la NH2. La comparaison faite avec la méthode de Fukushima montre que cette dernière sous-estime la quantité de B totale présente dans l'échantillon par rapport à la méthode de détection directe présentée par les auteurs.

Il existe également d'autres méthodes de détection des formes réduites n'utilisant pas la fluorescence comme moyen de détection et permettant une détection des biop té rines et néop té rines sous forme native sans faire intervenir d'oxydation pré-analytique ou post colonne, chimique ou d'autres natures.

4.1.2.2.2. Détection électrochimique

Parmi les méthodes publiées dans lesquelles une détection électrochimique est utilisée, on peut retenir toutes les méthodes précédemment citées qui utilisent une cellule électrochimique pour oxyder les composés avant leur détection par fluorescence (Hyland, K. 1985 ; Howells,

D.W. 1986 ; Biondi, R. 2012). En effet, dans chacun de ces cas, la BH4 est détectée par électrochimie.

La chromatographie liquide couplée à une détection électrochimique (LC-ECD) était employée pour détecter toutes les formes, qu'elles soient oxydées ou réduites, de ptérines. Un des derniers articles utilisant exclusivement ce type de détection est paru en 1983 (Lunte, C.E. 1983). En utilisant deux électrodes en série (électrode dual) à des potentiels d'oxydation différents, les auteurs ont pu analyser et identifier simultanément pas moins de 18 ptérines de chimie et état d'oxydation différents. Dans tous les cas les limites de détection sont inférieures à 1 pmol et les CV ne dépassent pas 4,1%, ce qui prouve la performance de la méthode (Figure 10).



Figure 10: Limites de détection pour les ptérines analysées par LC-ECD par Lunte et al. (Lunte, C.E. 1983)

En revanche il est connu que les fluides biologiques et notamment le LCR contiennent un grand nombre de substances électro-actives (Adams, R.N. 1976). De ce fait, une préparation d'échantillon poussée est nécessaire afin de débarrasser l'échantillon des impuretés pouvant interférer avec les composés étudiés. Toutefois un avantage lié à l'électrochimie et particulièrement grâce aux doubles électrodes, est de fournir des informations permettant d'identifier les composés.

4.1.2.2.3. Détection par spectrométrie de masse

Récemment, au cours de l'année 2012, plusieurs équipes ont publié leurs travaux sur l'analyse des formes réduites et oxydées de biptérines et néoptérines par couplage de chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse (LC-MS) (Kim, H.R. 2012 ; Fismen, L. 2012 ; Jimenez Giron, A. 2012).

Kim et al. ont publié une méthode permettant le dosage de la BH4 ainsi que de la dopamine dans le cerveau de rat (Kim, H.R. 2012). L'utilisation de la LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) avec une source d'ionisation de type electrospray a permis de détecter la BH4 jusqu'à des limites de détection de 10 ng/g de BH4 dans le cerveau de rat. Le principal inconvénient de la méthode est de ne montrer la détection que de la BH4 et pas de la BH2 ni de la B. Pourtant les auteurs présentent des spectres de masses pour ces deux composés. Une des conclusions importantes de l'article concerne la stabilité de la BH4. Les auteurs prouvent que la température de conservation des échantillons est un paramètre clé, plus important encore que l'ajout d'antioxydants dont l'effet n'est pas prouvé dans leur étude.

Le second article portant sur ce genre d'analyse présente l'analyse simultanée de la BH4, la BH2 et de la B par LC-MS/MS (Fismen, L. 2012). L'analyse ne dure que 12 minutes et les limites de détection de 1 nmol/L (BH4 et BH2) ou 2,5 nmol/L (B) sont comparables à celles obtenues par d'autres méthodes déjà citées et semblent suffisantes pour permettre un dosage de ces composés dans le LCR.

Le troisième article paru en 2012 présente une méthode d'analyse de 10 composés de la famille des ptérines dont la B et la BH2 mais pas la BH4 (Jimenez Giron, A. 2012). Les auteurs utilisent comme détecteur un simple quadropole à l'inverse des deux précédentes études par spectrométrie de masse utilisant un triple quadropole. Le temps d'analyse dépasse les 30 minutes et les limites de détection, très variables suivant les composés, sont plus élevées que dans le cas de la détection par fluorescence d'après les auteurs eux mêmes. Le principal avantage de cette méthode est tout de même de fournir le spectre de masse des composés analysés et donc de permettre une identification spécifique.

4.1.2.2.4. Dosage de la néoptérine par *ELISA*

Outre les techniques d'analyse par chromatographie, il existe une méthode de dosage de la néoptérine par ELISA relativement répandue. Le kit de test immunoenzymatique pour le dosage quantitatif est commercialisé par IBL international (IBL, Neopterin ELISA. RE59321. 2012). La notice fournie indique une limite de détection de 0,7 nmol/L pour la néoptérine avec une très bonne corrélation vis-à-vis de la méthode chromatographique. Il existe une faible réactivité croisée avec la NH₂. Un des inconvénients du kit est qu'il n'est indiqué que pour le dosage de la néoptérine dans le sérum ou les urines et pas dans le LCR. Une revue générale de 2010 (Hagberg, L. 2010) sur le rôle de la néoptérine en tant que biomarqueurs de l'activation du système immunitaire dans le système nerveux central ne semble pas relever de contre-indication à l'utilisation du test ELISA pour le dosage dans le LCR.

4.2. Amines biogènes

Les amines biogènes sont très présentes chez les vertébrés. On peut distinguer deux grandes familles d'amines biogènes particulièrement importantes : les catécholamines dérivées de la tyrosine et les indolamines dérivées du tryptophane.

4.2.1. Propriétés physico chimiques des amines biogènes

Les catécholamines, comme leur nom l'indique, dérivent d'un noyau catéchol plus ou moins substitué. Du fait de ces substitutions, les catécholamines présentent une variété de fonctions chimiques et de propriétés physicochimiques. Par exemple, la dopamine est une amine primaire tandis que le HVA est un acide carboxylique. La 3OMD est un acide aminé et le MHPG est un glycol. Cette hétérogénéité de fonctions chimiques sur des structures similaires rend difficile l'analyse simultanée des métabolites du système dopaminergique (3OMD, HVA, MHPG). De plus le HVA étant acide, le pH aura une grande importance sur son comportement chromatographique, alors que le MHPG est neutre et indifférent au pH de la phase mobile. De la même façon, les indolamines possèdent toutes un noyau indole avec une grande variabilité des substituants. La sérotonine est une amine primaire, le 5 HIAA son métabolite est un acide et le 5OHT est un acide aminé. En revanche tous ces composés, sans exception, sont électroactifs (Adams, R.N. 1976).

4.2.2. Méthodes actuelles de dosage des amines biogènes et de leurs métabolites

Depuis plusieurs décennies la dopamine, la sérotonine et leurs métabolites ont fait l'objet du développement de nombreuses méthodes de dosage dans diverses matrices biologiques (organes, sang, urine...). Récemment, deux revues (Bicker, J. 2013 ; Tsunoda, M. 2006) ont recensé un très grand nombre de publications sur toutes les méthodes de dosage des catécholamines en général (Tsunoda, M. 2006), ou plus spécifiquement par chromatographie en phase liquide (Bicker, J. 2013). Cependant ces revues sont focalisées sur les catécholamines et ne s'intéressent pas aux dérivés de la sérotonine. Dans cette partie nous étudierons les différentes publications ayant pour but le dosage des métabolites de la dopamine et de la sérotonine principalement le HVA et le 5 HIAA.

4.2.2.1. Dosage par LC-ECD

La chromatographie en phase liquide couplée à la détection électrochimique a été largement utilisée pour le dosage des amines biogènes. Les composés les plus souvent dosés sont le HVA et le 5 HIAA. La dopamine et la sérotonine ainsi que l'adrénaline et la noradrénaline figurent également régulièrement dans la liste des composés analysés.

Une des plus anciennes méthodes de dosage publiée en 1983 (Fujita, K. 1983) présentait deux analyses chromatographiques. La première permet de mesurer les concentrations du HVA et du VMA (acide vanylmandellique) qui est un autre métabolite de la dopamine, tandis que la seconde mesure celle du 5 HIAA. La méthode fut utilisée pour un dosage dans l'urine de plusieurs patients. Bien que performante et ne nécessitant qu'une préparation d'échantillon très simple, les temps d'analyses sont trop importants, 40 et 15 minutes pour les deux étapes.

Un autre article publié quelques années plus tard présentait une méthode bien plus rapide pour l'analyse simultanée dans le LCR de l'HVA, le 5 HIAA, le MHPG, le DOPAC (acide dihydroxyphenylacétique) et de la sérotonine (Koyama, E. 1988). Les limites de détection exprimées en picogramme sont de 0,5 pour le MHPG et de 1,5 pour le HVA et le 5 HIAA. Cette méthode leur a permis d'étudier l'effet de la maladie d'Alzheimer sur le profil métabolique des patients.

Une autre équipe a développé une méthode de dosage par LC-ECD du 5 HIAA et du HVA (Candito, M. 1994). Le MHPG est également détecté mais n'a pas été quantifié dans cette étude. Bien qu'aucune limite de détection ou de quantification ne soient mentionnées, il semblerait que cette méthode ait permis de doser le HVA et le 5 HIAA chez un certain nombre de patients dont la plus basse concentration était de 50 nmol/L. La rapidité de la méthode est appréciable puisque l'analyse est faite en 10 minutes. L'autre intérêt de cette publication était l'étude de corrélations entre le 5 HIAA, le HVA, la BH4 et la NH2, les ptérines étant dosées suivant une procédure d'oxydation coulométrique post-colonne suivi d'une détection par fluorescence adaptée de Howells et al. (Howells, D. 1986).

Une équipe chinoise a récemment proposé de doser le HVA, le 5 HIAA et la BH4 à l'aide de nouvelles électrodes fabriquées au sein de son laboratoire. Les électrodes en question sont constituées soit d'un mélange de platine et palladium (Zhang, W. 2005) soit de manganèse dopé au PbO₂ (Zhang, W. 2004). L'application de la méthode proposée à des micro-dialysats de cerveau de rat semble concluante. En effet les limites de quantification atteintes sont de l'ordre de la nmol/L pour le HVA, le 5 HIAA et la BH4.

D'autres études ont également eu pour but de développer des méthodes d'analyse du HVA et du 5 HIAA dans le LCR ou dans des extraits de cerveau humain (Niazi Shahabi, H. 2003 ; Hubbard, KE. 2009 ; Van Dam, D. 2014). Ces méthodes utilisent toutes un détecteur coulométrique (Candito, M. 1994 ; Hubbard, KE. 2009). L'utilisation d'agent d'appariement d'ions est également récurrente dans le but d'augmenter la rétention des composés les plus polaires sur les phases stationnaires de type C18. Les durées d'analyses varient de 10 à 40 minutes avec des limites de détection pouvant atteindre les 2 pmol/L.

Considérées dans leur ensemble, les méthodes couplées à de la détection électrochimique, bien que pouvant être rapides et sensibles, souffrent toutes d'un manque de spécificité. Ceci exige une séparation chromatographique particulièrement résolutive afin d'éviter toute co-élution avec les composés d'intérêt.

4.2.2.2. Dosage par LC-MS

Le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse a été, depuis son apparition, appliqué à de nombreuses problématiques analytiques. L'analyse des amines biogènes dans les fluides biologiques n'a pas fait exception.

L'application de la LC-MS pour le dosage du HVA et du 5 HIAA a été publiée dès le début des années 2000 (Manini, P. 2000). Dans cette étude l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à un triple quadrupole a permis de mesurer le HVA, le 5 HIAA, le DOPAC et le VMA dans des échantillons urinaires en moins de 10 minutes. Les limites de détection de 30 µg/L soit environ 150 nmol/L pour le HVA et le 5 HIAA sont suffisantes pour la quantification de ces métabolites dans les urines. Un des objectifs de cette étude était également d'étudier les mécanismes de fragmentation des différents ions et adduits formés.

On retrouve cette volonté dans un autre article (Bourcier, S. 2006) où une large étude sur la fragmentation en spectrométrie de masse en tandem de divers neurotransmetteurs (catécholamines, indolamines, ptérines et le GABA) a été menée. Il ne s'agit là que d'une méthode qualitative où les spectres de fragmentation ne servent qu'à l'identification des composés dans les matrices biologiques. Aucune donnée relative à une validation de méthode n'est fournie, mais cette méthode montre son potentiel quant à l'analyse de ces neurotransmetteurs dans des matrices biologiques.

En 2007, une méthode de quantification de la dopamine et de la sérotonine ainsi que de leurs principaux métabolites dont le HVA et le 5 HIAA par LC-MS/MS a été proposée (Tareke, E.

2007). Outre le fait de montrer la faisabilité de la méthode pour l'analyse de portions de cerveau de rat, l'intérêt de cette étude a été de comparer la LC-MS/MS à une méthode plus classique par LC-ECD. La conclusion que l'on peut tirer de ce travail est que les limites de détection pour le HVA et le 5 HIAA sont respectivement 13 fois et 4 fois plus faible en LC-ECD que en LC-MS/MS. Malgré cette grande différence, les quantités trouvées dans le striatum sont significativement plus grandes en LC-MS/MS, mais avec un écart type lui aussi plus important. L'hypothèse avancée par les auteurs suggère que l'utilisation d'étalon interne deutéré en LC-MS/MS permet une quantification plus juste puisque ces étalons se comportent exactement de la même façon que les analytes lors des procédures de traitement de l'échantillon. Cependant, la stabilité de ces composés lors de l'étape de préparation de l'échantillon n'a pas été évoquée par les auteurs.

En fait, plusieurs méthodes d'analyse par LC-MS/MS ont été proposées pour le dosage des métabolites des catécholamines et des amines biogènes, incluant le dosage du HVA, du 5 HIAA, de la dopamine, de la sérotonine, le glutamate et même le GABA (Su, F. 2009 ; Najmanova, V. 2011 ; Gonzalez, R. 2011 ; Scapolla, C. 2011 ; Wei, B. 2014 ; Kovac, A. 2014). Les durées des analyses varient entre 5 et 30 minutes avec des limites de quantification (LOQ) comprises entre 20 et 60 nmol/L pour le HVA et 6 à 60 nmol/L pour le 5 HIAA. Curieusement, l'utilisation de la LC-MS/MS pour le dosage du HVA et du 5 HIAA dans le LCR humain n'a jamais été rapportée, jusqu'en 2013, à notre connaissance. La plupart des méthodes par LC-MS/MS publiées s'adresse au dosage dans les urines, ou dans le cerveau de rat, le plus souvent. Une méthode applicable au dosage du HVA et du 5 HIAA dans le LCR humain a été proposée récemment (Suominen, T. 2013), le but étant de déterminer aussi les conjugués glucuronés ou sulfonés du HVA et du 5 HIAA. Cependant, les limites de quantification de 100 nmol/L pour le HVA et de 25 nmol/L pour le 5 HIAA associées à une durée totale d'analyse de 25 minutes font de cette méthode par LC-MS/MS, l'une des moins rapide et plutôt peu sensible, comparées aux autres citées précédemment.

Pour conclure, les méthodes de dosage par LC-MS/MS des métabolites de la dopamine et de la sérotonine, seraient comparables, du point de vue sensibilité et durée de l'analyse, aux méthodes par LC-ECD. L'intérêt de la LC-MS/MS, réside probablement dans sa spécificité et l'utilisation d'un étalon interne deutéré ; avantage considérable lorsque les procédures de traitement d'échantillon sont longues et fastidieuses. Ce qui n'est pas le cas pour les échantillons de LCR, voir même les échantillons d'urine ou de cerveau. Ce type d'échantillon ne nécessiterait qu'une étape de dilution suivie d'une étape de centrifugation avant injection

dans le système chromatographique. Enfin, l'utilisation de composés deutérés engendre un surcoût non négligeable, par rapport aux autres méthodes.

4.2.2.3. Dosage par LC couplée à la détection par chimiluminescence

La chromatographie liquide couplée à une détection par chimiluminescence a été proposée depuis 2006 pour le dosage des amines biogènes (Tsunoda, M. 2006 ; Bicker, J. 2013), ainsi que pour la détection du HVA et du 5 HIAA dans des microdialysats de cerveau de souris (Li, N. et al. 2009). Le schéma de principe (Li, N. et al. 2009) de ce mode de détection est présenté sur la figure 11. L'effluent de la colonne passe dans le DAD pour une détection à 281 nm avant d'être mélangé avec du nitrate d'argent au niveau d'une connexion en T. La solution obtenue est à son tour mélangée avec du luminol. Le tout est enfin mélangé avec une solution d'or colloïdal. L'émission de lumière est mesurée par un tube photomultiplicateur.

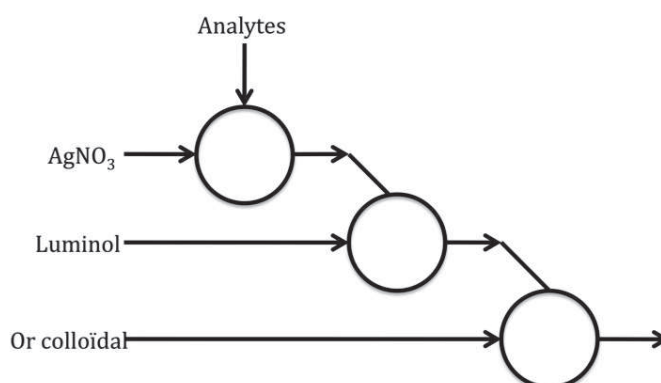


Figure 11: Schéma de principe d'une détection par chimiluminescence telle qu'utilisée par Li et al. (Li, N. 2009)

Le principe à la base de cette chimiluminescence est que les particules d'or colloïdal constituent des centres de nucléation pour la catalyse de la réduction de AgNO_3 en Ag par le luminol. Ceci donne des nanoparticules de type cœur-coquille Au/Ag. Dans le même temps le luminol est oxydé en luminol radicalaire qui va réagir avec l'oxygène dissous et émettre de la lumière. Les composés réducteurs tels que les catécholamines et indolamines peuvent inhiber la chimiluminescence et l'émission de lumière.

Les limites de détection de 2,5 ng/mL (soit 12,5 nmol/L) pour le 5 HIAA et 25 ng/mL (soit 125 nmol/L) pour le HVA sont du même ordre de grandeur que celle présentées dans d'autres publications sur l'usage de chimiluminescence avec réaction en ligne. Elles sont en revanche

plus élevées que celles obtenues par transformation pré-colonne pour le 5 HIAA (Yakabe, T. 2000). Bien que les LOD de cette méthode permettent également de détecter la dopamine, la sérotonine, la norépinephrine, l'épinephrine et le DOPAC, seul le HVA et le 5 HIAA furent retrouvées dans les échantillons analysés.

4.2.2.4. Dosage par GC-MS

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a déjà été utilisée pour le dosage des acides organiques dans les urines (Goodman, S. 1980). Le HVA et le 5 HIAA en tant qu'acides organiques peuvent être quantifiés dans les urines dans le but de diagnostiquer certaines tumeurs telles que le neuroblastome (Sawada, B.T. 1992 ; Mathieu, P. 1996).

Récemment une méthode d'analyse par GC-MS/MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem) des amines biogènes et de leurs métabolites acides dont le HVA, le MHPG et le 5 HIAA dans du tissu cérébral de souris a été proposée (Hong, JY. 2013). Une des particularités de cet article est de présenter deux méthodes d'analyses différentes pour les amines biogènes (dopamine, norépinephrine, épinephrine, sérotonine, normétanéphrine) et pour les métabolites acides (HVA, VMA, MHPG, DOPAC et 5 HIAA) de 12 minutes chacune. La procédure de traitement d'échantillon implique également un passage sur cartouche de préparation de l'échantillon en mode mixte (*Mixed Cation Exchange*). En revanche, les limites de quantification sont assez basses : 0,74 ng/mL (3,7 nmol/L) pour le 5 HIAA ; 1,73 ng/mL (8,7 nmol/L) pour le HVA et 1,05 ng/mL (5,3 nmol/L) pour le MHPG. L'inconvénient majeur de cette méthode est d'avoir une étape de préparation d'échantillon relativement longue associée à deux étapes d'analyse par GC-MS/MS.

4.2.2.5. Dosage par techniques ELISA

La société IBL international commercialise des kits ELISA pour le dosage du HVA et du 5 HIAA dans les urines (IBL, HVA ELISA. RE59191 ; 5 HIAA ELISA. RE59131). Encore une fois le but ici est de diagnostiquer des tumeurs sécrétrices de HVA ou de 5 HIAA et non pas les déficits centraux en dopamine ou en sérotonine. D'après les notices d'utilisation, le test pour le HVA a une limite de détection de 0,035 µg/mL (soit 175 nmol/L) avec aucune réactivité croisée pour des composés analogues tel que la dopamine. Le test pour le 5 HIAA, quant à lui, a une limite de détection de 0,09 mg/L (soit 450 nmol/L) mais une réactivité

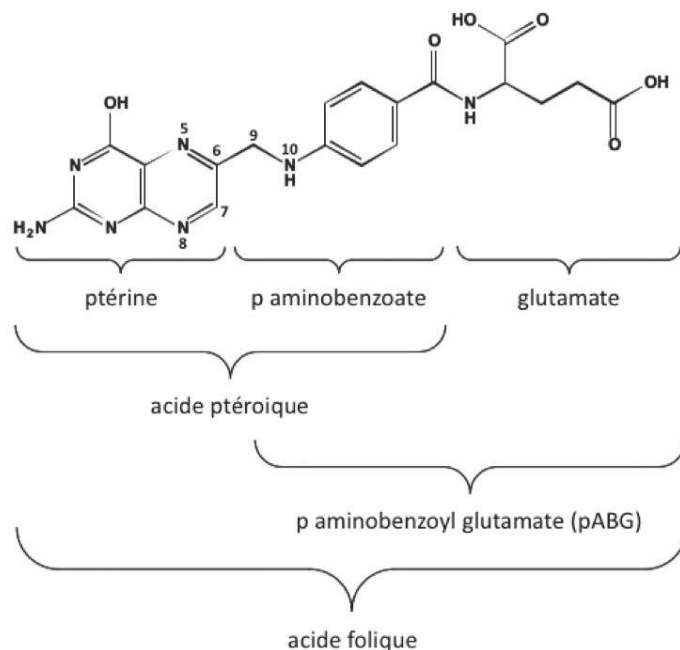
croisée importante avec la sérotonine, 9,5%, et d'autres composés (acide indole 3 pyruvique, mélatonine) à hauteur de 1%. Quoiqu'il en soit, ce test a été utilisé pour le dosage du 5 HIAA dans le LCR (Hou, C. 2006). Cependant, aucun résultat n'a été rapporté, concernant la concentration en 5 HIAA chez les patients étudiés.

4.3. Folates

Le terme « folates » regroupe tous les dérivés de l'acide folique. Ces dérivés sont nombreux et omniprésents dans le métabolisme des êtres vivants.

4.3.1. Propriété physico chimiques des folates

L'acide folique est constitué d'un noyau ptérine, d'un p-aminobenzoate et d'une unité glutamate. Sur cette structure de base on peut retrouver différentes substitutions et hydrogénations particulièrement sur les positions 5 à 10 (figure 12).



Position	5	6	7	8	10
Acide folique	-	-	-	-	-
Dihydrofolate DHF	-	-	-H	-H	-
Tetrahydrofolate THF	-H	-H	-H	-H	-
5 formyl THF 5FTHF Acide folinique	-CHO	-H	-H	-H	-
5 methyl THF 5MTHF	-CH ₃	-H	-H	-H	-
5,10 méthylène THF	-CH ₂ (avec 10)	-H	-H	-H	-CH ₂ (avec 5)
5,10 méthényle THF	-CH (avec 10)	-H	-H	-H	-CH (avec 5)
10 formyl THF	-H	-H	-H	-H	-CHO

Figure 12: Structure de l'acide folique et substitution retrouvée dans les autres folates
 Dans le cas du 5,10 méthylèneTHF et du 5,10 méthényleTHF, le groupement méthylène ou méthényle relie les atomes d'azote en position 5 et 10.

Comme décrit dans les paragraphes précédents, le plus important au niveau biologique parmi ces dérivés est sans doute le 5MTHF.

Une des propriétés communes de tous ces dérivés de l'acide folique est qu'ils sont électro-actifs. En revanche, le potentiel optimal de détection varie avec le composé (Lucock, MD. 1995). Un autre avantage analytique de ces composés réside dans leur propriété de fluorescence (Quinlivan, E.P. 2006). Ces propriétés électrochimiques et de fluorescence constituent ainsi un atout pour le développement de méthodes d'analyses.

4.3.2. Méthodes de dosages des folates

Les folates sont depuis longtemps l'objet de développements analytiques dans diverses matrices. Cet engouement a été alimenté par le besoin de certains pays ayant choisi de compléter des aliments en acide folique, de quantifier les différents vitamères du folate dans des matrices alimentaires (bière, pain, ...) ou biologiques (serum, plasma, LCR). Suivant le type de détection couplée à la chromatographie liquide on peut distinguer plusieurs méthodes de dosage des folates.

4.3.2.1. Dosage par LC-UV

La détection à l'aide d'un détecteur UV est toujours très utilisée en couplage avec la chromatographie en phase liquide (Lucock, MD 1995 ; Poo-Prieto, R. 2011). Dans la première publication il s'agissait avant tout de comparer différents modes de détection, dont la détection par absorbance UV. Malheureusement ce mode de détection est dit « non réaliste » pour quantifier le 5MTHF même si la limite de détection est de 1,7 ng sur la colonne. La publication la plus récente employant la détection UV (Poo-Rieto, R. 2011) présente une méthode d'analyse de plusieurs folates dans la bière. Les chromatogrammes présentés dans l'article montrent qu'il est difficile de séparer tous les folates sans co-élution et que les interférences liées à la matrice sont nombreuses.

La détection UV, bien que faisable et nécessitant un matériel peu coûteux, ne semble pas être la méthode de détection la plus adaptée au vu de sa faible sensibilité et spécificité.

4.3.2.2. Dosage par LC-ECD

Les dérivés de l'acide folique étant électro-actifs, le couplage de la chromatographie liquide avec une détection électrochimique paraît envisageable.

Comparées aux méthodes couplées à la détection UV, les méthodes par détection électrochimique présentent des limites de détection pour le 5MTHF, mais également pour le 5FTHF et le THF nettement inférieures. Toutefois, les potentiels d'oxydation nécessaires sont relativement élevés, ce qui génère de nombreuses interférences (Lucock, MD. 1995). Néanmoins, deux méthodes de dosage dans le sérum ou le plasma avec une détection électrochimique ont été proposées (Marszatt, ML. 2009 ; Opladent, T. 2006). Ces méthodes sont focalisées sur le dosage du 5MTHF, mais d'autres composés ont pu être détectés, dont le 5FTHF et le THF. Les deux méthodes sont comparables en terme de séparation (phase mobile et phase stationnaire, volume d'injection et temps d'analyse). Les limites de détection et la gamme de linéarité sont également similaires. Cependant, l'efficacité de la séparation est insuffisante et l'étape de traitement de l'échantillon par extraction sur phase solide (SPE) est chronophage.

Pour conclure, la détection électrochimique est envisageable et déjà utilisée pour le dosage du 5MTHF dans le plasma et le sérum dans des situations physiologiques, mais elle n'est pas simple et elle reste peu spécifique en raison des potentiels d'oxydation nécessaires.

4.3.2.3. Dosage par fluorescence

Les folates sont naturellement fluorescents et la détection fluorimétrique simple à mettre en œuvre et spécifique. Aussi, la comparaison des différents modes de détection (Lucock, MD. 1995, Quinlivan, EP. 2006) a montré que le rendement de fluorescence est plus grand pour le 5MTHF par rapport aux autres folates (5FTHF, THF...). Les limites de détection du 5MTHF sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec une détection électrochimique, mais la fluorescence est plus spécifique.

Les méthodes développées pour doser le 5MTHF dans le sang ou le LCR (Chladek, J. 2000 ; Luo, W. 2002) possèdent un certain nombre de points communs. En particulier, les temps d'analyses (entre 10 et 16 minutes) et les limites de détection sont du même ordre de grandeur (de 1,7 nmol/L à 12 nmol/L). Une de ces méthodes utilise un étalon interne, le p-aminoacetaphenone, certainement du fait de l'utilisation d'une étape d'extraction sur phase solide sur cartouche pour le traitement de l'échantillon (Chladek, J. 2000).

Des méthodes similaires, appliquées au dosage du 5MTHF dans le LCR, ont permis de déterminer les valeurs normales fréquentes en Espagne et aux Pays-Bas (Ormazabal, A. 2006 ; Verbeek, MM. 2008).

4.3.2.4. Dosage par spectrométrie de masse

A l'inverse de la détection par fluorescence qui était utilisée pour détecter presque exclusivement le 5MTHF, la spectrométrie de masse a permis d'établir des profils de distribution des différentes formes de folates dans diverses matrices biologiques ou alimentaires.

Parmi les articles publiés ces dix dernières années sur le dosage du 5MTHF par LC-MS, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem au moyen d'un triple quadrupole est très largement répandue. Les articles dont les résultats ont été obtenus sur des simples quadrupoles sont en revanche beaucoup plus rares (Nelson, BC. 2001 ; Nelson, BC. 2004). Dans ces deux études une méthode de type LC-MS avec un simple quadrupole a été mise au point, et même comparée à une méthode de type LC-MS/MS avec un triple quadrupole. Si les deux méthodes séparatives sont similaires avec des résolutions semblables et la possibilité de séparer en 15 minutes jusqu'à 6 dérivés de folates (5MTHF, 5FTHF, THF, DHF, acide folique et pABG), la différence réside dans les limites de détection et de quantification. En effet elles sont de l'ordre de dix fois plus faibles dans le cas de la méthode LC-MS/MS par rapport à la LC-MS (Nelson, BC. 2004). Cela n'empêche pas les auteurs de doser le 5MTHF dans le plasma en utilisant un simple quadrupole.

Les dosages réalisés ne concernent pas seulement le 5MTHF, d'autres formes de folates sont dosées simultanément. C'est particulièrement le cas du 5FTHF et de l'acide folique. Des produits de dégradation peuvent aussi faire l'objet d'un dosage, par exemple le pABG (p-aminobenzoyl glutamate) qui correspond à l'acide folique débarrassé du noyau ptérine.

Le pABG se révèle être le seul composé quantifié directement dans une étude de 2008 (Hannisdal, R. 2008). Le but de cette étude était de mettre au point une méthode de dégradation des folates afin de les quantifier en équivalent pABG. Cela a permis de comparer les performances de cette méthode avec une méthode classique basée sur une analyse microbiologique. Même si la méthode d'analyse mise au point est bien corrélée avec la méthode classique, l'intérêt d'utiliser un tel appareillage pour doser indirectement des folates reste limité. De plus dans le même article, la faisabilité du dosage du 5MTHF par LC-MS/MS est démontrée puisque la limite de détection est de 0,1 nmol/L.

Plus récemment, la même équipe a publié une étude sur la mise au point d'une méthode d'analyse du 5MTHF, 5FTHF, acide folique et pABG, entre autres, par LC-MS/MS (Hannisdal, R. 2009). Il s'agit là d'une méthode rapide (4,8 minutes d'analyse) permettant un dosage simultané avec des limites de quantification inférieures ou égales à 1,03 nmol/L pour quatre formes de folates et deux catabolites. L'application à 168 sérums de patients norvégiens a prouvé la faisabilité de la méthode et son haut débit d'analyse (192 échantillons par 24h). Un des résultats majeurs est d'avoir trouvé que le 5MTHF constitue 85,8% des folates présents dans le sérum.

Une autre étude (Pfeiffer, CM. 2004) a comparé aussi une méthode LC-MS/MS avec une méthode de type essai microbiologique et une méthode de dosage immuno-radiologique « competitive protein binding radioassay ». L'avantage de la LC-MS/MS par rapport à ces méthodes est de renseigner sur la distribution des différentes formes de folates (5MTHF, acide folique, 5FTHF) et pas seulement sur la quantité totale de folates. Bien que le temps d'analyse ne soit que de 10 minutes, l'étape de préparation de l'échantillon par élution sur cartouche SPE demande 50% de temps supplémentaire, ce qui n'est pas négligeable. Les limites de quantification (inférieures à 0,3 nmol/L) pour les trois composés et la bonne corrélation avec les méthodes comparées prouvent la faisabilité de la méthode et tout l'intérêt de la LC-MS/MS pour quantifier simultanément les différentes formes de folates.

Beaucoup d'autres méthodes par LC-MS/MS existent pour doser au moins le 5MTHF dans le sang (Nelson, BC. 2005 ; Kirsch, SH. 2012 ; Van Haandel, L. 2012 ; Wang, X. 2014), les matrices alimentaires (Chandra-Hioe, MV. 2011 ; Ringling, C. 2013 ; Van Daele, J. 2014) ou les tissus tumoraux (Liu, J. 2011 ; Odin, E. 2012). Il est difficile de les différencier par leurs performances et caractéristiques. Les phases stationnaires employées si elles ne sont pas toujours identiques sont très similaires (de type C18 ou C8). Les analyses s'effectuent en mode gradient en moins de 9 minutes excepté une dont la durée est de 32 minutes. Cela peut être dû à la complexité des matrices alimentaires étudiées. Les phases mobiles sont composées d'un tampon formiate ou acétate et d'une phase organique composée souvent d'acétonitrile et parfois de méthanol. Les volumes d'injection varient peu entre 5 et 40 µL, et le plus souvent de 10 µL. Les limites de quantification, ou de détection sont très souvent inférieures à 3 nmol/L dans les fluides biologiques, bien qu'il soit plus difficile de les apprécier dans les matrices alimentaires ou biologiques à l'état solide (entre 10 et 200 ng/g pour le 5MTHF). En revanche les étapes de traitement de l'échantillon sont souvent très différentes. L'utilisation d'un traitement sur cartouche SPE n'est pas systématique, seule une partie des

méthodes nécessitait une telle étape (Pfeiffer, CM. 2004 ; Nelson, BC. 2005 ; Liu, J. 2011 ; Chandra-Hioe, MV. 2011 ; Kirsch, SH. 2012 ; Ringling, C. 2013).

Enfin la LC-MS/MS peut également être utilisée pour l'étude des folates contenant plusieurs unités glutamates (polyglutamates) (Van Haandel, L. 2012). En effet sur la structure de base de l'acide folique plusieurs restes glutamyls peuvent se condenser pour obtenir un folate polyglutamate. L'intérêt dans cet article était d'étudier le contenu en folate mono et polyglutamate des érythrocytes. Pour cela trois méthodes LC-MS/MS ont été mises au point. Une pour déterminer les folates polyglutamates dans les érythrocytes, une pour déterminer les folates monoglutamates dans le sang total et une autre pour le faire dans le plasma. Pour ce qui est de leurs méthodes de dosage des folates monoglutamates, elles sont semblables dans leur caractéristique et performance aux méthodes évoquées précédemment avec un temps d'analyse de 3,7 minutes et une limite de quantification de 0,5 ou 1 nmol/L suivant que l'on soit dans le plasma ou le sang total.

Pour conclure, la LC-MS/MS est bien adaptée pour le dosage simultané de plusieurs formes de folates. A l'inverse de l'électrochimie ou de la fluorescence elle ne souffre presque pas de différence entre les folates en terme de facteur de réponse.

5. Valeurs de référence dans le LCR

Les valeurs normales fréquentes ou valeurs de référence des métabolites et cofacteurs dans le LCR, chez un individu sain sont, pour des raisons évidentes, hors d'atteinte. L'indication d'une ponction lombaire (PL) reste réservée aux individus présentant un trouble neurologique. Les seules valeurs pouvant être considérées comme normales, en ce qui concerne les amines biogènes, sont celles déterminées dans des résidus d'analyse de LCR, prélevés chez des individus ne présentant aucun déficit enzymatique avéré, relatif au métabolisme des bioamines.

Les métabolismes des ptérines et des amines biogènes étant intimement liés, la plupart des auteurs ont étudié et présenté simultanément les résultats relatifs à ces composés. Les études portant sur les valeurs de référence du 5MTHF dans le LCR sont plus rares, ce composé ayant été le plus souvent quantifié dans le sang. De plus le métabolisme du 5MTHF n'est lié que de manière indirecte à celui des amines biogènes et des ptérines.

5.1. Valeurs de référence des amines biogènes et ptérines dans le LCR

Les amines biogènes les plus importantes pour le diagnostic des déficits primaires en dopamine et sérotonine sont le HVA et le 5 HIAA. Les premières valeurs « normales » de ces deux métabolites dans le LCR ont été déterminées depuis 1993 (Hyland, K. 1993 ; Komori, H. 1999 ; Ormazabal, A. 2005).

En ce qui concerne les ptérines, d'un point de vue biologique les formes réduites (BH4, BH2, NH2) sont les plus pertinentes à étudier. Mais elles restent difficiles à analyser, notamment en raison de leur instabilité et de leur faible rendement de fluorescence. C'est pourquoi on trouve également des valeurs de référence pour la bioptérine et la néoptérine totale, obtenues après oxydation de l'échantillon (Komori, H. 1999 ; Ormazabal, A. 2005).

En 1993, Hyland et al. (Hyland, K. 1993) présentèrent les résultats de l'analyse du LCR chez une population pédiatrique de référence de 73 individus. Les analyses portaient sur le dosage du HVA et du 5 HIAA, ainsi que de la BH4, la BH2 et la N. Les formes réduites de la bioptérine (BH4 et BH2) et la N étaient dosées directement suivant une méthode déjà décrite à l'époque (Howells, DW. 1986). Le HVA et le 5 HIAA étaient dosés par une seconde analyse chromatographique. Les résultats ont montré une corrélation des concentrations en HVA, 5 HIAA et BH4 avec l'âge des patients, ce qui n'est pas le cas pour la BH2 et la N. Par conséquent les valeurs de référence ont été données par tranches d'âge pour HVA, 5 HIAA et BH4 (tableau 3).

Un autre résultat d'intérêt est la relation très forte et quasi linéaire existant entre les concentrations en HVA et en 5 HIAA chez les patients. D'autres corrélations entre les composés étudiés sont également observées, sans être utilisées à des fins de diagnostics (BH4 et 5 HIAA, BH4 et HVA, BH4 et BH2). Ces différentes relations sont aisément expliquées par les liens métaboliques qui relient ces composés. La BH4 étant un cofacteur commun à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine, son lien avec le HVA et le 5 HIAA n'est pas surprenant. De la même façon, la BH2 étant un produit de dégradation non enzymatique de la BH4 il n'y a rien d'étonnant à trouver un rapport entre les concentrations de BH4 et BH2 chez les patients. Ce qui interpelle est le fait que la concentration en BH2 ne varie pas avec l'âge des patients contrairement à la BH4 et ceci alors même que les concentrations en BH2 et BH4 sont corrélées.

De façon similaire on trouve dans une autre étude (Komori, H. 1999) des résultats concernant le HVA et le 5 HIAA ainsi que la bioptérine dite totale, sous forme oxydée et sous forme réduite. Parmi les 56 patients de l'étude, plus de la moitié (31) sont âgés de 21 à 80 ans.

D'après la méthode de dosage de la biophtérine, similaire à la méthode de Fukushima (Fukushima, T. 1980), on peut interpréter la biophtérine totale comme la somme de BH₄, BH₂ et B obtenu par oxydation acide de l'échantillon. La forme oxydée de B, dosée après oxydation alcaline correspond à la somme de BH₂ et B. Enfin la B sous forme réduite qui est la différence entre la B totale et la B oxydée, correspondrait à la BH₄.

Les auteurs ont trouvé une forte corrélation entre les niveaux de concentrations en chacun des métabolites et l'âge des patients à l'exception de la forme oxydée de B. Une forte corrélation entre HVA, 5 HIAA et BH₄ (forme réduite de B) a été observée chez tous les patients. Un des inconvénients de cette étude est le manque de données sur les individus de moins de 20 ans puisqu'ils représentent moins de la moitié des patients étudiés.

Plus récemment une équipe espagnole a publié une étude similaire (Ormazabal, A. 2005). Deux différences majeures sont à noter. En premier lieu, le HVA et le 5 HIAA ne sont pas les seules amines biogènes analysées, la 3OMD, le MHPG et le 5OHT le sont également ; ce qui ajoute plus d'informations sur le profil métabolique des patients. Dans un second temps, seules la néoptérine et la biophtérine totale résultant d'une oxydation acide du LCR sont quantifiées. Il y a donc à la fois plus d'information sur le métabolisme de la dopamine et de la sérotonine ; et moins d'information sur le métabolisme de la BH₄. De nombreuses corrélations entre les différents composés sont observées en plus de celles observées avec l'âge. Le HVA et le 5 HIAA sont corrélés et le rapport HVA / 5 HIAA est lui aussi corrélé avec l'âge des patients. Le HVA et le MHPG, le HVA et la B, le 5 HIAA et la B ainsi que la B et la N sont également corrélés entre eux. Parmi ces corrélations seul le rapport HVA / MHPG fut étudié systématiquement mais ne montrait aucune corrélation avec l'âge des patients. Là encore, les patients (127) ont été répartis par tranche d'âge afin de déterminer les valeurs de référence. En revanche si on n'observe pas de différence majeures dans les valeurs de référence données dans les trois articles cités précédemment, on peut voir que la répartition par tranche d'âge n'est jamais exactement la même, particulièrement pour les patients âgés de moins d'un an. Ces différences pourraient être expliquées par le faible nombre de patients dans ces tranches d'âge (entre 3 et 22) ce qui limite la pertinence des informations statistiques obtenues. Néanmoins, une différence entre les patients due à leur pays d'origine n'est pas à exclure entre la Japon, l'Espagne ou le Royaume-Uni.

Tableau 3 : Valeurs de référence du HVA, 5 HIAA et BH4 ou B totale dans le LCR.

Les âges sont exprimés en années et les concentrations en mmol/L.

Hyland, K. ^a						Komori, H. ^b						Ormazabal, A. ^a			
Âges	HVA	5 HIAA	BH4	Âges	HVA	5 HIAA	BH4	Âges	HVA	5 HIAA	BH4	Âges	HVA	5 HIAA	B
0 – 0,33 (n = 12)	714 (205)	417 (132)	67 (21)	0 – 1 (n = 3)	810	377	52	0 – 0,08 (n = 11)	955 (236)	766 (197)	39 (13)				
0,34 – 0,66 (n = 8)	587 (203)	271 (154)	37 (13)	1 – 5 (n = 8)	697 – 935	341 – 431	43 – 57	0,08 – 0,42 (n = 22)	658 – 1434	428 – 1122	22 – 70				
0,67 – 1,0 (n = 12)	362 – 955	63 – 503	23 – 55	6 – 10 (n = 8)	424	186	28		757 (231)	514 (231)	30 (9)				
1,1 – 5,0 (n = 31)	508 (196)	250 (98)	38 (11)	11 – 20 (n = 6)	271 – 647	107 – 375	21 – 37	0,5 – 2 (n = 38)	354 – 1328	217 – 1142	12 – 44				
5,1 – 20 (n = 10)	176 – 851	68 – 451	19 – 56	21 – 80 (n = 31)	386	132	29		579 (131)	305 (78)	23 (11)				
	465 (181)	185 (71)	33 (11)		193 – 490	59 – 197	10 – 41		344 – 906	170 – 490	8 – 54				
	154 – 867	89 – 367	8 – 57		205	102	18	3 – 6 (n = 24)	478 (90)	201 (53)	24 (12)				
	281 (158)	98 (47)	23 (10)		94 – 349	56 – 155	13 – 34	7 – 10 (n = 20)	383 (174)	184 (98)	23 (17)				
	71 – 565	58 – 220	9 – 40		155	75	15	11 – 16 (n = 12)	202 – 596	87 – 366	8 – 68				
					43 – 405	21 – 210	4 – 33		269 (73)	121 (42)	22 (9)				
									156 – 410	63 – 185	14 – 36				

^a moyenne (écart type) et minimum - maximum
^b moyenne et minimum - maximum

5.2. Valeurs de référence du 5MTHF dans le LCR

Afin de dépister des déficits cérébraux en folates (CFD), il faut doser le 5MTHF dans le LCR et déterminer les valeurs de référence en dessous desquelles le déficit est avéré. Le CFD étant un syndrome neurométabolique se déclarant en général durant l'enfance et parfois pendant l'adolescence il est important que les valeurs de référence soient établies au sein d'une population pédiatrique.

Après avoir publié en 2005 des valeurs de référence pour les ptérines et les amines biogènes (Ormazabal, A. 2005), la même équipe espagnole a publié des valeurs de référence du 5MTHF dans le LCR d'une population pédiatrique (Ormazabal, A. 2006).

Cette étude fut réalisée sur 165 patients âgés de 1 jour à 22 ans. Parmi ces 165 patients, 63 furent définis comme population contrôle, 43 avaient une concentration en 5MTHF plus basse que la normale et 59 étaient dans la norme établie. On peut noter que les auteurs ont trouvé une corrélation entre la concentration en 5MTHF et l'âge des patients. Cela les a amenés à stratifier les valeurs de référence suivant différentes tranches d'âge.

En 2008 une équipe néerlandaise a de son côté étudié les paramètres techniques et biochimiques affectant la concentration en 5MTHF dans le LCR (Verbeek, MM. 2008). Dans cette étude, le 5MTHF a été mesuré dans le LCR de 89 patients dont l'âge moyen était de 5,3 ans. Un des intérêts de cette étude est d'avoir mesuré le HVA, le 5 HIAA et la B totale (après oxydation acide du LCR) en plus du 5MTHF, afin de rechercher une éventuelle corrélation entre ces différents composés. Les auteurs ont pu observer une corrélation entre l'âge des patients et la concentration en 5MTHF. Encore une fois, cela a conduit les auteurs à stratifier les patients suivant plusieurs tranches d'âges. Par ailleurs une corrélation a été observée entre le 5 HIAA et le 5MTHF, le HVA et le 5MTHF, et la B totale et le 5MTHF. La seule explication avancée pour expliquer ces corrélations est l'implication de certaines enzymes propres au métabolisme du 5MTHF (la MTHFR selon les auteurs, et la DHFR) dans le métabolisme de la BH₄.

Dans une étude publiée en 2011 (Mangold, S. 2011), les LCR de 103 patients atteints de CFD ont été analysés. Au préalable, les auteurs avaient déterminé des valeurs de référence du 5MTHF classés selon l'âge. Peu de renseignements sont donnés sur cette population contrôle, mais des indications, pour classer les cas de CFD (faible ou très faible concentration en 5MTHF), sont données.

Plus récemment des britanniques ont étudié la corrélation possible entre le 5MTHF et l'acide ascorbique dans le LCR (Aylett, SB. 2013). Pour ce faire, ils ont également déterminé des valeurs de référence en fonction de l'âge pour le 5MTHF. Une corrélation entre le 5MTHF et l'acide ascorbique a finalement été observée. Peu d'autres renseignements sont donnés sur les valeurs de référence du 5MTHF.

Tableau 4: Valeurs de référence du 5MTHF dans le LCR.
Les âges sont exprimés en années et les concentrations en nmol/L

Ormazabal, A. ^a		Verbeek, MM. ^b		Mangold, S. ^c		Aylett, SB. ^d	
Ages	Concentration	Ages	Concentration	Ages	Concentration	Ages	Concentration
0 – 1 (n = 12)	103 (20,4) 63 – 129	0 – 2 (n = 29)	109 59 – 217	0 – 1,99	64 – 182	0 – 2	72 – 305
2 – 3 (n = 32)	72 (19,1) 44 – 122	2 – 5 (n = 35)	74 43 – 159	2 – 4,99	63 – 111	2 – 5	52 – 178
4 – 18 (n = 19)	56 (10,7) 42 – 81	5 – 19 (n = 35)	65 24 – 128	plus de 5	41 – 117	5 – 10	72 – 172
						plus de 10	46 – 160

^a moyenne (écart type) et minimum - maximum

^b médiane et minimum - maximum

^c moyenne $\pm$ 2 x écart type

^d sans renseignements

6. Conclusion et objectifs

L'ensemble de ces données bibliographiques illustre l'intérêt de l'analyse chimique du LCR, notamment le dosage des métabolites de la dopamine et de la sérotonine ainsi que les ptérines et les folates, dans le diagnostic et le suivi thérapeutique des troubles de la neurotransmission. L'analyse critique des méthodes actuelles de dosage de ces substances a montré une grande diversité dans les techniques et les méthodes proposées. Néanmoins, il ressort de cette étude un certain nombre de points qui illustrent les difficultés liées à ces types de dosages et donc à la difficulté et à la lourdeur du diagnostic de ces affections.

En premier lieu, l'exploration de l'ensemble de ces substances nécessite le développement d'au minimum trois étapes analytiques, comportant chacune une étape spécifique de traitement de l'échantillon. Ainsi, la plupart des auteurs procèdent d'abord par l'analyse

quantitative des métabolites de la dopamine et de la sérotonine, pour doser ensuite les ptérines puis le 5MTHF.

Si le dosage des métabolites de la dopamine et de la sérotonine ne pose pas de problèmes particuliers, il n'en est pas de même pour les ptérines.

En ce qui concerne le dosage du HVA et du 5 HIAA, la chromatographie liquide couplée à la détection électrochimique semble faire l'unanimité. En effet, les études comparatives avec la LC-MS/MS montrent que la LC-ECD reste la méthode la plus sensible pour ce type de substances. La quantification des ptérines réduites dans le LCR reste plus délicate. Si la détection par fluorescence fait l'unanimité, en raison de sa spécificité et sa sensibilité, le dosage des formes réduites, qui ne sont pas fluorescentes à l'état natif, requiert deux étapes de préparation de l'échantillon suivie de deux étapes d'analyse quantitative par LC-Fluo. Au total, le diagnostic précis d'un trouble de la neurotransmission nécessitera donc trois étapes de chromatographie liquide précédées chacune par une étape de préparation de l'échantillon appropriée. L'analyse du 5MTHF nécessitera alors une autre étape chromatographique couplée soit à la détection par fluorescence, soit à une détection par spectrométrie de masse.

Certains auteurs proposent de doser par LC-MS/MS, le HVA et le 5 HIAA ainsi que les folates, en une seule étape. Les ptérines sont ensuite dosées par LC-Fluo en deux étapes.

Enfin, aucune de ces méthodes ne permet de doser directement la BH₄, cofacteur essentiel intervenant dans les réactions d'hydroxylation. Une méthode de dosage directe de la BH₄ par LC couplée à l'électro-réduction après électro-oxydation a bien été décrite depuis 1993, mais sa spécificité reste douteuse et sa mise en œuvre n'est pas simple.

L'objectif de ce travail a été de développer des méthodes simples et peu coûteuses de diagnostic rapide des troubles neurologiques liés à un défaut de la neurotransmission. Notre approche a reposé sur deux principes analytiques simples. Le premier s'appuie sur l'utilisation de méthodes modernes de chromatographie liquide ultra-rapide et le second repose sur le fait que l'ensemble des substances à analyser, dans ce cadre, sont électro-actives et/ou fluorescentes.

**CHAPITRE 2 : DETERMINATION SIMULTANEE DE L'ENSEMBLE DES
FORMES DE BIOPTERINES ET NEOPTERINES DANS LE LCR**

Les méthodes actuelles de dosage des p trines reposent essentiellement sur l'oxydation chimique des formes réduites non fluorescentes en formes oxydées fluorescentes. Ces méthodes ont l'avantage d'être sensibles et spécifiques, mais elles présentent deux inconvénients majeurs :

- 1- Elles ne dosent pas directement la BH4
- 2- Elles nécessitent deux étapes chromatographiques, sinon trois, précédées chacune d'un protocole de préparation de l'échantillon particulier, pour doser l'ensemble des p trines d'intérêt.

Dans la mesure où la BH4, la BH2 et la NH2, non fluorescentes, peuvent être directement oxydées en biop terine et en n opt terine fluorescentes, nous avons décidé de développer une méthode de dosage par chromatographie liquide couplée à la détection fluorimétrique après oxydation coulométrique de l'effluent.

Cette méthode présente l'avantage de doser simultanément toutes ces formes de p trines, avec une simple filtration pour éliminer les protéines avant injection dans le chromatographe, comme étape de préparation de l'échantillon.

Ce travail a nécessité le développement d'une méthode de séparation par HPLC, capable de séparer les différentes formes des p trines d'intérêt diagnostic et l'étude systématique de tous les paramètres intervenant dans l'électro-oxydation de la BH4.

Enfin, ce travail nous a permis de proposer un mécanisme d'électro-oxydation de la BH4 qui explique la difficulté d'oxyder cette substance en ligne. Ce qui a probablement empêché nos prédécesseurs de proposer une telle méthode.

Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid

Pierre Guibal,[†] Nathalie Lévêque,[†] Diane Doummar,[‡] Nicolas Giraud,[§] Emmanuel Roze,^{||,⊥}
Diana Rodriguez,[‡] Rémy Couderc,[‡] Thierry Billette De Villemeur,[‡] and Fathi Moussa^{*,†,‡}

[†]LETIAM, GCAPS, EA 4041, IUT d'Orsay, Université Paris Sud 11, Plateau de Moulon. 91400 Orsay, France

[‡]Services de Neuropédiatrie et de Biochimie, Groupe Hospitalier Trousseau – Laroché – Guyon, 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France

[§]UMR CNRS 8182. ICMO: RMN en milieu orienté. UFR des Sciences, Université Paris Sud 11. Rue du Doyen Georges Poitou. 91400 Orsay, France

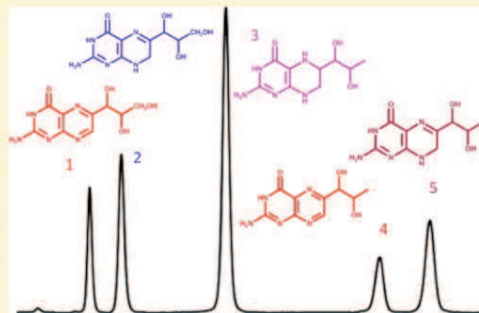
^{||}Department of Neurology, Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, 75013 Paris, France

[⊥]UMR S 952, INSERM, Paris 6 University, 75005 Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: In humans, genetic defects of the synthesis or regeneration of tetrahydrobiopterin (BH₄), an essential cofactor in hydroxylation reactions, are associated with severe neurological disorders. The diagnosis of these conditions relies on the determination of BH₄, dihydrobiopterin (BH₂), and dihydroneopterin (NH₂) in cerebrospinal fluid (CSF). As MS/MS is less sensitive than fluorescence detection (FD) for this purpose, the most widely used method since 1980 involves two HPLC runs including two differential off-line chemical oxidation procedures aiming to transform the reduced pterins into their fully oxidized fluorescent counterparts, biopterin (B) and neopterin (N). However, this tedious and time-consuming two-step indirect method underestimates BH₄, BH₂, and NH₂ concentrations. Direct quantification of BH₄ is essential for studying its metabolism and for monitoring the efficacy of BH₄ supplementation in patients with genetic defects. Here we describe a single step method to simultaneously measure BH₄, BH₂, B, NH₂, and N in CSF by HPLC coupled to FD after postcolumn coulometric oxidation. All target pterins were quantified in CSF with a small volume (100 μ L), and a single filtration step for sample preparation and analysis. As compared to the most widely used method in more than 100 CSF samples, this new assay is the easiest route for accurately determining in a single run BH₄, BH₂, and NH₂ in CSF in deficit situations as well as for monitoring the efficacy of the treatment.

KEYWORDS: Biopterin, neopterin, hydroxylases, cerebrospinal fluid, metabolism, neurologic disorders



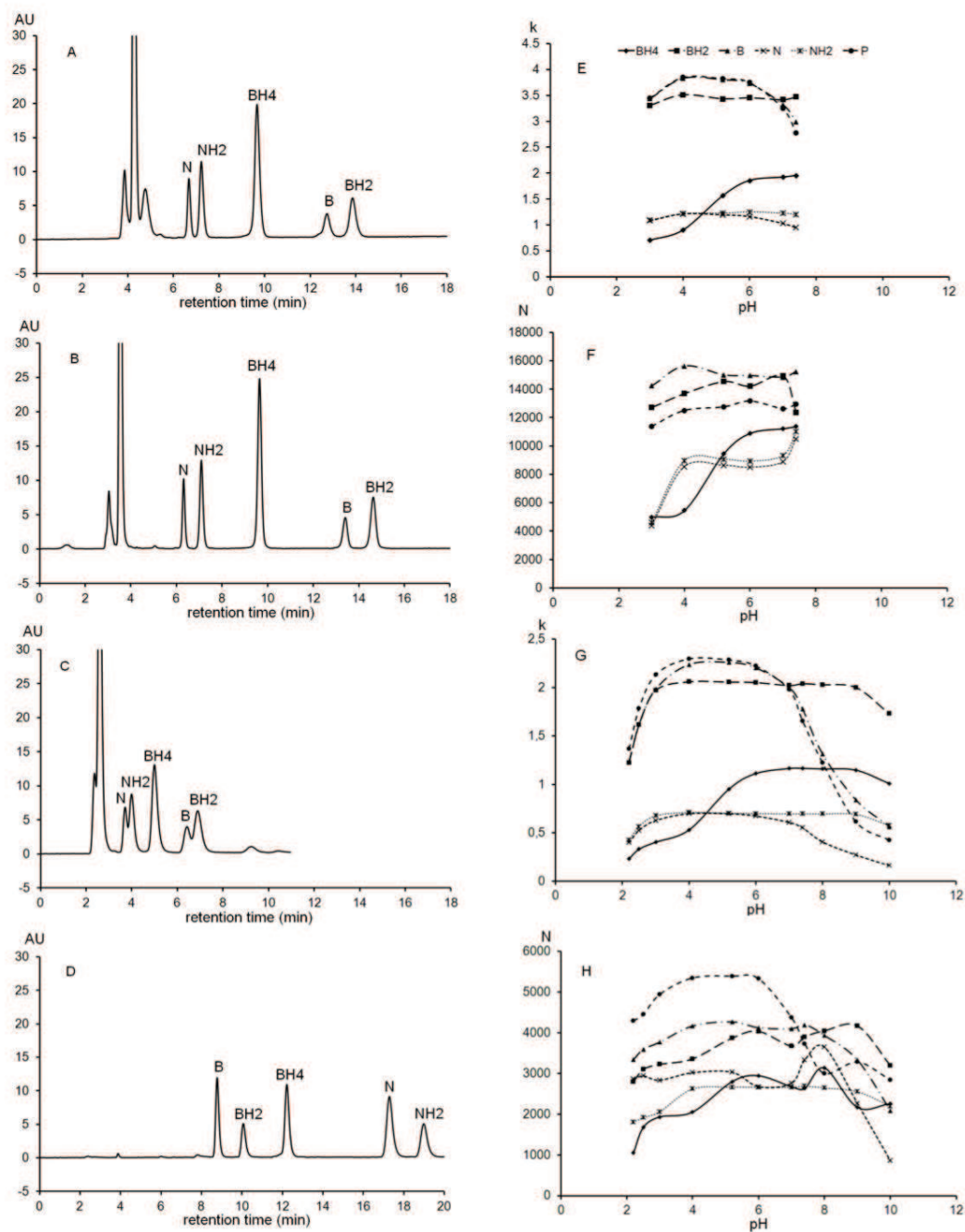


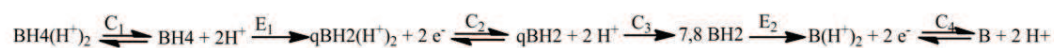
Figure S-2 (unpublished) :

Pterins separation as a function of stationary phase and mobile phase pH. (A) Eclipse XDB C18; (B, E, F) Atlantis dC18; (C, G, H) XTerra; (D) Zic-HILIC. Mobile phase: pH 7.4, 0.05 M ammonium citrate/methanol (97/3, v/v). (D) Mobile phase: pH 7.4, 0.2 M ammonium formate/acetonitrile (20/80, v/v). (A – H) Flow rate: 0.6 mL/min at 30°C. Detection 260 nm.

Hypothèse concernant le mécanisme d'électro-oxydation de la BH4

La figure 3 montre le rendement d'oxydation en fonction du pH des ptérines réduites. De hauts rendements d'oxydation (>75%) sont atteints pour la BH2 et la NH2 pour un pH compris entre 3 et 8. Un rendement d'environ 50% est atteint pour la BH4 seulement au delà de pH 7.

La figure 3C montre que le pKa apparent de la BH4 est aux alentours de 5, alors que le pKa apparent de la BH2 et de la NH2 est inférieur à 3. Donc à un pH inférieur à 6, plus de 90% des molécules de BH4 sont sous formes protonées et sont donc des espèces non oxydables. Ces résultats suggèrent que l'électro-oxydation de la BH4 suit un mécanisme C.E.C.C.E.C en six étapes :



La première étape est un équilibre chimique entre la BH4 et sa forme protonée. La première étape électrochimique (E₁) est l'électro-oxydation de la BH4 en la forme protonée de la qBH2 suivi par une rapide libération de H⁺ dans le milieu et une lente transformation concomitante de la qBH2 en 7,8 BH2. L'électro-oxydation de la 7,8 BH2 en B se fait ensuite selon un mécanisme électrochimique-chimique (E.C.). Ces résultats sont accords avec ceux précédemment publiés (Hoke, K.R. 2009).

A un pH supérieur à 7, toutes les étapes chimiques correspondant à une libération de H⁺ sont rapides d'après les valeurs de pKa apparent, alors que l'étape C₃ correspondant à la transformation de la qBH2 en 7,8 BH2 est plutôt lente ce qui explique le faible rendement d'électro-oxydation de la BH4 par rapport à ceux de la BH2 et de la NH2. Ces résultats sont en accords avec ceux publiés pour la transformation de la qBH2 en 7,8 BH2 (t_{1/2} = 1,3 min) (Hoke, K.R. 2009).

Pour résumer, ces données montrent clairement que l'électro-oxydation de la BH2 en B est rapide à un pH inférieur à 6, alors que l'électro-oxydation de la BH4 en BH2 est limitée par les premiers équilibres chimiques notamment C₁ et C₃.

CHAPITRE 3 : DIAGNOSTIC RAPIDE DES TROUBLES
DOPAMINERGIQUES ET SEROTONINERGIQUES

Les méthodes de diagnostic des troubles de synthèse de la dopamine et de la sérotonine nécessitaient au moins deux méthodes d'analyses : une pour le dosage des amines biogènes et une autre pour le dosage des biptérines et néoptérines. La nécessité de réaliser deux analyses chromatographiques par échantillon est un réel inconvénient.

La détermination de la concentration en BH4 dans le LCR n'est pas indispensable au dépistage de déficits en BH4. En effet, comme on a pu le voir dans le chapitre précédent, tout déficit en BH4 se traduit par une variation de la concentration en BH2 et/ou NH2 par rapport aux valeurs normales.

Notre objectif ici est de mettre au point une méthode de dosage simultanée des amines biogènes et des ptérines BH2, B, NH2 et N à l'exception de la BH4. Pour ce faire nous utiliserons un système inspiré de celui développé précédemment, c'est à dire que de la même façon l'effluent issu de la colonne subira une oxydation coulométrique avant une détection fluorimétrique. L'oxydation coulométrique se faisant au sein de la cellule électrochimique permettra de détecter les amines biogènes simultanément. Cette méthode a l'avantage de doser simultanément les amines biogènes (3OMD, 5OHT, MHPG, HIAA et HVA) par électrochimie et les ptérines (BH2, B, NH2 et N) par fluorescence.

Enfin, ce travail nous a permis d'étudier de façon systématique le profil métabolique du LCR de plus de 1400 patients afin d'en dégager des valeurs normales fréquentes de référence. Nous avons pu grâce à cette méthode atteindre l'objectif de diagnostiquer des déficits en dopamine et/ou sérotonine.

INTRODUCTION

Since the description of Segawa's syndrome, an expanding range of neurometabolic syndromes has been shown to be linked to disorders of synthesis, breakdown, and transport of dopamine and serotonin neurotransmitters (Hyland, K. 2007). Most currently known neurotransmitter disorders are characterized by a decreased synthesis of dopamine and serotonin (Table 1). This may be due to a defect in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin (BH4), the essential co-factor of the hydroxylases involved in the neurotransmitter biosynthesis, linked to the mutation of several enzymes including GTP cyclohydrolase (GTPCH), sepiapterin reductase (SR), and dihydropteridine reductase (DHPR) (Fig. 1). These disorders are characterized by a specific pattern of dihydroneopterin (NH2), tetrahydrobiopterin BH4, dihydrobiopterin (BH2), and sepiapterin in the cerebrospinal fluid (CSF) (Hyland, K. 2007) (Table 1).

Neurotransmitter disorders may be also due to mutation of tyrosine hydroxylase (TH) or aromatic aminoacid decarboxylase (AADC) (Fig. 1). In both cases the pterin pattern remains normal. While TH deficiency is characterized by a reduced CSF concentration of homovanillic acid (HVA) and/or the decrease of the HVA/5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) ratio, AADC deficiency is characterized by a decrease of both HVA and 5 HIAA concomitantly with an increase of ortho-methyl-di-hydroxy-phenylalanine (3 OMD) and hydroxyl-tryptophan (5 OHT) CSF concentrations (Table 1).

Finally, dopamine transport deficiency syndrome, a newly described neurometabolic disorder, affects dopamine transport to presynaptic neuron. Defective reuptake of dopamine is thought to lead to dopamine accumulation in the synapse. Increased CSF levels of HVA are due to catabolization of dopamine (Kurian, M.A. 2011).

Early diagnosis of neurotransmitter disorders is of importance notably because some of these deficits can be well treated (Allen, GFG. 2009). As shown in table 1, complete diagnosis of these conditions requires the determination of dopamine and serotonin metabolites (HVA, 3 OMD, MHPG, 5 OHT and HIAA) in the cerebrospinal fluid (CSF) and the corresponding pterin pattern, notably dihydro-neopterin (NH2) and dihydro-biopterin (BH2) (Kurian, MA. 2011; Hyland, K. 2008).

To our knowledge, current methods of neurotransmitter disorder diagnosis require at least two chromatographic steps of CSF analysis. The first one is devoted to the quantification of

dopamine and serotonin metabolites and the second one to the quantitation of pterins (Hyland, K. 2003, Guibal, P. 2014).

As dopamine and serotonin metabolites are oxidizable compounds, HPLC (high performance liquid chromatography) coupled to electrochemical detection techniques (HPLC-ECD) are commonly used to quantify them in CSF (Tsunoda, M. 2006; Koyama, E. 1988; Ormazabal, A. 2005; Zhang, W. 2005; Verbeek, MM. 2008; Hubbard, KE. 2010). Some methods involving MS detection have been recently published (Tareke, E. 2007; Manini, P. 2000). As MS methods are less sensitive than HPLC-ECD, they are only applied to quantify HVA and HIAA in CSF. They are not appropriate to accurately measure 5 OHT, MHPG, and 3 OMD, which exist at very low concentration in CSF, under normal conditions (Ormazabal, A. 2005). Here we describe a new method for single step rapid diagnosis of neurotransmitter disorders. Neurotransmitter metabolites (HVA, HIAA, 5 OHT, 3 OMD, and MHPG), and pterins of interest (BH2 and NH2) are determined in less than 10 minutes by Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to sequential electrochemical and fluorimetric detections. This method requiring only a single filtration step for sample preparation and analysis was applied to the analysis of a series of 1476 CSF samples from patients suffering several neurological symptoms. Several cases of neurotransmitter disorders including AADC, SR and TH deficiencies, and some deficits of secondary origins as well as intra cerebral immune activation process were successfully diagnosed.

METHODS

Chemicals and reagents.

All reagents were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) and were used without further purification.

Patient samples.

CSF samples were collected as previously described (Guibal, P. 2014) by lumbar puncture. Lumbar punctures were performed in several French hospitals as part of normal clinical management with the written informed consent of parents or legal representatives of each patient. This study was performed according to French public health regulations (*Code de la santé publique – Article L1121-3, modified by Law n°2011-2012, December 29 2011 – Article 5*). Samples were immediately frozen with liquid nitrogen and then stored at -80 °C

until analysis. Exclusion criteria were traumatic punctures, inadequate collection and preservation of the samples.

Collected CSF samples were divided in several groups as follows: group 1 includes CSF samples without neurotransmitter deficit collected from 931 young infants and children aged 1 day to 16 years (median 3.5 years) and 105 adults aged 16 to 80 years (median 23.4 years), group 2 includes CSF samples with abnormal metabolic profiles collected from 152 young patients (aged 1 day to 16 years, median 2.3 years) and 79 adults (aged 16 to 70 years, median 34.1 years) and group 3 includes CSF samples with elevated neopterin levels collected from 187 young patients (aged 1 day to 16 years, median 1.8 years) and 22 adults (aged 16 to 64 years, median 25.6 years).

Chromatographic conditions.

For UHPLC analysis a Waters ACQUITY UPLC system was used connected to an ESA Coulochem III electrochemical detector equipped with a coulometric cell model 6011 followed by an Acquity UPLC FLR detector. Biogenic amines and pterins were analyzed by RP-mode separation using an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m) column from Waters.

The mobile phase consisted of a mixture of citrate buffer (0.05 mol/L, pH 5.4) and methanol (97/3, v/v). Flow rate was 0.5 mL/min at 30°C. The injection volume was 50 μ L. For detection conditions, the coulometric cell 2 potential was set at + 600 mV, and the excitation and emission wavelengths were set at 350 nm and 450 nm, respectively.

Calibrators, quality control, and sample preparation.

Stock standard solutions were prepared by dissolving 400 μ M of B, N, BH₂, and NH₂ in 0.1M HCl.

HVA, HIAA, 3OMD, 5OHT and MHPG were prepared by dissolving 1mM in deionized water.

After rapid preparation, aliquots of the standard solutions were immediately frozen at – 80°C until use.

To plot the calibration curves, the standard solutions of N, NH₂, B and BH₂ were diluted to give a final concentration of 5, 12.5, 25, 50 and 100 nM of each pterin. HVA was diluted to a final concentration of 15, 75, 187.5, 375, 750 and 1500 nM. HIAA was diluted to a final concentration of 10, 50, 125, 250, 500 and 1000 nM. MHPG, 3OMD and 5OHT were diluted to a final concentration of 5, 25, 62.5, 125, 250 and 500 nM.

Analytical recovery and precision studies we performed on pooled CSF samples spiked with 3OMD, 5OHT, MHPG, HIAA, HVA, BH₂, B and NH₂ at three concentration

levels (low, medium, high). Aliquots of 200 μ L of pooled CSF (p-CSF) sample residues (n = 6) spiked with 5, 12.5 and 50 nM of each pterin; 75, 187.5 and 750 nM of HVA; 50, 125 and 500 nM of HIAA and 25, 62.5 and 250 nM of MHPG, 3OMD and 5OHT. The basal content of the p-CSF sample was determined with the standard-addition method. (Skoog, DA. 1996) Aliquots of p-CSF frozen at -80°C until analysis were used as internal quality control (QC). "Special assays in urine" from ERNDIM was used as external quality control after dilution by a factor 100.

For sample preparation, 100 μ L of CSF or calibrator or QC sample were diluted (1/1, v/v) in the mobile phase before filtration in a 5,000 MWCO PES Vivaspın 500 filter (Sartorius, Aubagne, France) and centrifugation (10 min at 12 000 g and 7°C). 50 μ L of the resulting filtrate was injected into the chromatograph.

Statistics.

The Shapiro-Wilk or Shapiro-Francia tests were used to check the normality of data distribution. Histogram and normal probability plots were also drawn to graphically assess the normality of the data. Comparisons were performed with a two-tailed Student's t-test, after checking the homogeneity of variances using Fisher's test. P values of less than 0.025 were considered statistically significant. Relationships between variables were examined using Pearson coefficient, linear regression and analysis of variance. Statistical analysis were made using Matlab and excel.

RESULTS

Method development and validation.

Chromatographic separation was achieved using a polar embedded stationary phase designed for separation of basic and polar compounds (Guibal, P. 2014). Systematic investigation of the effects of pH and mobile phase composition allowed us to obtain the separation of all target compounds in less than 10 min. Detection was achieved by sequential electrochemical and fluorescence detections. The electrochemical detection also served as a post-column coulometric oxidation reactor for oxidation of reduced pterins prior to fluorescence detection. The proposed method allows the separation and simultaneous quantification of both amine metabolites by electrochemical detection, (Fig. 1a) and pterins by fluorescence detection (figure 1b). Hence quantification of 3OMD, 5OHT, MHPG, HIAA, HVA, NH₂, BH₂ and B was successfully achieved in one step chromatographic analysis using the following chromatographic conditions: separations were performed on an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x

100 mm, 1.8 μ m) column with a mobile phase consisting of pH 5.4, 0.05 sodium citrate/methanol (97/3, v/v) delivered at a flow rate of 0.5 mL/min at 30 °C. The coulometric detection and oxidation were performed at + 400 mV followed by fluorimetric detection at λ_{ex} 350 nm and λ_{em} 450 nm. The final run time was 10 min.

Table 2 summarizes linearity data and LOQs for the target analytes. The method was linear for all compounds over the calibration range. Within-run and between-run precision data did not exceed 17.1% (table S-1). Analytical recovery was higher than 89.0% for all instances. Finally, there was no significant difference between CSF samples and standard solutions (table S-1) as evidenced by p-values greater than 0.05 when CSF samples and between run standard solution were compared.

Effect of age.

Normality of the data was assessed using both graphical representation (histograms and Q-Q plots) and Shapiro-Wilk or Shapiro-Francia tests depending on the kurtosis (Razali, NM. 2011). Data were not normally nor lognormally distributed as showed by p-value lesser than 0.001. Nevertheless, we used Pearson correlation coefficient to study correlation between metabolites concentrations and aged among patients.

CSF concentrations of all metabolites are widely spread and appear to be related to age as shown on figure 2. In the whole group of controls a negative correlation was observed between many variables and age (HIAA: $r = -0.5549$, $p < 0.0001$; HVA: $r = -0.5602$, $p < 0.0001$; 3 OMD: $r = -0.3929$, $p < 0.0001$; MHPG: $r = -0.3355$, $p < 0.0001$; BH2: $r = -0.1459$, $p < 0.0001$). Only N didn't exhibit any correlation with age (N: $r = 0.0373$, $p = 0.2613$).

HVA / HIAA ratio also showed a positive correlation with age (HVA / HIAA: $r = 0.2365$, $p < 0.0001$). HVA / MHPG ratio showed a slightly negative correlation with age ($r = -0.1829$, $p < 0.0001$) and HVA / 3 OMD showed an even slightest positive correlation with age ($r = 0.0790$, $p = 0.0157$).

Data distribution among the patient samples.

Patients were grouped by age according to previously published data (Ormazabal et al.). Normality was assessed in each group using both graphical representation (histograms and Q-

Q plots) and Shapiro-Wilk or Shapiro-Francia tests depending on the kurtosis (Razali, NM, 2011).

In all age groups older than one month, and for all analytes data were not normally distributed (Table S-2). Considering a p-value lesser than 0.025 statistically significant, data were lognormally distributed (Table S-2).

Age groups were then compared using Student's t-test. When comparing age groups for HVA and 5 HIAA concentrations, significantly different values were observed between the groups older than 1 month. The group of patients younger than one month was not significantly different from the 1 – 6 months old group.

5 OHT was found to be less than 12 nmol/L in every control patients. However it was still useful to detect high levels of 5 OHT, symptoms of some enzymatic deficiencies.

Relationship between dopamine and serotonin metabolites

Irrespective of the age or the sex, strong positive correlations were observed between HVA and HIAA ($r = 0.7742$, $p < 0.0001$), HVA and MHPG ($r = 0.4446$, $p < 0.0001$), HVA and 3 OMD ($r = 0.4483$, $p < 0.0001$), MHPG and 3 OMD ($r = 0.5918$, $p < 0.0001$), HVA and BH2 ($r = 0.2781$, $p < 0.0001$) and HIAA and BH2 ($r = 0.2339$, $p < 0.0001$). BH2 and N exhibit a slightly positive correlation ($r = 0.1241$, $p = 0.0002$) (figure 3).

Considered together, these results allowed us to propose the first reference intervals for the French pediatric and adult population (Table 3). Of course, a larger number of CSF samples from control populations would be necessary for strengthening these findings.

Diagnosis of neurotransmitters disorders

The method was successfully applied to the diagnosis of inborn error of metabolism of dopamine and serotonin.

Patients with tyrosine hydroxylase deficiency, sepiapterin reductase deficiency, Segawa's disease and intracerebral immune system activation were successfully diagnosed using the proposed method (figure 4).

DISCUSSION

Liquid chromatography associated with electrochemical and fluorescence detection has proven to be a powerful technique for analysis of biogenic amines and pterins in CSF.

Method previously published required two chromatographic steps. (Ormazabal, A. 2005; Verbeek, MM. 2008) One for biogenic amine analysis, including HVA and 5 HIAA, with electrochemical detection; and another for pterins analysis which requires a pretreatment in order to turn reduced pterins into their oxidized and fluorescent counterparts.

Here we present a method able to simultaneously detect biogenic amine and reduced pterins in less than 10 minutes. As far as we know this is the fastest and simplest method ever published for the diagnosis of inborn errors of dopamine and serotonin metabolism.

There are reports regarding reference values in pediatric populations (Hyland, K. 1993; Komori, H. 1999; Ormazabal, A. 2005) and also one publication about the study of 1388 patients over 10 years of analysis (Molero Luis, M. 2013).

Reference values obtained here for 931 patients showed results similar to the ones previously published. Correlation with age among the metabolites was very similar to those previously published. Indeed we observed a negative association between all metabolites and age of controls. So we stratify patients in age groups according to the ones published by Ormazabal and al. (Ormazabal, A. 2005). Unlike previous study we did not observe differences between concentrations of HVA and 5 HIAA during the first month of life compared to 1 – 6 months period of life. This is different from the results of Ormazabal et al. That might be due to a greater number of patients in each group in the present study. However this is the first publication of results of patients from France.

Relationships between metabolites has already been studied and published (Hyland, K. 1993; Komori, H. 1999; Ormazabal, A. 2005). In the present study as we measured various dopamine metabolites we were able to observe significant positive correlation between HVA and MHPG, HVA and 3OMD and between MHPG and 3OMD. This was not reported in previous study. Figure 4 shows a 3D graphical representation of patients without neurotransmitter deficit and group of patient with outside range values. We observed correlation between HVA and BH2 on one side and 5 HIAA and BH2 on the other side. Hence we drew same kind of 3D graphical representation. Correlation of HVA, 5 HIAA and BH2 is understandable as BH2 concentration reflect BH4 metabolism, and BH4 is known to be a key enzymatic cofactor for the rate limiting step of dopamine and serotonin biosynthesis.

Apart from the 931 children used as a control group, 105 adults (age from 16 to 80 years old) and 101 adults with neurological disorders were studied. 187 patients with elevated N and 152

patients with other disorders of neurotransmitters were examined. Figure 5 shows chromatograms of patients with various metabolic diseases.

AADC was successfully diagnosed using this method. Chromatogram showed a drastic decrease of HVA and 5 HIAA concentration altogether with an increase of 3 OMD and 5 OHT; a characteristic pattern of AADC deficiency.

A case of dopamine transporter deficiency, a disorder recently described (Kurian, MA. 2011) was also diagnosed. An isolated great increase in HVA concentration and thus an increase of HVA / 5 HIAA ratio was found which is evidence of this deficiency.

Concerning pterin metabolism deficiency, a case of sepiapterin reductase was identified by a reduction of HVA and 5 HIAA associated with an increase of BH2 and NH2. BH4 analysis was performed using a method recently published (Guibal, P. 2014) and BH4 was undetectable which is consistent with a drastic decrease of BH4 concentration.

Cases of patients with a high concentration of NH2 were observed. N and NH2 are known to be biomarker of inflammation. Indeed elevated N is generally due to an intra cerebral inflammatory process from various origins such as encephalopathy, HIV infections (Hagberg, L. 2011)

CONCLUSION

An UHPLC method for the rapid diagnosis of inborn errors of metabolism of dopamine and serotonin is described.

Metabolites of dopamine (HVA, 3 OMD, MHPG), serotonin (5 HIAA, 5 OHT) and BH4 (N, BH2, B) were quantified in a small volume of CSF (100 μ L) using a single filtration step for sample preparation and analysis. Use of post column coulometric oxidation of the reduced pterins enables simultaneous determination of biogenic amines (electrochemical detection) and pterins (fluorescence detection). As only one chromatographic analysis of 10 min is required for the diagnosis using this method, it's the fastest method for such diagnosis as far as we know.

The method allowed us to determine references values, among French population, which are very similar to those previously published. Strong correlation between biogenic amines and age was observed, as well as a strong correlation between HVA and 5 HIAA. Finally several enzymatic deficits were successfully diagnosed or confirmed using our method.

REFERENCES

- Allen GFG, Land JM, Heales SJR (2009) A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 97:6–14.
- Blau N, Thöny B (2008) Pterins and Related Enzymes. *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. pp 655–701
- Chi C-S, Lee H-F, Tsai C-R (2012) Tyrosine hydroxylase deficiency in Taiwanese infants. *Pediatric neurology* 46:77–82.
- Fukushima T, Nixon JC (1980) Analysis of Reduced Forms of Biopterin Biological Tissues and Fluids. *Analytical biochemistry* 102:176–188.
- Guibal P, Le N, Doummar D, et al (2014) Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid. *ACS Chemical Neuroscience* 5:533–541.
- Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, et al (2010) Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS research and therapy* 7:nd.
- Howells D, Smith I, Hyland K (1986) Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 381:285–294.
- Hubbard KE, Wells A, Owens TS, et al (2010) Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* 626–631.
- Hyland K (2003) The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases. *Annals of neurology* 54 Suppl 6:S13–7.
- Hyland K (2007) Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *The Journal of nutrition* 137:1568S–1572S; discussion 1573S–1575S.
- Hyland K (2008) Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry* 54:633–41.
- Hyland K, Surtees RAH, Heales SJR, et al (1993) Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatric research* 34:10–4.
- Jiménez Girón A, Martín-Tornero E, Hurtado Sánchez MC, et al (2012) A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine. *Talanta* 101:465–72.

- Kema IP, de Vries EG, Slooff MJ, et al (1994) Serotonin, catecholamines, histamine, and their metabolites in urine, platelets, and tumor tissue of patients with carcinoid tumors. *Clinical chemistry* 40:86–95.
- Komori H, Matsuishi T, Yamada S, et al (1999) Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of bipterin and biogenic amines. *Acta paediatrica* 88:1344–7.
- Koshimura K, Murakami Y, Tanaka J, Kato Y (2000) The role of 6R-tetrahydrobiopterin in the nervous system. *Progress in neurobiology* 61:415–438.
- Koyama E, MInegishi A, Ishizaki T (1988) Simultaneous Determination of Four Monoamine Metabolites and Serotonin in Cerebrospinal Fluid by “High-Performance” Liquid Chromatography with Electrochemical Detection; Application for Patients with Alzheimer’s Disease. *Clinical chemistry* 34:680–684.
- Kurian MA, Gissen P, Smith M, et al (2011) The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet neurology* 10:721–33.
- Kurian MA, Li Y, Zhen J, et al (2011) Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet neurology* 10:54–62.
- Leu-Semenescu S, Arnulf I, Decaix C, et al (2010) Sleep and Rhythm Consequences of a Genetically Induced Loss of Serotonin. *Sleep* 33:307–314.
- Manini P, Andreoli R, Cavazzini S, et al (2000) Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 744:423–31.
- Molero-Luis M, Serrano M, Ormazábal A, et al (2013) Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Developmental medicine and child neurology* 55:559–66.
- Niu D-M (2011) Disorders of BH4 metabolism and the treatment of patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Taiwan. *Brain & development* 33:847–55.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, et al (2005) HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *Journal of neuroscience methods* 142:153–8.
- Razali NM, Wah YB, Sciences M (2011) Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics* 2:21–33.
- Romstad A, Kalkanoğlu HS, Coşkun T, et al (2000) Molecular analysis of 16 Turkish families with DHPR deficiency using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human Genetics* 107:546–553.
- Skoog, D. A., West, D. M., and Holler, F. J. (1996) In *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th ed., pp 572-575, International Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia

Talvik I, Segawa M, Veri K, et al (2010) Cases of dopa-responsive dystonia (Segawa disease) in Estonia. *Brain & development* 32:428–31.

Tani Y, Ohno T (1993) Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid-chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 617:249–55.

Tareke E, Bowyer JF, Doerge DR (2007) Quantification of rat brain neurotransmitters and metabolites using liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry and comparison with liquid chromatography / electrochemical detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21:3898–3904.

Tay SKH, Poh KS, Hyland K, et al (2007) Unusually mild phenotype of AADC deficiency in 2 siblings. *Molecular genetics and metabolism* 91:374–8.

Tsunoda M (2006) Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* 386:506–14.

Verbeek MM, Blom AM, Wevers RA, et al (2008) Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. *Molecular genetics and metabolism* 95:127–32.

Werner ER, Blau N, Thöny B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochemical journal* 438:397–414.

Zhang W, Zhu W, Xu H, et al (2005) Liquid chromatography-electrochemical detection for studying the effects of tetrahydrobiopterin on monoamine neurotransmitters in rat striatum. *Science in China Series B* 48:368–375.

FIGURES

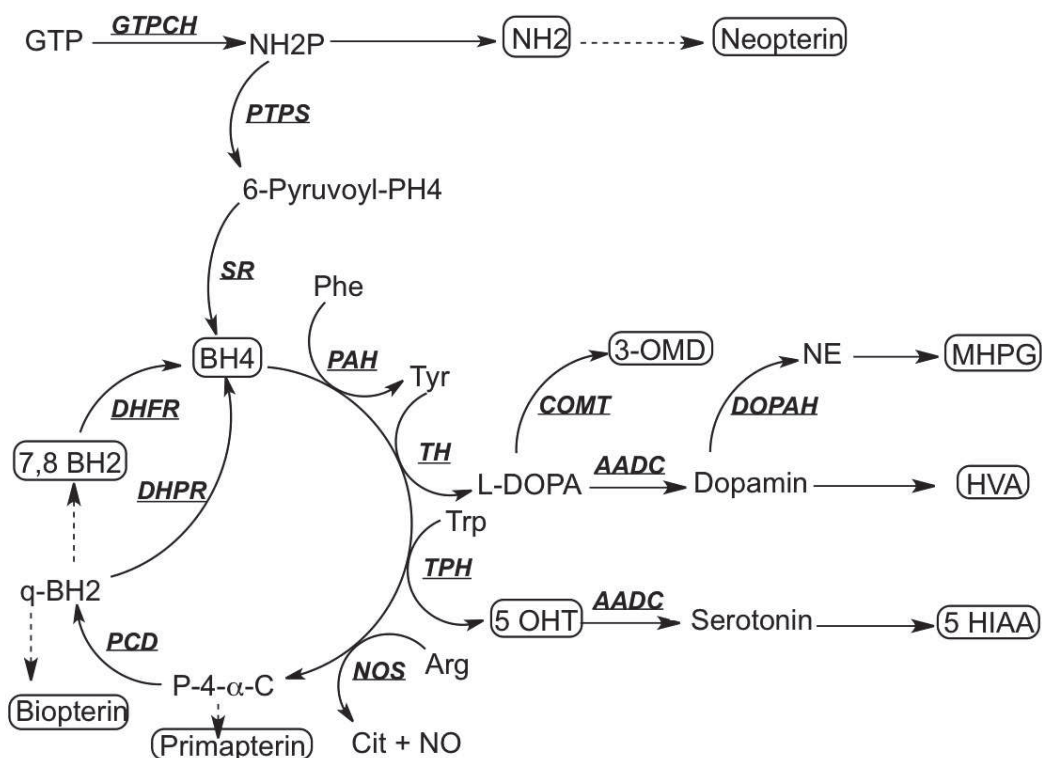


Figure 1. Biosynthesis of dopamine and serotonin and metabolism pathway of tetrahydrobiopterin (BH₄).

Phe: phenylalanine, Arg: arginine, Cit: citrulline, Trp: tryptophane, 5-OHT: 5 hydroxy tryptophane, 5 HIAA: Hydroxy indole acetic acid, Tyr: tyrosine, 3 OMD: 3 ortho methyl dopa, HVA: homovanillic acid, NE: norepinephrine, MHPG: methyl hydroxy phenyl glycol, BH₄: tetrahydrobiopterin, N: neopterin, B: biopterin, 7,8 BH₂: dihydrobiopterin, q-BH₂: quinonoid dihydrobiopterin, NH₂: dihydroneopterin, GTP: guanosine triphosphate.

TPH: tryptophane hydroxylase EC 1.14.16.4, TH: tyrosine hydroxylase EC 1.14.16.2, AADC: amino acid decarboxylase EC 4.1.1.28, DBH: dopamine beta hydrolase EC 1.14.17.1, COMT: catechol o methyl transferase EC 2.1.1.6, MAO: monoamine oxidase EC 1.4.3.4, AR: aldehyde reductase EC 1.1.1.21. GTPCH: guanosine triphosphate cyclohydrolase EC 3.5.4.16, PTPS: 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase EC 4.2.3.12, SR: sepiapterin reductase EC 1.1.1.153, PCD: pterin-4α-carbinolamine dehydratase EC 3.5.4.16, DHPR: dihydropteridin reductase EC 1.5.1.34, DHFR: dihydrofolate reductase EC 1.5.1.3, NOS: nitric oxide synthase EC 1.14.13.39. (Dashed arrows: non-enzymatic)

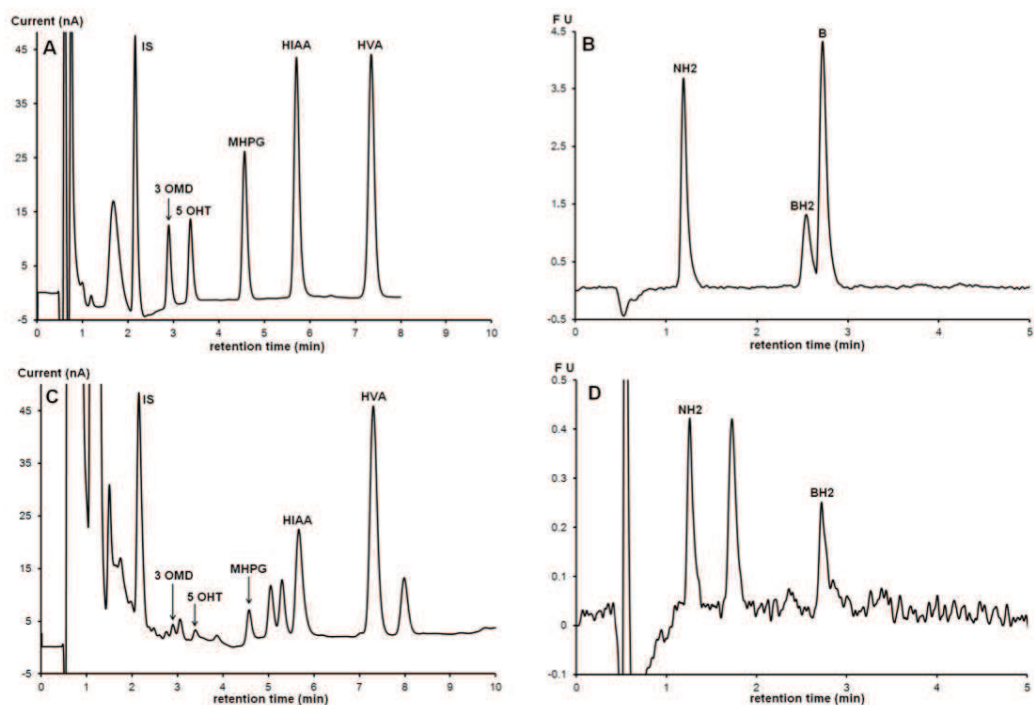


Figure 2. Chromatographic profiles of a standard mixture and a CSF sample under the proposed chromatographic conditions: column Atlantis HSS T3 (2.1×100 mm, $1.7 \mu\text{m}$); mobile phase: pH 5.4, 0.05 M sodium citrate / methanol (97 / 3, v / v); flow rate: 0.5 mL/min at 30°C , detection: electrode potential at +600 mV and λ_{ex} 350 nm, λ_{em} 450 nm (FU: fluorescence units (arbitrary units)). Standard mixture with electrochemical detection (A) followed by fluorescence detection (B). CSF sample of a patient from control group with electrochemical detection (C) and fluorescence detection (D).

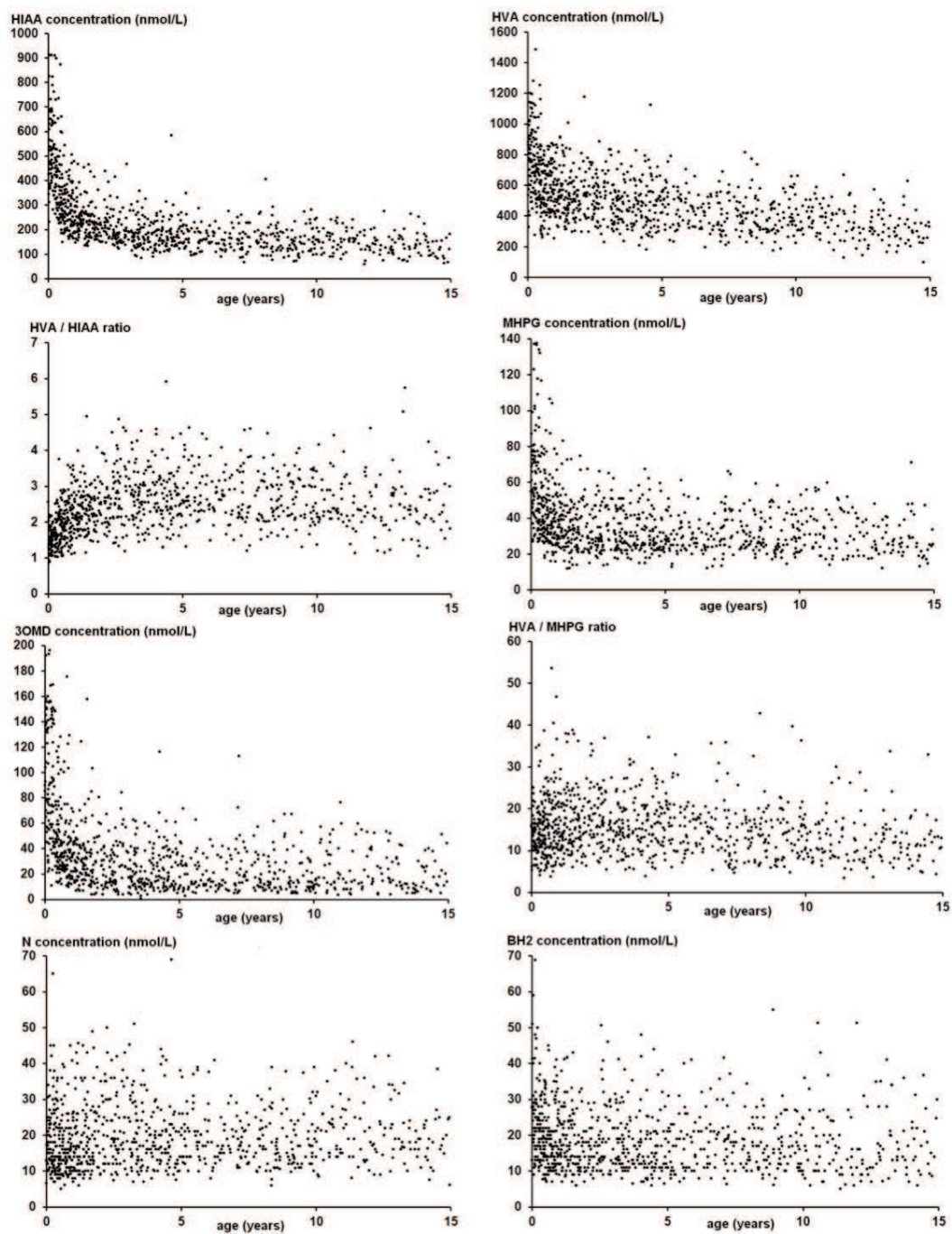


Figure 3. Variation of metabolites concentration in CSF with patient age.

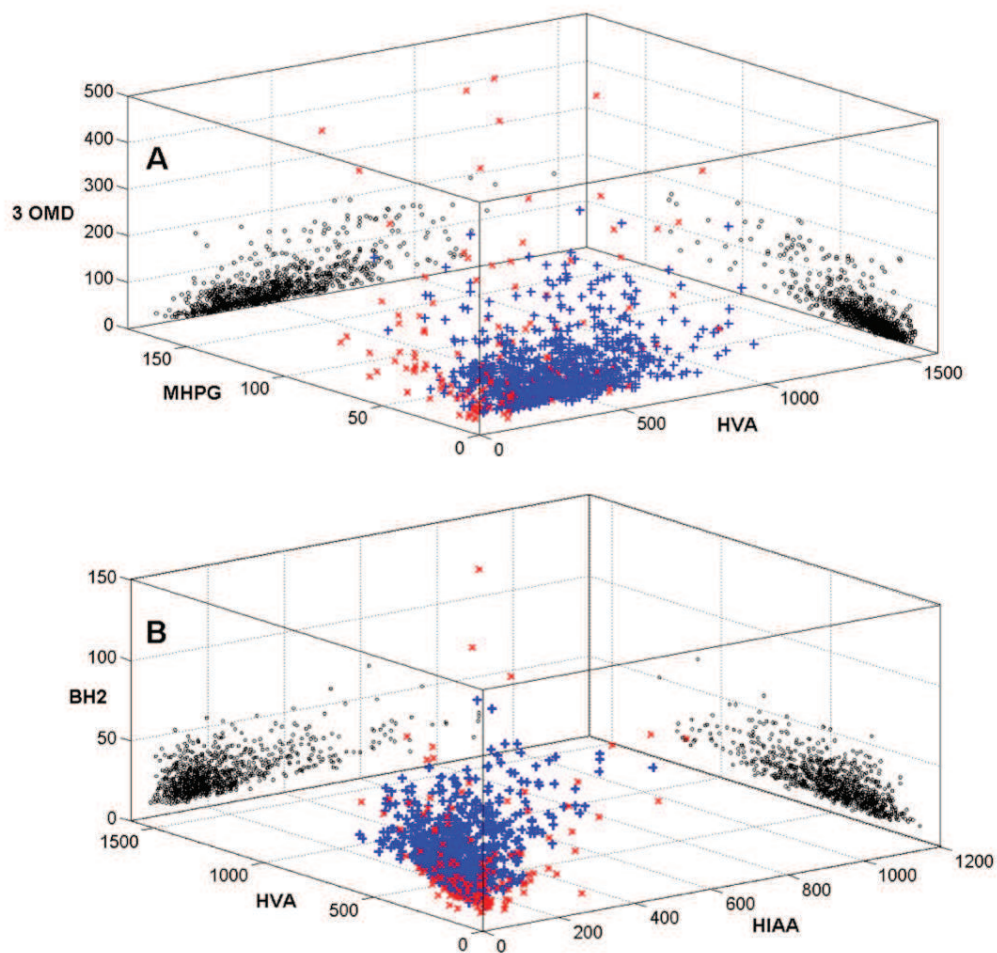


Figure 4. Relationships between metabolites. (A) relationship between 5 HIAA, HVA and BH2 and (B) relationship between HVA, MHPG and 3 OMD. Blue cross represents control patients, red cross represents patients outside range for at least one metabolite except N. Black dots are projection of control patients on 2D space.

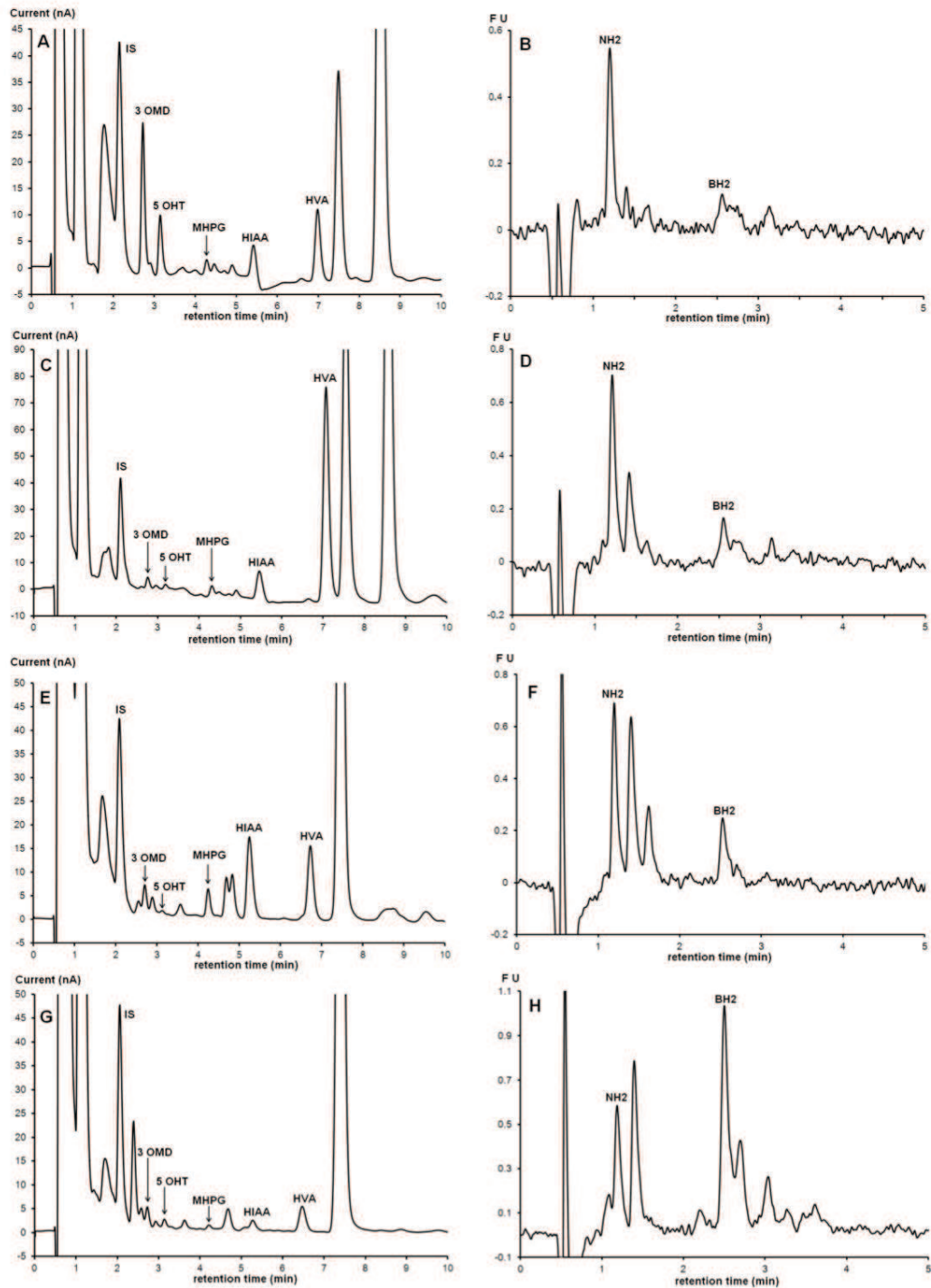


Figure 5. Chromatographic profiles obtained with the proposed method for CSF samples from patients with various metabolic disorders. (A, B) CSF sample from a patient with amino acid decarboxylase deficiency. (C, D) CSF sample from a patient with a dopamine transporter deficiency. (E, F) CSF sample from a patient with tyrosine hydroxylase deficiency. (G, H) CSF sample from a patient suffering from sepiapterin reductase deficiency.

Table 1: Pattern of cerebrospinal fluid metabolites concentration in several enzymatic defects affecting monoamine neurotransmitters metabolism.

Enzymatic defect	Phe	BH4	BH2	N	HVA	5 HIAA	HVA / 5 HIAA	3OMD	5OHT	MHPG
GTP-CH AD (Segawa)	n	↓	↓	↓	↓	↓	n	n	n	↓
GTP-CH AR	↑	↓	↓	↓	↓	↓	n	n	n	↓
PTPS	↑	↓	↓	↑	↓	↓	n	n	n	↓
SR	n	↓	↑	n or ↑	↓	↓	n	n	n	↓
PCD	↑	↓	n	n	n	n	n	n	n	n
DHPR	↑	↓	↑	n	↓	↓	n	n	n	↓
TH	n	n	n	n	↓	n	↓	n	n	↓
AADC	n	n	n	n	↓	↓	n	↑	↑	↓
DTDS	n	n	n	n	↑	n	↑	n	n	n

Table 2. LOQ and linearity data.

Analyte	LOQ nM	Slope	Intercept	R ²	Sy/x ^a	Sa ^b	Sb ^c
3 OMD	5	976	- 2822	0.9997	2939	2.9	672
5 OHT	5	1079	- 8492	0.9993	4892	4.8	1119
MHPG	5	2012	- 873	0.9998	4535	4.4	1037
5 HIAA	10	1131	- 24621	0.9970	22153	10.8	5121
HVA	15	970	- 3464	0.9999	3325	1.1	761
N	5	1958	- 1801	0.9968	3969	21.1	1089
NH2	5	1386	- 1550	0.9918	3859	22.3	1168
BH2	5	1339	- 1622	0.9947	3436	20.0	1029
B	5	2471	- 1059	0.9936	7048	37.5	1933

LOQ (defined as the lowest concentration exhibiting a CV% less than 10% in repeatability assessment). ^a Standard error of the estimate. ^b Standard error of the slope. ^c Standard error of the intercept.

Table 3: Reference values for biogenic amines and pterins in a pediatric population

	HIAA	HVA	HVA / HIAA	3 OMD	MHPG	NH2	BH2
0 – 30 days	528 (170)	769 (215)	1.53 (0.45)	113 (39)	58 (18)	18 (7)	26 (12)
A (n = 23)	232 – 911	327 – 1200	0.89 – 2.57	53 – 192	27 – 99	7 – 34	9 – 59
A vs B	p = 0.051	p = 0.585	p = 0.049	p < 0.001	p = 0.651	p = 0.940	p = 0.198
1 – 6 months	455 (167)	744 (239)	1.71 (0.46)	80 (46)	58 (28)	19 (10)	23 (10)
B (n = 108)	185 – 911	274 – 1487	1.03 – 3.75	11 – 196	26 – 138	7 – 65	8 – 69
B vs C	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.500	p < 0.001
0.5 – 3 years	248 (85)	556 (156)	2.36 (0.70)	35 (26)	37 (15)	19 (10)	19 (9)
C (n = 292)	123 – 595	230 – 1176	1.05 – 4.95	4 – 175	12 – 106	5 – 50	6 – 51
C vs D	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.171	p = 0.323
3 – 7 years	178 (58)	472 (143)	2.75 (0.74)	24 (19)	32 (11)	20 (9)	18 (8)
D (n = 229)	84 – 583	182 – 1125	1.29 – 5.92	3 – 179	12 – 67	7 – 69	6 – 48
D vs E	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.268	p = 0.270	p = 0.494	p = 0.367	p = 0.843
7 – 11 years	160 (53)	406 (120)	2.66 (0.70)	22 (18)	33 (11)	19 (7)	18 (8)
E (n = 162)	66 – 406	176 – 815	1.2 – 4.61	3 – 113	14 – 66	6 – 39	6 – 55
E vs F	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.009	p = 0.581	p = 0.030	p = 0.176	p = 0.059
11 – 16 years	138 (45)	324 (106)	2.46 (0.74)	21 (16)	30 (11)	21 (9)	16 (8)
F (n = 117)	52 – 276	97 – 669	1.05 – 5.74	4 – 69	12 – 71	6 – 46	5 – 41
F vs G	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.701	p = 0.749	p = 0.266	p = 0.160
over 16 years	115 (54)	233 (106)	2.14 (0.78)	21 (19)	30 (12)	21 (8)	15 (8)
G (n = 105)	58 – 375	91 – 725	1.04 – 4.90	3 – 118	12 – 59	7 – 51	5 – 45

Results were expressed in nmol/L as average (standard deviation) and range.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S-1 : Analytical recovery and accuracy of the method, and between-run comparison between standard solution and cerebrospinal fluid (CSF) matrices.

Analytes	Added concentration (nmol/L)	Authentic CSF			Standard solution				p-values	
		Between run (n=6)			Within run (n=6)			Between run (n=10)		
		Measured concentration (nmol/L)	Analytical recovery (%)	CV (%)	Measured concentration (nmol/L)	Analytical recovery (%)	CV (%)	Measured concentration (nmol/L)		CV (%)
3 OMD	0	153.6	-	8.9	-	-	-	-	-	0.0515 0.0536 0.0576
	5	-	-	-	5.88	117.6	6.8	5.55	6.5	
	25	179.7	104.5	7.5	22.57	90.3	5.0	23.74	7.5	
	62.5	221.4	108.5	8.7	61.69	98.7	3.0	62.60	4.0	
	125	-	-	-	124.19	99.4	1.5	126.35	2.0	
	250	395.7	96.8	4.8	249.79	99.9	0.9	252.20	2.0	
	500	-	-	-	500.49	100.1	1.0	505.18	2.1	
	0	23.5	-	17.2	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	5.86	117.2	9.2	5.95	11.3	
	25	48.8	101.2	9.5	26.14	104.6	4.0	26.93	8.6	
5 OHT	62.5	89.5	105.6	8.6	60.22	96.4	2.7	65.66	7.1	0.2571 0.9098 0.0508
	125	-	-	-	121.68	97.3	2.9	131.08	4.5	
	250	263.3	95.9	7.7	245.65	98.3	1.5	256.00	2.8	
	500	-	-	-	503.17	100.6	0.9	530.29	2.0	
	0	21.4	-	9.4	-	-	-	-	-	
MHPG	5	-	-	-	5.65	113.0	2.7	4.01	6.2	0.6734 0.8737 0.0527
	25	48.2	107.2	6.9	25.13	100.5	2.6	26.37	7.4	
	62.5	85.1	102.0	5.1	61.41	98.3	1.3	63.50	3.5	
	125	-	-	-	123.20	98.6	0.9	127.87	2.7	
	250	266.2	97.9	1.4	248.44	99.4	0.9	252.15	2.6	
5 HIAA	500	-	-	-	501.33	100.3	0.5	514.33	2.5	0.8418 0.0860 0.3197
	0	113.1	-	8.5	-	-	-	-	-	
	10	-	-	-	12.08	120.8	6.1	11.80	12.7	
	50	168.3	110.5	8.6	55.35	110.7	5.5	54.63	8.9	
	125	246.1	106.4	6.8	118.10	94.5	5.0	120.30	5.6	
	250	-	-	-	235.96	94.4	4.2	241.43	8.8	
	500	596.0	96.6	2.8	484.12	96.8	4.2	499.43	6.6	
	1000	-	-	-	1011.28	101.1	3.1	1037.42	5.7	

HVA	0	370.1	-	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	15.58	103.9	2.3	14.73	5.7	0.1700		
	75	447.5	103.2	6.6	71.71	95.6	1.1	73.51	5.7	0.3810		
	187.5	560.7	101.7	5.1	181.28	96.7	0.7	186.33	3.7			
	375	-	-	-	369.20	98.5	0.6	378.51	3.0			
NH2	750	1105.4	98.0	2.8	745.63	99.4	0.4	765.27	2.6	0.0613		
	1500	-	-	-	1497.66	99.8	0.3	1529.83	2.5			
	0	10.7	-	2.8	-	-	6.9	-	-			
	5	15.9	104.4	7.4	4.45	89.0	7.6	5.54	17.1	0.4965		
	12.5	22.5	94.6	3.8	12.37	99.0	6.8	12.90	7.1	0.0628		
BH2	25	-	-	-	25.69	102.8	5.4	24.95	8.7	0.0556		
	50	56.1	90.8	5.7	50.25	100.5	3.4	49.40	6.4			
	100	-	-	-	99.75	99.8		100.42	7.4			
	0	22.2	-	12.3	-	-	-	-	-			
	5	27.4	104.2	6.4	4.50	90.0	5.6	5.54	16.9	0.6612		
B	12.5	35.6	107.2	6.3	11.21	89.7	6.3	13.13	5.7	0.5649		
	25	-	-	-	22.69	90.8	5.9	25.46	8.5			
	50	69.4	94.5	8.7	49.17	98.34	6.7	49.59	6.3	0.2674		
	100	-	-	-	98.84	98.8	4.7	99.13	6.2			
	0	10.2	-	9.0	-	-	-	-	-			
	5	14.8	93.0	4.2	4.51	90.2	11.9	4.73	9.7	0.6776		
	12.5	23.4	105.7	3.4	12.19	97.5	5.4	12.66	7.0	0.2423		
	25	-	-	-	25.20	100.8	8.8	24.71	6.3			
	50	59.7	99.0	4.3	51.17	102.3	7.4	50.68	6.5	0.4988		
	100	-	-	-	99.43	99.4	4.9	99.74	7.2			

Analytical recovery was calculated according to the formulae: $AR (\%) = [(final\ concentration - initial\ concentration) / added\ concentration] \times 100$
p-value is obtained with a two-tailed Student's t-test for comparison of mean concentration obtained between standard solution and authentic CSF after checking homogeneity of variances using Fisher's test.

Table S-2 : p value as a result of Shapiro Wilk normality test on population and log transformed population.

p - value	HV'A		5 HIAA		HV'A / 5 HIAA		MHPG		3 OMD		NEOP		BH2	
	norm	log	norm	log	norm	log	norm	log	norm	log	norm	log	norm	log
0 – 30 days	0.5296	0.0884	0.2902	0.0139	0.3094	0.6882	0.4354	0.7996	0.3916	0.3094	0.3876	0.5830	0.0639	0.3504
1 – 6 months	0.2688	0.1908	0.0012	0.9786	0.0001	0.5465	< 0.0001	0.0053	< 0.0001	0.0306	< 0.0001	0.0779	< 0.0001	0.1327
0.5 – 3 years	0.0012	0.4707	< 0.0001	0.0012	< 0.0001	0.3737	< 0.0001	0.6965	< 0.0001	0.0758	< 0.0001	0.0044	< 0.0001	0.0087
3 – 7 years	< 0.0001	0.8886	< 0.0001	0.5082	0.0003	0.3644	< 0.0001	0.0170	< 0.0001	0.0008	< 0.0001	0.8843	< 0.0001	0.0805
7 - 11 years	0.0018	0.0931	0.0001	0.3896	0.0011	0.0699	< 0.0001	0.1525	< 0.0001	0.0188	0.0001	0.5168	< 0.0001	0.8617
11 - 16 years	0.1294	0.3268	0.1084	0.4421	0.0001	0.0777	0.0001	0.5520	< 0.0001	0.0144	0.0002	0.7117	< 0.0001	0.4109
Over 16 years	< 0.0001	0.9252	< 0.0001	0.0074	0.0001	0.6569	0.001	0.1986	< 0.0001	0.4773	0.0006	0.9284	< 0.0001	0.1130

**CHAPITRE 4 : DOSAGE SIMULTANE DES METABOLITES DE LA
DOPAMINE, DE LA SEROTONINE ET DES PTERINES**

Si le dosage des amines biogènes ainsi que de la BH2 et la NH2 a permis de diagnostiquer des déficits en dopamine et sérotonine ainsi que des troubles du métabolisme de la BH4, il serait intéressant de quantifier également la BH4 afin de confirmer les déficits en BH4 supposés.

Les deux méthodes présentées précédemment permettent d'une part de doser les différentes formes de ptérines circulantes dans le LCR et d'autre part de déterminer les métabolites de la dopamine et de la sérotonine simultanément avec une partie des ptérines réduites.

Ces deux méthodes basées sur un principe similaire d'oxydation électrochimique post colonne avant détection par fluorescence pourraient être réunies en une seule analyse. Pour cela il faut réunir les conditions adéquates des deux méthodes, à savoir utiliser une détection électrochimique qui servira également à l'oxydation en ligne des ptérines réduites. Une attention toute particulière doit être apportée au pH de la phase mobile et à la séparation des composés eux mêmes. En effet la séparation des amines biogènes se faisait avec un pH fixé à 5,2 alors qu'un pH de 7,4 est nécessaire pour oxyder en ligne la BH4 avec un rendement suffisant pour la détecter par fluorescence.

C'est l'objectif de cette partie, à savoir analyser en un temps minimum les métabolites de la dopamine et de la sérotonine ainsi que de la BH4 et ses composés associés (B, BH2, N et NH2) en une seule analyse.

INTRODUCTION

Le diagnostic des erreurs innées du métabolisme de la dopamine et de la sérotonine chez les enfants passe par le dosage dans le LCR des métabolites de la dopamine et de la sérotonine, respectivement le HVA et le 5 HIAA (Hyland, K. 2008). Le dosage de la BH4 est un apport à ces diagnostics puisque la BH4 est un cofacteur enzymatique indispensable à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine (Hyland, K. 2008).

Jusqu'à maintenant ces diagnostics nécessitaient donc au minimum deux analyses (Hyland, K. 2008). D'un côté pour le HVA et le 5 HIAA et d'un autre côté pour la BH4 et/ou ses produits de dégradation, la BH2 et la B.

De nombreuses méthodes de dosages du HVA et 5 HIAA existent d'ores et déjà. Pour la plupart il s'agit de méthode de chromatographie en phase liquide couplée à une détection électrochimique (Bicker, J. 2013 ; Tsunoda, M. 2006). C'est d'ailleurs à l'aide de ce genre de méthode que des équipes espagnoles (Ormazabal, A. 2005) et anglaise (Hyland, K. 1993) ont établi des valeurs de référence pour des populations pédiatriques dans le LCR.

Le dosage de la BH4 requiert des techniques d'analyses particulières. En effet la BH4 n'est pas une molécule fluorescente à l'inverse de la B, forme totalement oxydée de la BH4, qui elle est fluorescente. Une des méthodes les plus utilisées consiste à oxyder l'échantillon en milieu acide pour oxyder les formes réduites BH4 et BH2 en B. Cette méthode permet de doser la B totale c'est à dire la somme BH4+BH2+B (Fukushima, T. 1980). Elle fut utilisée pour déterminer des valeurs de référence dans le LCR (Ormazabal, A. 2005). D'autres méthodes ont permis de déterminer en une seule étape les différentes formes de B. Notamment une méthode datant de 1986 (Howells, DW. 1986) utilisant une oxydation électrochimique post colonne avant détection par fluorescence. De cette façon BH2 et B était détectées par fluorescence. En revanche la BH4 n'était détectée que par électrochimie. Quoiqu'il en soit cela leur a permis de déterminer des valeurs de référence pour ces composés dans le LCR. Récemment nous avons mis au point une méthode d'analyse et de dosage par fluorescence de la BH4 (Guibal, P. 2014). Nous avons également mis au point une méthode d'analyse simultanée des métabolites de la dopamine et de la sérotonine (HVA, 5 HIAA, 3OMD, MHPG, 5OHT) par électrochimie ainsi que certaines ptérines (NH2, BH2 et B) par fluorescence. Cette méthode bien que ne mesurant pas la BH4, permet le diagnostic rapide des déficits en dopamine et sérotonine dû à un déficit en BH4 ou non. Par ailleurs cette analyse simultanée était réalisée en seulement 10 minutes.

Ici nous proposons une amélioration de ces méthodes d'analyses en réalisant simultanément et rapidement la détection électrochimique de HVA, 5 HIAA, 3OMD, MHPG et 5OHT et la détection par fluorescence, après oxydation coulométrique post colonne, des formes réduites et oxydées de biptérine (BH₄, BH₂ et B) et de néoptérine (NH₂ et N). Cela est rendu possible grâce à l'utilisation d'un système UPLC associé à des phases stationnaires et mobiles bien choisies.

MATERIEL ET METHODES

Tous les réactifs et produits chimiques ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Pour les analyses UPLC, nous avons utilisé un système Waters Acquity UPLC couplé à un détecteur électrochimique ESA Coulochem III, équipé d'une cellule de type 6011 A à deux électrodes, et suivi d'un détecteur de fluorescence Acquity UPLC FLR detector (figure 1). Le détecteur de fluorescence est réglé comme suit : λ_{ex} 350 nm et λ_{em} 450 nm.



Figure 1. Schéma de principe de la méthode d'analyse simultanée des amines biogènes et ptérines. E1 et E2 sont les électrodes 1 et 2 de la cellule de détection 6011A.

Les amines biogènes et les ptérines ont été séparées sur une colonne Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm ; 1,8 μ m) de Waters.

La phase mobile était composée de 97 % de citrate de sodium (0,05 mol/L, pH 7,4) mélangé à 3 % de méthanol. Le débit a été fixé à 0,4 mL/min. La température de la colonne fut fixée à 30°C et le volume d'injection était de 50 μ L.

Les solutions standard furent préparées par dissolution d'environ 400 μ mol/L de B, N, BH₂, NH₂ et BH₄ dans une solution de HCl à 0,1 mol/L. De la même façon HVA, 5 HIAA, 3OMD, 5OHT, MHPG furent préparés par dissolution d'environ 1 mmol/L dans de l'eau déionisée. Les solutions injectées furent préparées par dilutions successives des solutions standard pour atteindre une concentration finale de 100 nmol/L pour BH₄, BH₂ et NH₂, 5 nmol/L pour B et N, 500 nmol/L pour HVA et 5 HIAA et 100 nmol/L pour 3OMD, 5OHT et MHPG.

La préparation d'échantillon se fait en diluant 100 μ L de solutions standard ou de LCR avec 100 μ L de phase mobile avant filtration sur filtre 5000 MWCO PES Vivaspin 500 (Sartorius, Aubagne, France) et centrifugation (10 min à 12000 g et 7°C). 50 μ L du filtrat est ensuite injecté sur la colonne.

RESULTATS ET DISCUSSION

En utilisant le système décrit précédemment sur un standard comprenant tous les composés d'intérêt (HVA, 3OMD, MHPG, 5 HIAA, 5OHT, B, BH₂, BH₄, N et NH₂) on obtient les chromatogrammes présentés sur la figure 2 (A, B et C). On observe sur le signal issu de l'électrode 1, à + 400 mV (figure 2A), seulement une partie des composés principalement le 5 HIAA et le 5OHT. Si les pics du MHPG et du HVA sont visibles, leurs hauteurs sont faibles. La 3OMD n'est pas détectée dans ces conditions. Sur la seconde électrode réglée à + 600 mV, on observe cette fois tous les composés d'intérêt détectable par électrochimie. Cette différence entre les deux signaux laisse supposer que le potentiel d'oxydation de + 400 mV n'est pas suffisant pour détecter tous nos composés. Dans ces conditions il apparaît plus judicieux de quantifier ces composés avec la seconde électrode réglée à + 600 mV. Sur le signal issu du détecteur de fluorescence on observe, comme attendu, les formes réduites et oxydées de B et N. Cette séparation est très similaire à celle obtenue dans une étude précédente par HPLC (Guibal, P. 2014). Toutefois la séparation en UPLC est 4 fois plus rapide qu'en HPLC.

Lorsque l'on compare la séparation des métabolites de la dopamine et de la sérotonine ici à pH 7,4 avec celle obtenue à pH 5,2 (chapitre 3) on observe que seul le HVA et la 5 HIAA ont vu leur temps de rétention varier. La 3OMD, le MHPG et le 5OHT n'ont pas été affectés par le changement de pH de la phase mobile. Cela est dû au fait qu'à l'inverse du 3OMD, MHPG et 5OHT, le 5 HIAA et le HVA sont des acides. Par conséquent en augmentant le pH, ils sont majoritairement sous formes déprotonés et donc moins retenus sur une silice de type C18.

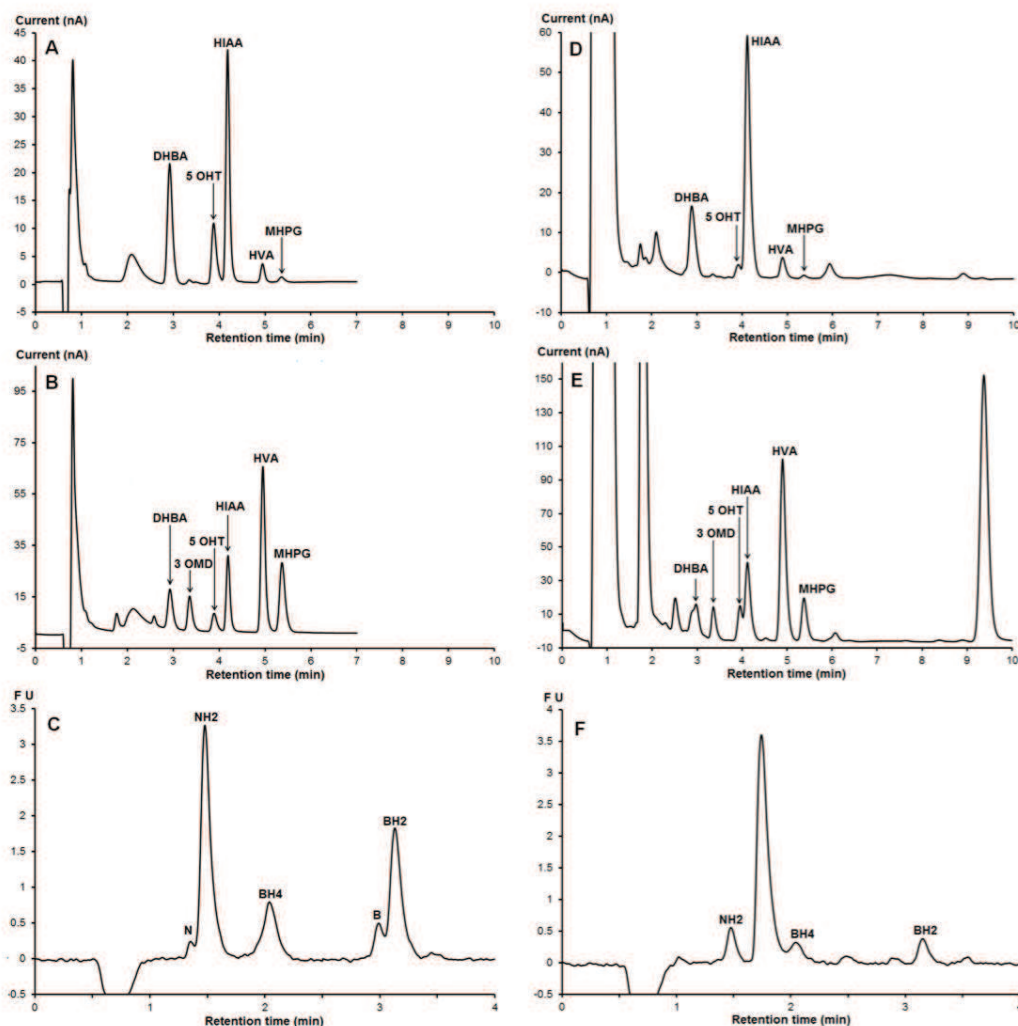


Figure 2. Profils chromatographiques de la solution de standard et d'un LCR de patient dans les conditions d'analyses proposées : colonne HSS T3 (2,1 ; 100 mm ; 1,8 μ m), phase mobile : pH 7,4 0,05 mol/L citrate de sodium / méthanol (97 / 3, v / v) ; débit 0,4 mL/min et température 30°C ; détection + 400 mV sur Electrode 1, + 600 mV sur Electrode 2, fluorescence λ_{ex} 350 nm et λ_{em} 450 nm (FU : fluorescence units, unités arbitraires).

Solution standard après détection (A) à + 400 mV par E1, (B) à + 600 mV par E2 et (C) par fluorescence après oxydation coulométrique post colonne par E1 et E2. LCR de patient après détection (D) à + 400 mV par E1, (E) à + 600 mV par E2 et (F) par fluorescence après oxydation coulométrique post colonne par E1 et E2

Afin de prouver la faisabilité de notre méthode nous avons analysé des LCR de patients ne présentant pas de déficits en BH4, dopamine ou sérotonine.

Si on observe parmi les chromatogrammes de la figure 2 (D, E et F), celui obtenu avec l'électrode 2 à + 600 mV on remarque comme attendu les 5 composés d'intérêts (figure 2E). Parmi eux, le MHPG, la 3OMD et le HVA sont bien séparés du reste des interférences du LCR. Le 5 HIAA de son côté est lui aussi bien visible. En revanche le DHBA (acide dihydroxybenzoïque), étalon interne, coélue avec une interférence. Le 5OHT semble également bien séparé des autres composés du LCR. Cependant le pic de 5OHT est particulièrement intense et correspondrait à une valeur pathologique ce qui n'est pas cohérent avec le profil métabolique déjà établi. De plus le pic de 5OHT observé sur le chromatogramme de l'électrode 1 à + 400 mV (figure 2D) est d'une intensité presque 5 fois plus faible que le pic à + 600 mV sur l'électrode 2. Or si on compare avec le standard dans les mêmes conditions, on voit que le pic de 5OHT est légèrement plus grand à + 400 mV. Encore une fois ce n'est pas cohérent avec les observations sur le LCR. L'hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène serait qu'un composé interférent coélue avec le 5OHT. Ce composé si on ne connaît pas sa nature aurait un potentiel optimal d'oxydation de + 600 mV. En conséquence de quoi il semble irréalisable de doser tous nos composés avec la seule électrode 2 à + 600 mV. Toutefois, sur le signal de fluorescence, la séparation des ptérides réduites est tout à fait correcte (figure 2F).

Dans le but de déterminer les meilleures conditions de détection électrochimique sur les deux électrodes nous avons étudié l'aire des pics de chacun des composés en fonction des paramètres électrochimiques (figure 3).

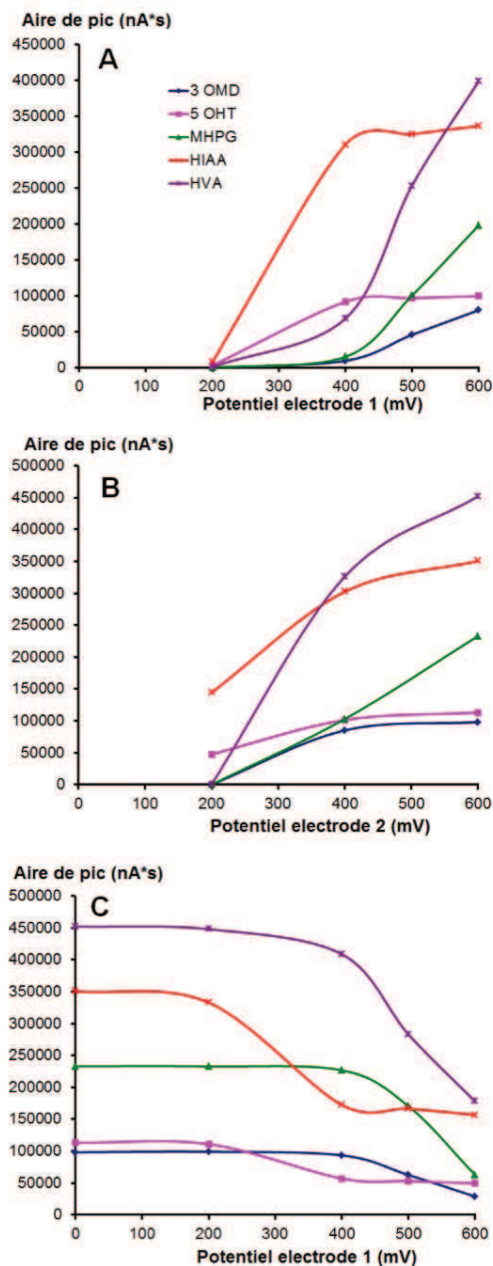


Figure 3. Voltammogrammes des amines biogènes. (A) Voltammogramme sur l'électrode 1. (B) Voltammogramme sur l'électrode 2, le potentiel de l'électrode 1 étant fixé à 0 mV. (C) Signal mesuré sur l'électrode 2 au potentiel de 600 mV en faisant varier le potentiel de l'électrode 1.

Tout d'abord sur l'électrode 1, lorsque le potentiel appliqué augmente l'aire des pics augmente. A partir de 400 mV un plateau est atteint pour le 5 HIAA et le 5OHT alors que le maximum est atteint à 600 mV pour HVA, 3OMD et MHPG. De plus l'aire des pics de HVA,

3OMD et MHPG est six à huit fois plus faible à 400 mV qu'à 600 mV. On observe le même comportement sur l'électrode 2 lorsque le potentiel de l'électrode 1 est à 0 mV. La différence entre 400 mV et 600 mV semble toutefois moins marquée pour HVA, 3OMD et MHPG par rapport à l'électrode 1.

De la même façon nous avons également mesuré l'aire des pics sur le chromatogramme donné par l'électrode 2 dont le potentiel était fixé à 600 mV pendant que le potentiel de l'électrode 1 variait de 0 à 600 mV. On peut voir sur ce graphique que le maximum d'aire de pic correspond à appliquer un potentiel de 0 mV sur l'électrode 1. Jusqu'à 200 mV l'aire des pics reste constante, en revanche dès 400 mV l'aire des pics de 5OHT et 5 HIAA a été divisée par deux, alors qu'elle n'a que peu variée pour HVA, 3OMD et MHPG. Lorsque le potentiel de l'électrode 1 est amené à 600 mV, soit la même valeur que le potentiel appliqué à l'électrode 2, l'aire de tous les pics est la plus faible. Tout ceci n'est que la traduction du comportement observé sur chacune des électrodes. On en déduit que le potentiel optimal de détection pour le 5 HIAA et le 5OHT est supérieur ou égal à 400 mV, alors que pour le HVA, la 3OMD et le MHPG ce potentiel optimal est supérieur ou égal à 600 mV.

Donc lorsque l'on détecte sur l'électrode 2 à 600 mV, en fonction du potentiel de l'électrode 1 le maximum d'aire de pic est atteint entre 0 et 200 mV pour tous les pics et entre 0 et 400 mV pour HVA, 3OMD et MHPG. En effet jusqu'à ces valeurs de potentiels les composés ne sont pas oxydés par la première électrode, la seconde détecte donc un signal maximal. A l'inverse lorsque la première électrode commence à oxyder les composés, à partir de 200 ou 400 mV suivant les composés, alors le signal sur la seconde électrode diminue puisque seule une partie des composés est détectée.

Nous sommes donc face à certaines contraintes pour optimiser notre méthode. Le pH de la phase mobile doit être fixé à 7,4 afin d'avoir un rendement d'oxydation de la BH4 acceptable pour la détecter par fluorescence (Guibal, P. 2014). Pour la même raison l'oxydation électrochimique doit se faire à 600 mV mais pas au delà sans créer des problèmes de bruit de fond sur le détecteur électrochimique. La détection de HVA, 3OMD et MHPG doit se faire à 600 mV et la détection de 5 HIAA et 5OHT doit se faire à un potentiel supérieur à 400 mV. Une interférence dont le potentiel optimal de détection semble être 600 mV coélue avec le 5OHT. Par conséquent une méthode possible semble être de régler l'électrode 1 à 400 mV pour détecter le DHBA (étalon interne), le 5OHT et le 5 HIAA avec un signal maximal et sans coélution. Il faut régler l'électrode 2 sur 600 mV pour détecter de façon optimale le

HVA, la 3OMD et le MHPG. Ce potentiel de 600 mV permettra également d'oxyder électrochimiquement les formes réduites de ptérines.

De cette façon, cette méthode semble être en mesure de déterminer simultanément et en moins de 10 minutes les métabolites de la dopamine (HVA, 3OMD, MHPG), de la sérotonine (5 HIAA, 5OHT) et les formes réduites et oxydées de biophtérines et néophtérines (BH₄, BH₂, B, NH₂ et N).

Cette méthode d'analyse prometteuse est actuellement en cours de validation.

REFERENCES

- Bicker J, Fortuna A, Alves G, Falcão A (2013) Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples--a review. *Analytica chimica acta* 768:12–34.
- Fukushima T, Nixon JC (1980) Analysis of Reduced Forms of Biopterin Biological Tissues and Fluids. *Analytical biochemistry* 102:176–188.
- Howells D, Smith I, Hyland K (1986) Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 381:285–294.
- Hyland K (2008) Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry* 54:633–41.
- Hyland K, Surtees RAH, Heales SJR, et al (1993) Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatric research* 34:10–4.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, et al (2005) HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *Journal of neuroscience methods* 142:153–8.
- Tsunoda M (2006) Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* 386:506–14.

CHAPITRE 5 : DOSAGE ULTRA RAPIDE DU 5MTHF DANS LE LCR

Le dosage du 5MTHF dans le LCR est indispensable dans le cadre du diagnostic des troubles neurologiques.

Les méthodes actuelles de dosage du 5MTHF utilisent soit une détection par fluorescence soit une détection par spectrométrie de masse. Dans la mesure où la spectrométrie de masse n'est pas le mode de détection le plus adapté à l'analyse des métabolites de la dopamine et de la sérotonine nous avons décidé de développer une méthode de dosage du 5MTHF par fluorescence. De cette façon ce dosage pourra être réalisé sur le même type d'appareillage que les méthodes de dosage décrites dans les chapitres précédents.

Ce travail a nécessité le développement d'une méthode de séparation par UPLC capable de séparer le 5MTHF en moins de 2 minutes. Cette méthode d'analyse associée à une préparation d'échantillon réduite à une simple dilution en devient dès lors une des plus rapides existantes.

Enfin ce travail nous a permis d'analyser les LCR de près de 900 patients et donc de dégager des valeurs normales fréquentes. Nous avons pu également diagnostiquer un cas de déficit en 5MTHF d'origine génétique.

INTRODUCTION

Cerebral folate deficiency (CFD) is a neurometabolic syndrome defined by low concentration of 5-methyltetrahydrofolate (5MTHF) in cerebrospinal fluid (CSF) (Hyland, K. 2010; Gordon, N. 2009). Hence diagnosis of CFD relies on the determination of 5MTHF in CSF and comparison with established reference values for a pediatric population (Ormazabal, A. 2011).

In the last decades reference values were determined in control population of different countries (Ormazabal, A. 2006; Verbeek, MM. 2008; Aylett, SB. 2013). These studies showed a negative correlation between age and 5MTHF concentration. Thus authors stratified reference values into age groups. Reference values differ from one publication to another, but slightly. On the other hand age groups seem to be different from one study to another. It seems difficult to transpose reference values established in one laboratory to another one, furthermore when not in the same country. This can be due to control population too small to accurately establish reference values. Indeed there were less than a hundred control patients (Ormazabal, A. 2006; Verbeek, MM. 2008). It supports the idea of establishing our own reference values.

In order to establish such reference values, an accurate analytical method is required. Moreover as it requires a large number of samples, an ultrafast method would be of great interest. Among all analytical techniques, liquid chromatography coupled to fluorescence detection (LC-fluo) or tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) are the most used techniques for 5MTHF quantification (Ormazabal, A. 2006; Verbeek, MM. 2008; Luo, W. 2002; Chladek, J. 2000; Wang, X. 2014; Kirsch, SH. 2012; Pfeiffer, CM. 2004). Although LC-MS/MS has never been used for quantification of 5MTHF in CSF, it's a powerful and fast technique as demonstrated by low LOD or LOQ (down to 0.26 nmol/L) and low analysis time (between 2.5 and 10 minutes). Recent improvement of LC-fluo methods leads to analysis of 5MTHF in CSF in less than 10 minutes (Verbeek, MM. 2008). However in these studies HPLC was used. Such a method would benefit from a transposition to UPLC apparatus.

The purpose of this study was to develop a fast and reliable UPLC procedure with fluorescence detection for 5MTHF analysis in CSF. This method was applied for diagnosis of CFD on 890 CSF samples from pediatric and adult patients. Some of these patients were diagnosed with MTHFR deficiency.

METHODS

Chemicals and reagents.

All reagents were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) and were used without further purification.

Patient samples.

CSF samples were collected as previously described (Guibal, P. 2014) by lumbar puncture. Lumbar punctures were performed in several French hospitals as part of normal clinical management with the written informed consent of parents or legal representatives of each patient. This study was performed according to French public health regulations (*Code de la santé publique – Article L1121-3, modified by Law n°2011-2012, December 29 2011 – Article 5*). Samples were immediately frozen with liquid nitrogen and then stored at -80 °C until analysis. Exclusion criteria were traumatic punctures, inadequate collection and preservation of the samples.

CSF samples were from 889 patients without folate deficiency, biogenic amines or pterins abnormalities aged one day to 80 years old (median 4.3 years). One other CSF sample was from a patient with 5MTHF deficiency (4.8 years old).

Chromatographic condition.

For UHPLC analysis we used a Waters ACQUITY UPLC system connected to an Acquity UPLC FLR detector. 5MTHF was analyzed by RP-mode separation using an Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) column from Waters.

The mobile phase consisted of phosphate buffer (0.05 mol/L, pH 2.7) mixed with acetonitrile (94/6; v/v). Flow rate was 0.5 mL/min. Temperature was set at 30°C and injection volume was 10 μ L.

Fluorescence detection conditions were as follows: λ_{ex} 295 nm, λ_{em} 355 nm

Calibrators, quality control, and sample preparation.

Stock standard solution was prepared by dissolving about 500 μ mol/L of 5MTHF in 56 mmol/L ascorbic acid in water.

Calibration curves were obtained by the standard addition method. To 900 μ L of pooled CSF samples, 0, 50 or 100 μ L of 1 μ mol/L 5MTHF solution was added. The solution obtained was completed to 1000 μ L with NaCl 0.9% solution. Calibrators obtained contained basal 5MTHF plus 0, 50 or 100 nmol/L 5MTHF.

For sample preparation, 50 μL of CSF sample or calibrator sample were mixed with 100 μL of 280 $\mu\text{mol/L}$ ascorbic acid. 10 μL of the resulting mixed solution was injected into the chromatograph.

Statistics.

To check the normality of data distribution we used the Shapiro-Wilk test. Histogram plot and normal probability plot were also drawn to graphically assess the normality of the data. Comparisons were performed with a two-tailed Student's t-test, after checking the homogeneity of variances using Fisher's test. P values of less than 0.025 were considered statistically significant. Statistical analysis were made using Matlab and excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Method development and validation

The method presented here allowed us to determine 5MTHF in CSF samples in less than 1.5 minutes (figure 1). Such a short analysis time was possible using UPLC apparatus associated with a short column (50 mm length). This analytical method associated with a simple dilution as sample pretreatment result in a very fast analysis, the fastest involving fluorescence detection. Indeed only 2 minutes are needed once CSF sample is thawed out.

So this is a really high throughput method, with possibility to analyze at least 25 CSF samples per hour.

Hence the method was validated. We used standard addition method to establish calibration curve. This way matrix effects were taken into account in calibration curve.

Relative standard deviation was below 10 % for both within-run and between-run imprecision which is acceptable. No difference was found between the concentrations measured within and between run. The procedure was linear up to 170 nmol/L. Estimated limit of quantification (LOQ) was 10 nmol/L for a signal to noise ratio of 10.

Thus performances of the method presented here are comparable to the ones previously published (Van Haandel, L. 2012; Belz, S. 1994), except for the run time. Indeed, our method is as fast as the ones using mass spectrometry detection but faster than the ones using fluorescence detection (Kirsch, SH. 2012; Luo, W. 2002; Belz, S. 1994).

Effect of age

CSF concentration of 5MTHF appears to be related to age as shown on figure 2. In the whole group of patients a negative correlation was observed between 5MTHF CSF concentration

and age ($r = -0.3584$, $p < 0.001$). When reduced to patient under 16 years old, a stronger negative correlation was observed ($r = -0.4026$, $p < 0.001$). This was in accordance with previous publication (Ormazabal, A. 2006; Verbeek, MM. 2008). Thus, patients were grouped according to age.

First patients were grouped year by year. After checking for normal distribution in each group, we found only lognormal distribution. Hence comparison was made on log-transformed data. We didn't find significant differences between patients aged 0 to 1 years and patients aged 1 to 2 years. This is different from a previous publication (Ormazabal, A. 2006). It might be explained by the low number of patients in each group in the previous study (12 and 32 respectively) as compared to our study (187 and 101 respectively).

Finally patients were grouped in a totally different way (table 2). Although concentration values are similar to the ones previously published, age groups are different. An explanation of this difference might be the large number of samples we studied compared to previous studies.

MTHFR deficiency diagnosis

Among all CSF samples analyzed, one of them was devoid of 5MTHF. No peak was found at retention time of 5MTHF (figure 3).

This is evidence of a profound cerebral folate deficiency. Further tests lead to the diagnosis of MTHFR deficiency.

CONCLUSION

The method we proposed here is the fastest one for quantification of 5MTHF by fluorescence in CSF samples. Including sample preparation, it requires only 2.5 minutes.

We established reference values for a large population (889 patients), larger than in previous studies. Finally our method successfully diagnosed a case of MTHFR deficiency.

REFERENCES

- Aylett S-B, Neergheen V, Hargreaves IP, et al (2013) Levels of 5-methyltetrahydrofolate and ascorbic acid in cerebrospinal fluid are correlated: implications for the accelerated degradation of folate by reactive oxygen species. *Neurochemistry international* 63:750–5.
- Belz S, Frickel C, Wolfrom C, et al (1994) High-performance liquid chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and

folinic acid in serum and cerebrospinal fluid. *Journal Of Chromatography B, Biomedial applications* 661:109–118.

Chladek J, Sispera L, Martinkova J (2000) High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. *Journal of Chromatography B* 744:307–313.

Gordon N (2009) Cerebral folate deficiency. *Developmental medicine and child neurology* 51:180–2.

Hyland K, Shoffner J, Heales SJ (2010) Cerebral folate deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 33:563–70.

Kirsch SH, Herrmann W, Geisel J, Obeid R (2012) Assay of whole blood (6S)-5-CH₃-H₄ folate using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404:895–902.

Luo W, Li H, Zhang Y, Ang CY (2002) Rapid method for the determination of total 5-methyltetrahydrofolate in blood by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 766:331–337.

Ormazabal A, García-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, et al (2006) Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients : Reference values for a paediatric population. *Clinica chimica acta* 371:159–162.

Ormazábal A, Perez-Dueñas B, Sierra C, et al (2011) Folate analysis for the differential diagnosis of profound cerebrospinal fluid folate deficiency. *Clinical biochemistry* 44:719–21.

Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, et al (2004) Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clinical chemistry* 50:423–32.

van Haandel L, Becker ML, Williams TD, et al (2012) Comprehensive quantitative measurement of folate polyglutamates in human erythrocytes by ion pairing ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 26:1617–30.

Verbeek MM, Blom AM, Wevers RA, et al (2008) Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. *Molecular genetics and metabolism* 95:127–32.

Wang X, Zhang T, Zhao X, et al (2014) Quantification of folate metabolites in serum using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 962:9–13.

FIGURES

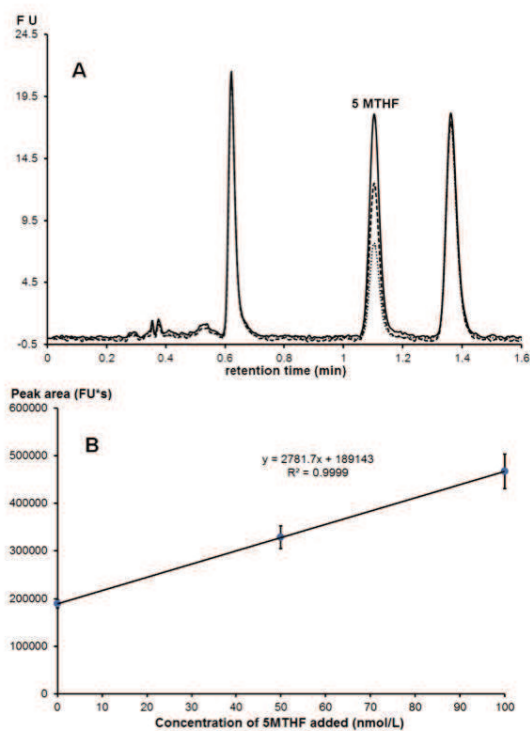


Figure 1: (A) Chromatographic profiles of a pooled CSF spiked with 0, 50 or 100 nmol/L 5MTHF under the proposed chromatographic conditions: column Atlantis BEH C18 (2.1×50 mm, $1.7 \mu\text{m}$); mobile phase: pH 2.7 phosphate buffer / acetonitrile (94 / 6, v/v); flow rate: 0.5 mL/min at 30°C ; detection: λ_{ex} 295 nm, λ_{em} 355 nm (FU: fluorescence units (arbitrary units)). (B) Calibration curve obtained with the standard addition method

Table 1: Analytical recovery and accuracy of the method, and between-run comparison.

Analytes	Added concentration (nmol/L)	Pooled CSF						p- values
		Within run (n = 10)			Between run (n = 10)			
		Measured concentration (nmol/L)	Analytical recovery (%)	CV (%)	Measured concentration (nmol/L)	Analytical recovery (%)	CV (%)	
5 MTHF	0	67.9	-	4.5	70.4	-	8.3	0.4053
	50	118.2	100.5	7.3	122.2	103.8	9.4	0.5245
	100	167.9	100.0	7.8	173.0	102.7	9.6	0.5786

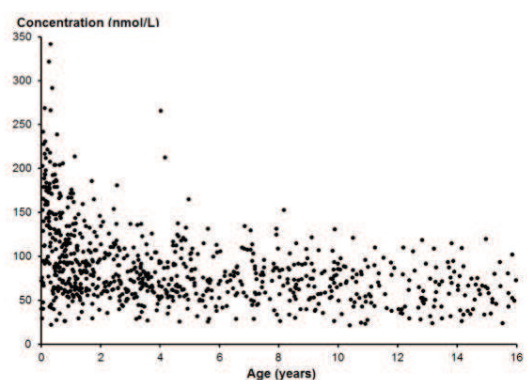


Figure 2: Variation of 5MTHF concentration in CSF with age of patients.

Table 2: Reference values for 5 MTHF in CSF for a pediatric population

	5 MTHF
0 – 2 years	115 (58)
A (n = 288)	44 – 211
A vs B	p < 0.001
2 – 5 years	81 (32)
B (n = 199)	42 – 136
B vs C	p = 0.0487
5 – 9 years	75 (25)
C (n = 143)	34 – 115
C vs D	p = 0.0015
9 – 16 years	65 (24)
D (n = 168)	29 – 110
D vs E	p < 0.001
over 16 years	54 (22)
E (n = 91)	25 – 95

Results were expressed in nmol/L as average (standard deviation) and 5th centile – 95th centile.

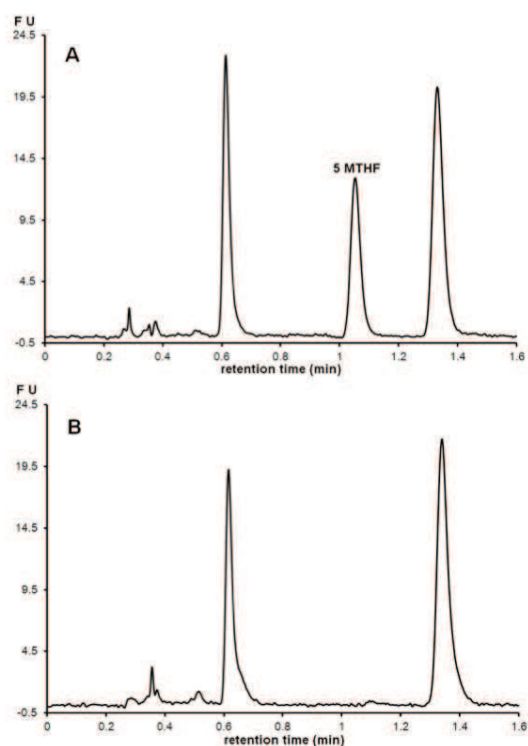


Figure 3: Chromatographic profiles obtained with the proposed method for CSF samples from patients. (A) CSF sample from a healthy patient. (B) CSF sample from a patient with MTHFR deficiency.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail étaient de développer des méthodes simples et rapides de diagnostic des troubles de la neurotransmission et d'établir les valeurs normales fréquentes dans la population française. En effet, lorsque nous avons débuté ce travail, le dosage des neurotransmetteurs nécessitait plusieurs étapes longues et fastidieuses de préparation de l'échantillon et de quantification, essentiellement par HPLC. En outre, aucune méthode ne permettait de doser directement la BH4, cofacteur essentiel des réactions d'hydroxylation intervenant dans la synthèse des amines impliquées dans la neurotransmission.

Le travail réalisé a abouti, dans un premier temps, grâce à l'étude systématique de tous les paramètres intervenant dans la séparation et l'électro-oxydation des ptérines, de proposer une méthode de dosage directe et simultanée dans le LCR de la BH4 et de toutes les ptérines d'intérêt diagnostic. Ce dosage ne nécessite qu'une seule étape chromatographique par HPLC, précédée d'une simple filtration pour éliminer les protéines. Ceci nous a permis ensuite de développer une méthode de diagnostic rapide par UHPLC des troubles dopaminergiques et sérotoninergiques. Cette méthode est capable de doser simultanément, en moins de 10 minutes, tous les métabolites de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine, ainsi que toutes les ptérines d'intérêt diagnostic, notamment la NH2 et la BH2. Parallèlement, nous avons aussi développé une méthode rapide de dosage, par UHPLC, en moins de deux minutes, du 5MTHF dans le LCR, dans le but d'évaluer l'intérêt diagnostique de ce métabolite.

Appliquée à plus de 1400 échantillons, la méthode de diagnostic rapide proposée nous a permis d'établir les valeurs « normales » fréquentes pour la population française ainsi que le diagnostic de quelques déficits enzymatiques tels que des déficits en TH, en SR ou en AADC. Par ailleurs, la récente participation à un plan de contrôle qualité externe international a contribué à conforter la validation de la méthode proposée. Ainsi, sur les six échantillons « contrôles » reçus jusqu'à présent, les résultats obtenus ont permis de poser le diagnostic attendu, sans aucune ambiguïté.

Enfin, pour compléter l'exploration des troubles du métabolisme de la BH4 et du suivi thérapeutique, nous avons proposé une méthode de dosage rapide par UHPLC, en moins de 6 minutes, de tous les composés cités, incluant la BH4.

En fait, sur la totalité des dosages réalisés nous n'avons recensés que peu de cas positifs. Malgré le biais de recrutement des patients qui présentaient tous des symptômes d'atteintes neurologiques au moment du prélèvement, seuls 15 % des cas se sont révélés positifs. Ceci témoigne de l'urgence de trouver d'autres biomarqueurs pour le diagnostic des troubles neurologiques autres que ceux liés à la neurotransmission. Toutefois, nos résultats ont montré que plus de 14 % de patients étudiés présentaient une néoptérine élevée, témoin d'une activation de la réponse immunitaire. Ainsi, outre le diagnostic rapide des troubles de la neurotransmission liés au métabolisme des amines biogènes, la méthode proposée permet aussi de diriger le diagnostic vers les syndromes d'activation immune. La publication de ces derniers résultats est en cours de préparation, en collaboration avec nos partenaires du Service de Neuro-pédiatrie du groupe hospitalier Trousseau-La Roche Guyon.

Par ailleurs, nous avons engagé, tout récemment, une collaboration avec une équipe d'électrochimistes de notre université, afin de vérifier le mécanisme d'électrooxydation proposé pour la BH4.

Enfin, au cours de nos diverses expérimentations nous avons pu constater l'instabilité de la BH4 en solution. Ces observations nous ont interpellé sur l'intérêt de l'utilisation de la BH4 en thérapeutique. Ne serait-ce pas plus judicieux de la remplacer par la BH2 ou la sépiaptérine, voir même la bioptérine ? Ces dernières formes sont plus stables, moins polaires et probablement moins onéreuses. Du fait de leur faible polarité, ces molécules devraient présenter, de toute évidence, une meilleure biodisponibilité. La question reste posée. En attendant, les méthodes de dosage direct de la BH4 que nous avons proposé constituent les outils nécessaires et suffisants pour répondre à cette question.

REFERENCES

- Adams RN (1976) Probing Brain Chemistry with Electroanalytical. *Analytical chemistry* 48:1126–1138.
- Allen GFG, Land JM, Heales SJR (2009) A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 97:6–14.
- Aylett S-B, Neergheen V, Hargreaves IP, et al (2013) Levels of 5-methyltetrahydrofolate and ascorbic acid in cerebrospinal fluid are correlated: implications for the accelerated degradation of folate by reactive oxygen species. *Neurochemistry international* 63:750–5.
- Banka S, Blom HJ, Walter J, et al (2011) Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *American journal of human genetics* 88:216–25.
- Ben-Shachar S, Zvi T, Rolfs A, et al (2012) A founder mutation causing a severe methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency in Bukharian Jews. *Molecular genetics and metabolism* 107:608–10.
- Bicker J, Fortuna A, Alves G, Falcão A (2013) Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples--a review. *Analytica chimica acta* 768:12–34.
- Biondi R, Ambrosio G, De Pascali F, et al (2012) HPLC analysis of tetrahydrobiopterin and its pteridine derivatives using sequential electrochemical and fluorimetric detection: application to tetrahydrobiopterin autoxidation and chemical oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 520:7–16.
- Blackstone C (2009) Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine “transportopathy.” *The journal of clinical investigation* 119:1455–1458.
- Blau N, Kierat L, Heizmann CW, et al (1992) Screening for Tetrahydrobiopterin Deficiency in Newborns Using Dried Urine on Filter Paper. *Journal of inherited metabolic disease* 15:402–404.
- Blau N, Thöny B (2008) Pterins and Related Enzymes (Book chapter). *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. pp 655–701
- Blau N, Thöny B, Renneberg A, et al (1998) Dihydropteridine reductase deficiency localized to the central nervous system. *Journal of inherited metabolic disease* 21:433–434.
- Bortolato M, Pivac N, Muck Seler D, et al (2013) The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience* 236:160–85.
- Bourcier S, Benoist J-F, Clerc F, et al (2006) Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:1405–1421.

- Brautigam C, Wevers R, Hyland K, et al (2000) The influence of L-dopa on methylation capacity in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: biochemical findings in two patients. *Journal of inherited metabolic disease* 23:321–4.
- Cañada-Cañada F, Espinosa-Mansilla A, Muñoz de la Peña A, Mancha de Llanos A (2009) Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method. *Analytica chimica acta* 648:113–22.
- Candito M, Nagatsu T, Chambon P, Chatel M (1994) High-performance liquid chromatographic measurement of cerebrospinal fluid tetrahydrobiopterin, neopterin, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in neurological diseases. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 657:61–6.
- Cardinali DP, Pévet P (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine* 2:175–190.
- Cario H, Smith DEC, Blom H, et al (2011) Dihydrofolate Reductase Deficiency Due to a Homozygous DHFR Mutation Causes Megaloblastic Anemia and Cerebral Folate Deficiency Leading to Severe Neurologic Disease. *The american journal of human genetics* 88:226–231.
- Chandra-Hioe MV, Bucknall MP, Arcot J (2011) Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads. *Analytical and bioanalytical chemistry* 401:1035–42.
- Chi C-S, Lee H-F, Tsai C-R (2012) Tyrosine hydroxylase deficiency in Taiwanese infants. *Pediatric neurology* 46:77–82.
- Chladek J, Sispera L, Martinkova J (2000) High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. *Journal of Chromatography B* 744:307–313.
- D'Aco KE, Bearden D, Watkins D, et al (2014) Severe 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency and Two MTHFR Variants in an Adolescent With Progressive Myoclonic Epilepsy. *Pediatric neurology* 51:266–70.
- Fekkes D, Voskuilen-Kooijman A (2007) Quantitation of total biopterin and tetrahydrobiopterin in plasma. *Clinical biochemistry* 40:411–3.
- Fiege B, Ballhausen D, Lucja K, et al (2004) Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Molecular Genetics and Metabolism* 81:45–51.
- Fismen L, Eide T, Djurhuus R, Svoldal AM (2012) Simultaneous quantification of tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin, and biopterin by liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 430:163–70.
- Fujita K, Maruta K, Ito S, Nagatsu T (1983) Urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic (vanillylmandelic) acid, 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic (homovanillic) acid, and 5-

hydroxy-3-indoleacetic acid determined by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clinical chemistry* 29:876–8.

Fukushima T, Nixon JC (1980) Analysis of Reduced Forms of Biopterin Biological Tissues and Fluids. *Analytical biochemistry* 102:176–188.

Furuya H, Murai H, Takasugi K, et al (2006) A case of late-onset Segawa syndrome (autosomal dominant dopa-responsive dystonia) with a novel mutation of the GTP-cyclohydrazase I (GCH1) gene. *Clinical neurology and neurosurgery* 108:784–6.

Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ (2003) Sources and Significance of Plasma Levels of Catechols and Their Metabolites in Humans. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305:800–811.

González RR, Fernández RF, Vidal JLM, et al (2011) Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *Journal of neuroscience methods* 198:187–94.

Gorren ACF, Kungl AJ, Schmidt K, et al (2001) Electrochemistry of pterin cofactors and inhibitors of nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry* 5:176–86.

Gramer G, Garbade SF, Blau N, Lindner M (2009) Pharmacokinetics of tetrahydrobiopterin following oral loadings with three single dosages in patients with phenylketonuria. *Journal of inherited metabolic disease* 32:52–7.

Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, et al (2010) Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS research and therapy* 7:nd.

Hannisdal R, Svandal A, Ueland PM (2008) Measurement of folate in fresh and archival serum samples as p-aminobenzoylglutamate equivalents. *Clinical chemistry* 54:665–72.

Hannisdal R, Ueland PM, Svandal A (2009) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of folate and folate catabolites in human serum. *Clinical chemistry* 55:1147–54.

Heintel D, Leimbacher W, Redweik U, et al (1985) Purification and properties of the phosphate eliminating enzyme involved in the biosynthesis of BH4 in man. *Biochemical and biophysical research communications* 127:213–219.

Hoke KR, Crane BR (2009) The solution electrochemistry of tetrahydrobiopterin revisited. *Nitric oxide* 20:79–87.

Hong JY, Park NH, Oh MS, et al (2013) Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 940:94–103.

Hopkins, F. G. (1895). The pigments of the pteridae : a contribution to the study of excretory substances which function in ornament. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 186 :661-682.

Horvath GA, Stockler-Ipsiroglu SG, Salvarinova-Zivkovic R, et al (2008) Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms. *Molecular genetics and metabolism* 94:127–31.

Hou C, Jia F, Liu Y, Li L (2006) CSF serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and neuropeptide Y levels in severe major depressive disorder. *Brain research* 1095:154–8.

Howells D, Smith I, Hyland K (1986) Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 381:285–294.

Hubbard KE, Wells A, Owens TS, et al (2010) Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Biomedical Chromatography* 626–631.

Hyland K (1985) Estimation of tetrahydro, dihydro and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 343:35–41.

Hyland K (2007) Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *The Journal of nutrition* 137:1568S–1572S; discussion 1573S–1575S.

Hyland K, Shoffner J, Heales SJ (2010) Cerebral folate deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 33:563–70.

Hyland K, Surtees RAH, Heales SJR, et al (1993) Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatric research* 34:10–4.

IBL International 5-5 HIAA ELISA. Instructions for Use RE59131:

IBL International HVA ELISA. Instructions for Use RE59191:

IBL International Neopterin ELISA. Fiche technique RE59321:

Jiménez Girón A, Martín-Tornero E, Hurtado Sánchez MC, et al (2012) A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine. *Talanta* 101:465–72.

Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, et al (2001) Determination of tetrahydrobiopterin in murine locus coeruleus by HPLC with fluorescence detection. *Brain research protocols* 8:25–31.

- Kapatos G (2013) The neurobiology of tetrahydrobiopterin biosynthesis: a model for regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription within nigrostriatal dopamine neurons. *IUBMB life* 65:323–33.
- Kema IP, de Vries EG, Muskiet FA (2000) Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 747:33–48.
- Khayat M, Korman SH, Frankel P, et al (2008) PNPO deficiency: an under diagnosed inborn error of pyridoxine metabolism. *Molecular genetics and metabolism* 94:431–4.
- Kim HR, Kim T-H, Hong S-H, Kim H-G (2012) Direct detection of tetrahydrobiopterin (BH4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications* 419:632–637.
- Kirsch SH, Herrmann W, Geisel J, Obeid R (2012) Assay of whole blood (6S)-5-CH₃-H₄ folate using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404:895–902.
- Komori H, Matsuishi T, Yamada S, et al (1999) Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of biopterin and biogenic amines. *Acta paediatrica* 88:1344–7.
- Komori H, Matsuishi T, Yamada S, et al (1999) Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of biopterin and biogenic amines. *Acta paediatrica* 88:1344–7.
- Kovac A, Somikova Z, Zilka N, Novak M (2014) Liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy. *Talanta* 119:284–290.
- Koyama E, Mlnegishi A, Ishizaki T (1988) Simultaneous Determination of Four Monoamine Metabolites and Serotonin in Cerebrospinal Fluid by “High-Performance” Liquid Chromatography with Electrochemical Detection; Application for Patients with Alzheimer’s Disease. *Clinical chemistry* 34:680–684.
- Kurian MA, Gissen P, Smith M, et al (2011) The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet neurology* 10:721–33.
- Kurian MA, Li Y, Zhen J, et al (2011) Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet neurology* 10:54–62.
- Kurian MA, Zhen J, Cheng S, et al (2009) Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia. *Journal of clinical investigation* 119:1595–1603.
- Lee N-C, Cheng L-Y, Liu T-T, et al (2006) Long-term follow-up of Chinese patients who received delayed treatment for 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 87:128–34.

Leu-Semenescu S, Arnulf I, Decaix C, et al (2010) Sleep and Rhythm Consequences of a Genetically Induced Loss of Serotonin. *Sleep* 33:307–314.

Li N, Guo J, Liu B, et al (2009) Determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites in a mouse brain microdialysate by coupling high-performance liquid chromatography with gold nanoparticle-initiated chemiluminescence. *Analytica chimica acta* 645:48–55.

Liu J, Pickford R, Meagher AP, Ward RL (2011) Quantitative analysis of tissue folate using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 411:210–7.

Longo N (2009) Disorders of bipterin metabolism. *Journal of inherited metabolic disease* 32:333–42.

Luccock MD, Green M, Priestnall M, et al (1995) Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. *Food Chemistry* 53:329–338.

Lunte CE, Kissinger PT (1983) Determination of pterins in biological samples by liquid chromatography/electrochemistry with a dual-electrode detector. *Analytical chemistry* 55:1458–62.

Luo W, Li H, Zhang Y, Ang CY (2002) Rapid method for the determination of total 5-methyltetrahydrofolate in blood by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 766:331–337.

Mangold S, Blau N, Opladen T, et al (2011) Cerebral folate deficiency : A neurometabolic syndrome ? *Molecular Genetics and Metabolism* 104:369–372.

Manini P, Andreoli R, Cavazzini S, et al (2000) Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 744:423–31.

Marín-Valencia I, Serrano M, Ormazabal A, et al (2008) Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. *Clinical biochemistry* 41:1306–15.

Marszałł ML, Makarowski R, Hinc S, Czarnowski W (2009) LC with Coulometric Detection for Analysis of 5-Methyltetrahydrofolate in Human Plasma. *Chromatographia* 69:829–835.

Mathieu P, Frappaz D, Chauvin F, et al (1996) A 5year (1990- 1994) neuroblastoma screening feasibility study in France. Methodology and preliminary observations. *Early human development* 46:177–196.

Murata S, Ichinose H, Fumi U (2007) Tetrahydrobiopterin and Related Biologically Important Pterins. *Top Heterocycle Chemistry* 8:127–171.

- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine Hydroxylase, the initial step in norepinephrine biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 239:2910–2917.
- Najmanová V, Rambousek L, Syslová K, et al (2011) LC-ESI-MS-MS Method for Monitoring Dopamine, Serotonin and Their Metabolites in Brain Tissue. *Chromatographia* 73:S143–S149.
- Nelson BC, Dalluge JJ, Margolis SA (2001) Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma. *Journal of Chromatography B* 765:141–50.
- Nelson BC, Pfeiffer CM, Margolis SA, Nelson CP (2004) Solid-phase extraction–electrospray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum. *Analytical Biochemistry* 325:41–51.
- Nelson BC, Satterfield MB, Sniegowski LT, Welch MJ (2005) Simultaneous Quantification of Homocysteine and Folate in Human Serum or Plasma Using Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry on stable isotope-dilution liquid chromatography / tandem. *Analytical Chemistry* 77:3586–3593.
- Niazi Shahabi H, Bergquist F, Nissbrandt H (2003) An investigation of dopaminergic metabolites in the striatum and in the substantia nigra in vivo utilising radiolabelled L-DOPA and high performance liquid chromatography: a new approach in the search for transmitter metabolites. *Neuroscience* 120:425–433.
- Niu D-M (2011) Disorders of BH4 metabolism and the treatment of patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Taiwan. *Brain & development* 33:847–55.
- Odin E, Wettergren Y, Carlsson G, Gustavsson B (2013) Determination of reduced folates in tumor and adjacent mucosa of colorectal cancer patients using LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography* 27:487–95.
- Opladen T, Ramaekers VT, Heimann G, Blau N (2006) Analysis of 5-methyltetrahydrofolate in serum of healthy children. *Molecular genetics and metabolism* 87:61–65.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, et al (2005) HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *Journal of neuroscience methods* 142:153–8.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, et al (2006) Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients : Reference values for a paediatric population. *Clinica chimica acta* 371:159–162.
- Pérez-Dueñas B, Toma C, Ormazabal A, et al (2010) Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. *Journal of inherited metabolic disease* 33:795–802.

- Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, et al (2004) Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clinical chemistry* 50:423–32.
- Póo-Prieto R, Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras G (2011) Analysis of Folate Form Distribution in Spanish Beers Using Combined Affinity and Ion-Pair Chromatography. *Journal Of The Institute Of Brewing* 117:188–194.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al (2004) *Neuroscience*, 3rd edition. Sinauer Associates, Inc
- Quinlivan EP, Hanson AD, Gregory JF (2006) The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical biochemistry* 348:163–184.
- Reynolds E (2006) Vitamin B12 , folic acid , and the nervous system. *The Lancet* 5:949–960.
- Ribasés M, Serrano M, Fernández-Alvarez E, et al (2007) A homozygous tyrosine hydroxylase gene promoter mutation in a patient with dopa-responsive encephalopathy: clinical, biochemical and genetic analysis. *Molecular genetics and metabolism* 92:274–7.
- Ringling C, Rychlik M (2012) Analysis of seven folates in food by LC–MS/MS to improve accuracy of total folate data. *European Food Research and Technology* 236:17–28.
- Romstad A, Kalkanoglu HS, Coşkun T, et al (2000) Molecular analysis of 16 Turkish families with DHPR deficiency using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human Genetics* 107:546–553.
- Sato H, Uematsu M, Endo W, et al (2014) Early replacement therapy in a first Japanese case with autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency with a novel point mutation. *Brain & development* 36:268–71.
- Sawabe K, Suetake Y, Nakanishi N, et al (2005) Cellular accumulation of tetrahydrobiopterin following its administration is mediated by two different processes; direct uptake and indirect uptake mediated by a methotrexate-sensitive process. *Molecular genetics and metabolism* 86 Suppl 1:S133–8.
- Sawabe K, Wakasugi KO, Hasegawa H (2004) Tetrahydrobiopterin Uptake in Supplemental Administration : Elevation of Tissue Tetrahydrobiopterin in Mice Following Uptake of the Exogenously Oxidized Product 7 , 8-Dihydrobiopterin and Subsequent Reduction by an Anti-folate-Sensitive Process. *Journal of pharmacological sciences* 96:124–133.
- Sawada BT, Numata K, Hirata S (1992) Serial Measurement of Urinary VMA and HVA Levels From One Infant: a study for neuroblastoma mass screening. *Journal of pediatric surgery* 27:452–455.
- Scapolla C, Cangemi G, Barco S, et al (2012) Identification and structural characterization by LC-ESI-Iontrap and LC-ESI-TOF of some metabolic conjugation products of homovanillic acid in urine of neuroblastoma patients. *Journal of mass spectrometry* 47:816–24.

Segawa M, Ohmi K, Itoh S, et al. (1971) Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-dopa : hereditary basal ganglia disease marked with diurnal fluctuation. *Shinryo* (Tokyo) 24, 667-72 [En japonais]

Serrano M, Perez-Duenas B, Montoya J, et al (2012) Genetic causes of cerebral folate deficiency : clinical , biochemical and therapeutic aspects. *Drug discovery today* 17:1299–1306.

Shintaku H, Asada M, Sawada Y (2000) Diagnosis and treatment of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Brain & development* 22:S118–21.

Steinfeld R, Grapp M, Kraetzner R, et al (2009) Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. *American journal of human genetics* 85:354–63.

Su F, Wang F, Zhu R, Li H (2009) Determination of 5-Hydroxytryptamine, Norepinephrine, Dopamine and Their Metabolites in Rat Brain Tissue by LC–ESI–MS–MS. *Chromatographia* 69:207–213.

Suominen T, Uutela P, Ketola R a, et al (2013) Determination of Serotonin and Dopamine Metabolites in Human Brain Microdialysis and Cerebrospinal Fluid Samples by UPLC-MS/MS: Discovery of Intact Glucuronide and Sulfate Conjugates. *PloS one* 8:e68007.

Suzuki K, Owada M (1991) A Simple and Sensitive Method for the Determination of Pterins in Cerebrospinal Fluid . Clinical Usefulness for Management of Tetrahydrobiopterin Deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 14:825–830.

Talvik I, Segawa M, Veri K, et al (2010) Cases of dopa-responsive dystonia (Segawa disease) in Estonia. *Brain & development* 32:428–31.

Tani Y, Ohno T (1993) Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid-chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 617:249–55.

Tareke E, Bowyer JF, Doerge DR (2007) Quantification of rat brain neurotransmitters and metabolites using liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry and comparison with liquid chromatography / electrochemical detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21:3898–3904.

Tay SKH, Poh KS, Hyland K, et al (2007) Unusually mild phenotype of AADC deficiency in 2 siblings. *Molecular genetics and metabolism* 91:374–8.

Thöny B, Neuheiser F, Kierat L, et al (1998) Mutations in the pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase (PCBD) gene cause a benign form of hyperphenylalaninemia. *Human genetics* 103:162–7.

Tsuji M, Takagi A, Sameshima K, et al (2011) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency with progressive polyneuropathy in an infant. *Brain & development* 33:521–4.

- Tsunoda M (2006) Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* 386:506–14.
- Van Daele J, Blancquaert D, Kiekens F, et al (2014) Folate Profiling in Potato (*Solanum tuberosum*) Tubers by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 62:3092–3100.
- Van Dam D, Vermeiren Y, Aerts T, De Deyn PP (2014) Novel and sensitive reversed-phase high-pressure liquid chromatography method with electrochemical detection for the simultaneous and fast determination of eight biogenic amines and metabolites in human brain tissue. *Journal of chromatography A* 1353:28–39.
- van Haandel L, Becker ML, Williams TD, et al (2012) Comprehensive quantitative measurement of folate polyglutamates in human erythrocytes by ion pairing ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 26:1617–30.
- Verbeek MM, Blom AM, Wevers RA, et al (2008) Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, bipterin and neopterine concentrations. *Molecular genetics and metabolism* 95:127–32.
- Verbeek MM, Willemsen MAAP, Wevers RA, et al (2008) Two Greek siblings with sepiapterin reductase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 94:403–9.
- Wang PJ, Ko YM, Young C, et al (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (Segawa syndrome) in Taiwan. *Brain & development* 16:126–31.
- Wang X, Zhang T, Zhao X, et al (2014) Quantification of folate metabolites in serum using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 962:9–13.
- Wassenberg T, Willemsen MAAP, Geurtz PBH, et al (2010) Urinary dopamine in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: the unsolved paradox. *Molecular genetics and metabolism* 101:349–56.
- Wei B, Li Q, Fan R, et al (2014) Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC-MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 88:416–22.
- Werner ER, Blau N, Thöny B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochemical journal* 438:397–414.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H (1996) High-performance liquid chromatographic methods for the quantification of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes synthase. *Journal Of Chromatography B, Biomedical applications* 684:51–58.

Yakabe T, Ishida J, Yoshida H, et al (2000) Determination of 5-Hydroxyindole-3-acetic Acid in Human Urine by High-performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection. *Analytical Sciences* 16:545–547.

Zafeiriou DI, Willemsen MA, Verbeek MM, et al (2009) Tyrosine hydroxylase deficiency with severe clinical course. *Molecular genetics and metabolism* 97:18–20.

Zhang W, Wan F, Gu J, et al (2004) In Vivo Determination of Tetrahydrobiopterin and Monoamine Neurotransmitters in Rat Brain by Liquid Chromatography with a Nano Crystalline Mn-Doped Lead Dioxide Film Modified Electrode. *Chromatographia* 59:677–682.

Zhang W, Zhu W, Xu H, et al (2005) Liquid chromatography-electrochemical detection for studying the effects of tetrahydrobiopterin on monoamine neurotransmitters in rat striatum. *Science in China Series B* 48:368.

LISTE DES ABBREVIATIONS

3OMD	3 ortho methyl dopa
5FTHF	5 formyl tetrahydrofolate
5 HIAA	5 hydroxy indole acetic acid
5MTHF	5-méthyl tetrahydrofolate
5OHT	5 hydroxy tryptophane
6 PTP	6 pyruvoyl tetrahydropterin
7,8 BH ₂	dihydrobioptérine
AADC	amino acid decarboxylase
B	bioptérine
BH ₂	dihydrobioptérine (voir aussi 7,8 BH ₂)
BH ₄	tetrahydrobioptérine
BHE	barrière hémato-encéphalique
C18	chaîne de carbone octadécyl
C8	chaîne de carbone octyl
CFD	cerebral folate deficiency ou deficit cerebral en folate
COMT	catéchol o methyl transférase
CSF	cerebrospinal fluid (voir aussi LCR)
CV	coefficient de variation
DAD	diode array detector ou détecteur à barrettes de diodes
DAT	dopamine active transporter
DHBA	acide dihydroxybenzoïque
DHF	dihydrofolate
DHFR	dihydrofolate reductase
DHPR	dihydropteridin reductase
DOPAC	dihydroxyphenylacetic acid
DTDS	dopamine transporter deficiency syndrome
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EIM	erreurs innées du métabolisme
FR α	folate receptor alpha
FR β	folate receptor beta
GABA	gamma aminobutyric acid
GC-MS	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GC-MS/MS en tandem	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GTP	guanosine triphosphate
GTP-CH	guanosine triphosphate cyclohydrolase
Hcy	homocystéine
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
HVA	homovanillic acid
I ₂	diiode
KI	iodure de potassium
LC	chromatographie en phase liquide
LC-ECD	chromatographie liquide couplée à un détecteur électrochimique
LC-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LC-UV	chromatographie liquide couplée à un détecteur ultraviolet
LCR	liquide céphalo-rachidien (voir aussi CSF)
LOD	limite de détection
LOQ	limite de quantification
MAO	monoamine oxydase
Met	methionine
MHPG	3 methoxy 4 hydroxyphenylglycol
MnO ₂	dioxyde de manganèse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
MTHFR	5,10 méthylène tetrahydrofolate reductase
MTX	methotrexate
N	neoptérine
NaNO ₂	nitrite de sodium
NH ₂	dihydroneoptérine
NH ₂ triP	dihydroneoptérine triphosphate
P4C	pterin 4 alpha carbinolamine
pABG	para aminobenzoyl glutamate
PAH	phenylalanine hydroxylase
PbO ₂	dioxyde de plomb
PCD	pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase
PL	ponction lombaire

PLP	pyridoxal phosphate
PNPO	pyridoxamine phosphate oxidase
PTPS	pyruvoyl tetrahydropterin synthase
qBH2	quinonoid dihydrobioptérine
SAH	S adenosyl homocystéine
SAM	S adenosyl méthionine
SNC	système nerveux central
SPE	solide phase extraction
SR	sepiapterine reductase
TH	tyrosine hydroxylase
THF	tetrahydrofolate
TPH	tryptophane hydroxylase
UHPLC	chromatographie en phase liquide à ultra haute performance
VMA	vanylmandellic acid